

## Služba

„Ich dien“, sloužím, měl na stuze vepsáno ve svém rodovém znaku dávný český král. Je to, nicméně, povinnost – naplňovat takto službu veřejnosti (implicitně očekávaná) pro každou odbornou společnost jako nepominutelný atribut její činnosti.

Jedním z prostředků, které Česká společnost chemická a Asociace českých chemických společností mají ke své službě odborné veřejnosti, je jejich časopis *Chemické listy*, který tuto svoji funkci vykonává již 124. rok.

Čtenáři „Listů“ viděli za posledních několik let řadu technicky náročných pozitivních změn, drobné změny v politice ediční a několik změn v obsazení funkcí. Chemická veřejnost, pokud je nám známo, považuje stav časopisu a změny, ke kterým došlo, v drtivé většině za pozitivní a dobré. Redakci je znám (abychom byli objektivní a přesní) pouze jeden člen ČSCH, který politiku a činnost časopisu kritizuje z mnoha aspektů, i z toho si redakce bere ponaučení.

Vedení Společnosti, Asociace a Redakční rada i kruh *Chemických listů* jsou odhodláni (kromě toho, že budou časopis dále vydávat) zlepšovat formální i obsahovou stránku časopisu. Nedopustit zrušení recenzí na články v *Listech* zveřejňované, spíše je zpřísnit a zlepšit, nedopustit změnu časopisu na magazín, nedopustit takové změny, které by vedly k tomu, že by časopis přestal být „impaktován“ a tudíž zachovat všechno to, co vložili do jeho „rodné anamnézy“ otcové zakladatelé. Neustoupit od faktu, že *Listy* jsou vydávány v jazyce českém a slovenském a v odůvodněných výjimkách anglicky.

Ne nadarmo si tyto „otce zakladatele“ každoročně připomínáme Cenou Karla Preise, která je udělována za nejlepší příspěvek otištěný v ročníku *Chemických listů*. Hlásíme se k tomuto odkazu a děláme vše proto, abychom „vysoko zdviženou nesli svítilci pochodeň osvěty“, kterou zažehli.

Služba, o které jsme hovořili, a kterou cítíme za svoji povinnost se obohatila v době nedávno minulé a obohatit postupně o celou řadu nových prvků. Za nedůležitější považujeme (bez významu pořadí):

1. Informovat členy a chemickou obec o všem, co by je zajímalo a co by jim mohlo pomoci v jejich odborné činnosti.

2. Napomoci tomu, aby se *Listy* staly postupně pro celou chemickou obec primárním informačním zdrojem mj. i o zaměstnanosti, o možnostech zaměstnání a volné pracovní síle v oboru a to na úrovni národní i mezinárodní.
3. Využívat stále více možností internetu a elektronických forem informace ke službě chemické veřejnosti.
4. Spolupracovat s mezinárodními organizacemi a nadnárodními odbornými orgány, republikovými ministerstvy, důležitými orgány státu, ale i jednotlivými odbornými institucemi a firmami tak, aby chemická veřejnost byla všestranně informována o důležitých rozhodnutích, změnách, vyhláškách, zákonech, ale i politice a koncepcích.
5. Spolupracovat více s chemickými firmami a společnostmi podnikajícími ve výrobě, distribuci a obchodu v široké oblasti chemie tak, aby *Listy* v maximální možné míře informovaly chemickou obec o dění v oblasti, ale i tak, že otištěním určitých informací převezme Asociace určitou záruku nad jejich odbornou, ale i etickou kvalitou. K tomu posílit složku *Listů* přinášející informace charakteru technického, technologického a inženýrského a to zejména pod odbornou garancí České společnosti průmyslové chemie, České společnosti chemického inženýrství a Svazu chemického průmyslu ČR.
6. Lépe sloužit obci učitelské od základní úrovně obecného vzdělání až po vědeckou a vyhraněně odbornou sféru. Zvláště na nižších úrovních této činnosti je co dohánět.
7. Sloužit tomu, aby se zkvalitnilo povědomí (laické) veřejnosti o úloze chemie a jejích produktů v každodenním životě, ale i o tom, že pouze vysoce vzdělaní odborníci – chemici mohou k lepšímu změnit to, co napáchaly ziskuchtivé či téměř možno říci zločinné ruce těch, kdo ublížili (a ubližují) našemu životnímu prostředí a jež lze pouze těžko za odborníky v chemii považovat právě z důvodu toho, co učinili. Chemické listy jsou otevřeny jakékoliv spolupráci a aktivitě, která povede k jejich zlepšení, zvýšení množství, rozmanitosti a kvality informací a zavedení nových forem do práce redakce. Výzva, kterou chceme zakončit tento úvodník je jednoduchá: Pište, my to rádi předáme chemické obci.

Pavel Drašar

## CHEMIE A ALCHYMIE V POČÍTAČOVÉ SIMULACI CHOVÁNÍ MOLEKUL

KAREL HUML<sup>a</sup> a MARTIN KRATOCHVÍL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, Praha 6, e-mail: huml@imc.cas.cz, <sup>b</sup>Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Dolejškova 3, 182 23, Praha 8, e-mail: krata@indy.jh-inst.cas.cz

Došlo dne 23.VI.2000

Klíčová slova: počítačová simulace, molekulární dynamika, Monte Carlo, volná energie

## Obsah

1. Úvod
2. Výpočet změny Helmholtzovy energie  $F$  a Gibbsovy energie  $G$
3. Rozklad změny Gibbsovy funkce  $G$
4. Termodynamický cyklus
5. Závěr

## 1. Úvod

Výpočty Gibbsovy, resp. Helmholtzovy energie (ve shodě se starší literaturou označované jako volná energie), se často přirovnávají ke hledání svatého grálu počítačové chemie<sup>1</sup>. Důvodem je, že většina fyzikálních vlastností a dějů závisí na volné energii systému. Ze statistické mechaniky pak vyplývá, že rozdíl volné energie udává relativní pravděpodobnost nalezení systému v daném stavu oproti stavu druhému<sup>2</sup>. Ze znalosti volné energie lze tak odvodit např. směr a rozsah chemické reakce, vliv prostředí na reakce v roztocích a v enzymech, atd.<sup>3</sup> Proto metody stanovení volné energie jsou jednou z nejrychleji se rozvíjejících oblastí počítačové chemie.

Teoretickým základem všech těchto technik je statistická mechanika, tvořící most mezi mikroskopickým světem počítačové simulace a měřitelnými makroskopickými veličinami. K popisu systému mnoha částic lze použít různé statistické soubory. Nejpoužívanějším je kanonický soubor charakterizovaný počtem částic  $N$ , objemem  $V$  a teplotou  $T$ , označovaný symbolem  $NVT$  nebo izobaricko-izotermický soubor  $NPT$ , kde  $P$  je tlak. V dalším výkladu se nejprve omezíme na první z nich. Dá se však ukázat, že závěry, které odvodíme, jsou platné i pro soubor  $NPT$  (cit.<sup>4</sup>).

V systému o konstantním počtu částic, objemu a teplotě platí pro Helmholtzovu energii  $F$

$$F = -k_B T \ln Q \quad (1)$$

kde  $Q$  je tzv. partiční funkce souboru  $NVT$ , definovaná vztahem

$$Q = (h^{3N} N!)^{-1} \iint \exp[-H(\mathbf{p}, \mathbf{r})/k_B T] d\mathbf{p} d\mathbf{r} \quad (2)$$

a kde  $\mathbf{p}$  je vektor impulsů a  $\mathbf{r}$  je vektor souřadnic všech  $N$  uvažovaných částic. Veličina  $H(\mathbf{p}, \mathbf{r})$  je hamiltonián systému,  $k_B$  je Boltzmanova a  $h$  je Planckova konstanta<sup>1</sup>.

Z termodynamiky víme, že ze znalosti  $Q$  můžeme určit všechny termodynamické veličiny. Výpočet partiční funkce je však obtížný, neboť i pro velmi malý systém integrál ve (2) konverguje pomalu a tak je třeba extrémně dlouhých časů k tomu, abychom  $Q$  získali s dostatečnou přesností. V praxi nás však většinou nezajímá hodnota  $F$ , ale rozdíl Helmholtzovy energie  $\Delta F$  dvou stavů reakce, počátečního  $A$  a koncového  $B$ , tj.

$$\Delta F = F_B - F_A \quad (3)$$

kde výpočet konverguje k rozumnému odhadu veličiny  $\Delta F$  v reálném čase. Podrobné zdůvodnění nalezneme například v práci<sup>1</sup>.

V následujících odstavcích si krátce všimneme některých postupů vhodných pro výpočet změny Helmholtzovy energie  $\Delta F$  s využitím metody molekulární dynamiky (MD), případně metody Monte Carlo (MC). Zmíníme se rovněž o problému rozkladu Gibbsovy energie  $G$  na jednotlivé složky a uvedeme si několik aplikací, včetně použití tzv. termodynamického cyklu, při srovnávání paralelních procesů.

2. Výpočet změny Helmholtzovy energie  $F$  a Gibbsovy energie  $G$ 

Pro výpočet hodnoty  $\Delta F$  existuje řada metod, vyznačujících se různou časovou náročností a přesností. Jmenujme na tomto místě především dvě nejrozšířenější: Kirkwoodovu<sup>5,6</sup> metodu termodynamické integrace a Zwanzigovu<sup>7</sup> metodu perturbační, kterou do počítačové simulace chování molekul zavedli Tembe a McCammon<sup>8</sup>. Obě metody se dají odvodit ze společné „mateřské“ rovnice a za použití jistých limitních předpokladů přechází jedna v druhou. Ukazuje se, že každá je vhodná pro jiný typ úloh. Z dalších postupů jsou často citovány metoda pomalého růstu<sup>9</sup> a potenciál střední síly<sup>10</sup>.

Pro ilustraci si uvedeme hlavní myšlenku první z nich, tj. metody termodynamické integrace<sup>4</sup>. Předpokládejme, že známe dva různé stavy systému:  $A$ ,  $B$ , charakterizované příslušným hamiltoniánem  $H$ . Předpokládejme dále, že hamiltonián  $H$  systému je funkcí jistého reálného parametru  $\lambda$  (angl. coupling parameter<sup>11</sup>), a že  $H$  lze psát jako součet dvou členů: kinetické energie  $K$  a energie potenciální  $V$

$$H(\mathbf{p}, \mathbf{r}, \lambda) = K(\mathbf{p}, \lambda) + V(\mathbf{r}, \lambda) \quad (4)$$

Parametr  $\lambda$  zvolme tak, aby pro  $\lambda_A = 0$  bylo  $H(\mathbf{p}, \mathbf{r}, \lambda_A) = H_A(\mathbf{p}, \mathbf{r})$  a pro  $\lambda_B = 1$  platilo  $H(\mathbf{p}, \mathbf{r}, \lambda_B) = H_B(\mathbf{p}, \mathbf{r})$ .

Při spojitě změně  $\lambda$ , se pak spojitě mění Hamiltonián a tedy

i partiční funkce  $Q$ . Helmholtzova energie ve vztahu (1), je pak také funkcí  $\lambda$ . Jejím derivováním obdržíme<sup>1,4</sup>

$$\frac{\partial F(\lambda)}{\partial \lambda} = \frac{-k_B T}{Q(\lambda)} \frac{\partial Q(\lambda)}{\partial \lambda} = \left\langle \frac{\partial H(\mathbf{p}, \mathbf{r}, \lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} \quad (5)$$

kde  $\langle \rangle_{\lambda}$  znamená středování přes soubor konformací příslušný dané hodnotě  $\lambda$ , kde příslušný soubor je generován metodou molekulární dynamiky nebo Monte Carlo<sup>12</sup>.

Integrací tohoto výrazu dostáváme pro rozdíl Helmholtzovy energie mezi stavy A a B

$$\Delta F_{BA} = \int_{\lambda_A=0}^{\lambda_B=1} \left\langle \frac{\partial H(\mathbf{p}, \mathbf{r}, \lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda \quad (6)$$

což je tzv. termodynamická integrační formule metody termodynamické integrace<sup>3</sup>.

Volba  $\lambda$  závisí na typu úlohy. Přehled různých situací, kdy  $\lambda$  má charakter topografické tranzitní souřadnice, uvádí např. Beveridge<sup>10</sup>. Nejjednodušší situací je lineární závislost (např. spojitá změna torzního úhlu nebo meziatomové vzdálenosti) ve tvaru

$$V(\mathbf{r}, \lambda) = (1 - \lambda) V_A(\mathbf{r}) + \lambda V_B(\mathbf{r}) = V_A(\mathbf{r}) + \lambda \Delta V(\mathbf{r}) \quad (7)$$

Uvedený postup je analogií tzv. „morfinu“, známého z televize, kdy tvář jedné osoby se postupně mění ve tvář osoby druhé. Zavedením vztahu (7) do (6), a za předpokladu, že kinetická energie je konstantní<sup>13</sup>, následnou integrací získáme výsledný výraz

$$\Delta F = \int \langle \Delta V(\mathbf{r}) \rangle_1 d\lambda \quad (8)$$

kdy integrace probíhá od  $\lambda = 0$  do  $\lambda = 1$ . Numerická integrace výrazu (7) pak vede k přibližnému vztahu

$$\Delta F \sim \sum \langle \Delta V(\mathbf{r}) \rangle_i \Delta \lambda \quad (9)$$

kde sumace probíhá přes všechna  $i$  od 1 do celkového počtu  $n$  kroků  $\Delta \lambda$  (cit.<sup>14-16</sup>). Podrobnosti týkající se přesnosti odhadu  $\Delta F$  a konvergence výpočtu nalezneme např. v publikacích<sup>4,17-19</sup>. O použitelnosti výrazů (8) a (9), jestliže kinetické energie není konstantní, se zmíníme v následujícím.

### 3. Rozklad změny Gibbsovy energie $G$

Doposud jmenované metody výpočtu  $\Delta F$  jsou v principu rigorózní, ale u složitějších struktur výpočetně velmi náročné. Z tohoto důvodu byla zavedena celá řada aproximativních postupů, které v mnoha případech dávají výsledky v dobré shodě s experimentem.

V metodě molekulární mechaniky (angl. forcefield method) se vychází ze vztahu, kdy potenciální energie  $V$  je dána

součtem dílčích příspěvků (vazebné, van der Waalovy, elektrostatické atd.) ve tvaru

$$V = \sum V_k \quad (10)$$

V analogii s tímto výrazem se předpokládá platnost výrazu<sup>19</sup>

$$\Delta F = \sum \Delta F_k \quad (11)$$

Kritice tohoto postupu byla věnována celá řada prací<sup>20-22</sup>. Ukázalo se však, že rozklad je oprávněný, ale jednotlivé komponenty  $\Delta F_k$ , na rozdíl od celkové změny Helmholtzovy energie  $\Delta F$ , nejsou stavovými veličinami a proto závisí na cestě, po které reakce (či výpočet) probíhá<sup>3,19,23</sup>. Vyplyvá to ze skutečnosti, že na rozdílných cestách se jednotlivé fyzikální (či chemické) vlivy mohou značně lišit, přestože jejich výslednice je stejná. Toho lze s výhodou využít nejen při diskusi výsledků, ale zejména pro experimentální nebo teoretický odhad jednotlivých členů.

Stejně úvahy platí i pro Gibbsovu energii a její rozdíly. Pro ilustraci si uvedeme rozklad změny Gibbsovy energie (tzv. master equation) v případě výpočtu vazebné energie  $\Delta G_{\text{bind}}$  ligandu s receptorem jak ji uvádí Ajay a Murcko<sup>24</sup>

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{solvent}} + \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{int}} + \Delta G_{\text{motion}} \quad (12)$$

kde první příspěvek odpovídá vlivu rozpouštědla, druhý změně konformace, třetí specifickým interakcím protein-ligand a čtvrtý rotacím, translačně-rotacím pohybům a vibracím.

Různé způsoby rozkladu a jejich vyhodnocení nalezneme například v publikacích<sup>25,26</sup>.

### 4. Termodynamický cyklus

V řadě případů nás zajímá rozdíl dvou (nebo více) podobných procesů charakterizovaných Gibbsovou energií. To znamená, že hledáme hodnotu funkce

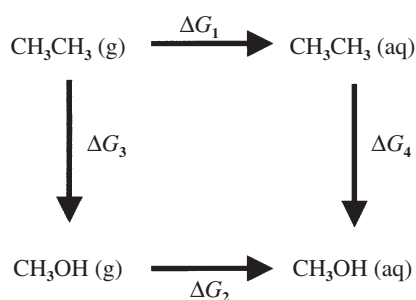
$$\Delta \Delta G = \Delta G_2 - \Delta G_1 \quad (13)$$

Jsou to úlohy typu stanovení rozdílů v solvataci, asociaci, stabilitě enzymů, katalýzy nebo aktivovaného komplexu<sup>27</sup>. Jako příklad si uvedme výpočet Gibbsovy energie rozdílů v rozpouštění plynného (g) methanolu a plynného ethanu ve vodě (aq)<sup>13,28,29</sup>. Postup výpočtu si můžeme znázornit následujícím termodynamickým cyklem, který zavedli do počítačové simulace Tembe a McCammon<sup>8</sup>.

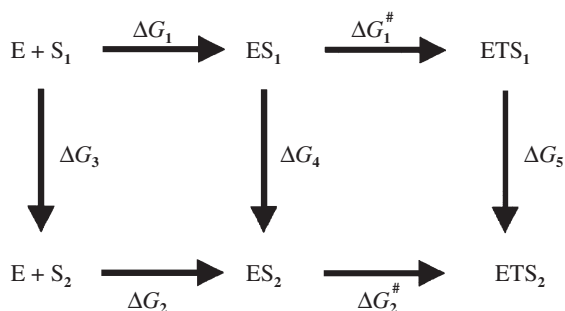
Vzhledem k tomu, že Gibbsova energie je stavová funkce, hodnota její změny při přechodu z počátečního rovnovážného stavu do konečného rovnovážného stavu je nezávislá na cestě mezi těmito dvěma stavy. To znamená, že bude rovněž platit

$$\Delta \Delta G = \Delta G_4 - \Delta G_3 \quad (14)$$

Jestliže (13) odpovídá reálné chemické (fyzikální) cestě,



Obr. 1. Termodynamický cyklus pro porovnání změny Gibbsovy energie rozpouštění plynného (g) methanolu a plynného ethanu ve vodě (aq). Chemické cesty:  $\Delta G_1$ ,  $\Delta G_2$ ; alchymistické cesty:  $\Delta G_3$ ,  $\Delta G_4$



Obr. 2. Složený termodynamický cyklus pro porovnání Gibbsovy energie vazby dvou různých substrátů:  $\text{S}_1$  a  $\text{S}_2$  ke stejnému enzymu E. Volný enzym a volný substrát: E a S; nekovalentní komplex: ES a tranzitní stav: ETS. Chemické cesty:  $\Delta G_1$ ,  $\Delta G_1^\#$ ,  $\Delta G_2$ ,  $\Delta G_2^\#$ ; alchymistické cesty:  $\Delta G_3$ ,  $\Delta G_4$ ,  $\Delta G_5$

pak (14) popisuje fiktivní (nechemickou, nefyzikální) cestu, při které obecně může docházet nejen ke změnám topologie, ale i transmucaci, vzniku či anihilaci prvků. Gao se svými spolupracovníky<sup>14</sup> zavedli pro takovýto přechod označení alchymistická cesta. Dá se ukázat, že na počítači lze alchymistickou cestu obvykle simulovat mnohem snadněji, než cestu chemickou. V našem případě se tak např. dá vyloučit značně náročný výpočet příspěvku vody v kroku odpovídajícímu  $\Delta G_1$  a  $\Delta G_2$ .

Termodynamické cykly lze na sebe navazovat. Tak např. při interakci enzymu E s různými substráty  $\text{S}_1$  a  $\text{S}_2$  lze použít obr. 2.

Jestliže E + S značí volný enzym a volný substrát, pak ES je nekovalentní (van der Waalsův neboli Michaelisův) komplex a ETS je tranzitní stav. Potom pro vazebnou Gibbsovu energii platí

$$\Delta\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta G_4 - \Delta G_3 \quad (15)$$

a pro katalytickou Gibbsovu energii platí

$$\Delta\Delta G_{\text{cat}} = \Delta G_2^\# - \Delta G_1^\# = \Delta G_5 - \Delta G_4 \quad (16)$$

Reakci rozšířenou ještě o hydrataci diskutuje např. Cald-

well<sup>30</sup>. Z rovnice (16) vyplývá možnost vyhnout se kvantově mechanickým výpočtům změny volné energie při přechodu přes tranzitní stav<sup>3</sup>. Rovněž tak metoda termodynamického cyklu dovoluje výpočet změny volné energie i v případě, kdy se mění hmoty atomů a tím i kinetické energie, takže lze použít postup uvedený v druhé kapitole i v tomto případě. Aplikace ve farmakochemii uvádí např.<sup>1</sup>

## 5. Závěr

Gibbsova energie je významnou veličinou při studiu chování molekul a jejich interakcí. Teorie nabízí několik postupů jak tuto hodnotu vypočítat. Dosavadní praxe se však potýká s jistými potížemi. Relativně přesné výpočty jsou časově náročné a jsou proto vhodné pouze pro jednoduché systémy. Na druhé straně zrychlení výpočtů v případě složitých molekulárních systémů vyžaduje řadu aproximací, což vede pouze ke hrubým odhadům Gibbsovy energie. Počítačová chemie zde tak neřekla ještě poslední slovo. Rozvoj matematických programů a samotných počítačů dávají naději, že bude možno předpovídat průběh i složitých chemických procesů, které by „ve zkumavce“ byly technicky, časově i finančně velmi náročné.

*Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky: grant 307/96/K226 a Ministerstvem průmyslu a obchodu České republiky: grant #PP-Z1/24/1999–2000.*

## LITERATURA

1. Mark E. A., v knize: *Encyclopedia of Computational Chemistry*, str. 1070. Wiley, Chichester 1998.
2. Malijevský A.: *Chem. Listy* 91, 454 (1997).
3. Kollman P.: *Chem. Rev.* 93, 2395 (1993).
4. Straatsma T. P., Berendsen H. J. C., Postma J. P. M.: *J. Chem. Phys.* 85, 6720 (1986).
5. Kirkwood J. G.: *J. Chem. Phys.* 3, 300 (1935).
6. Kirkwood J. G.: *J. Chem. Phys.* 10, 394 (1942).
7. Zwanzig R. W.: *J. Chem. Phys.* 22, 1420 (1954).
8. Tembe B. L., McCammon J. A.: *Comput. Chem.* 8, 281 (1984).
9. Berenssen H. J. C., Postma J. P. M., van Gunsteren W. F., v knize: *Molecular Dynamics and Protein Structure* (Hermans J., ed.). Polycrystal Book Service, Western Springs 1985.
10. Beveridge D. L., DiCapua F. M., v knize: *Computer Simulation of Biomolecular Systems* (van Gunsteren W. F., Weiner P.K., ed.). ESCOM, Leiden 1989.
11. Kirkwood J. G., v knize: *Theory of Liquids* (Alder B. J., ed.). Gordon and Breach, New York 1968.
12. Huml K., Vondrášek J.: *Mater. Struct.*, v tisku.
13. DISCOVER: *Manual BIOSYM/Molecular Simulations 2.9.7/95.0/3.00*, sv. I. San Diego 1995.
14. Gao J., Kutzera K., Tidor B., Karplus M.: *Science* 244, 1069 (1989).
15. Wodak S. J., Prévost M., v knize: *Statistical Mechanics, Protein Structures and Protein Substrate Interactions* (Doniah S., ed.). Plenum Press, New York 1994.
16. Lau F. T. K., Karplus M.: *J. Mol. Biol.* 236, 1049 (1994).

17. Beveridge D. L., DiCapua F. M.: *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**, 431 (1989).
18. Mezei M., Beveridge D. L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **482**, 1 (1986).
19. Boresch S., Archontis G., Karplus M.: *Proteins* **20**, 25 (1994).
20. Dill K. A.: *UCSF CAMD Course, San Francisco Jan. 16–18 1997*.
21. Mark A. E., van Gunsteren W. F.: *J. Mol. Biol.* **240**, 167 (1994).
22. Shi Y. Y., Mark A. E., Wang C.-X., Huang F., Berendsen H. J. C., van Gunsteren W. F.: *Protein Eng.* **6**, 289 (1993).
23. Boresch S., Karplus M.: *J. Mol. Biol.* **254**, 801 (1995).
24. Ajay, Murcko M. A.: *J. Med. Chem.* **38**, 4954 (1995).
25. Lee C. Y., Yang P. K., Tzou W. S., Hwanh M. J.: *Protein Eng.* **11**, 429 (1998).
26. Brooks III C. L., Karplus M., Pettitt B. M.: *Adv. Chem. Phys.* **71**, 59 (1988).
27. Madura J. D., Pettitt B. M., McCammon J. A.: *Chem. Phys. Lett.* **141**, 83 (1987).
28. Jorgensen W. L., Ravimohan C.: *J. Chem. Phys.* **83**, 3050 (1985).
29. Singh V. C., Brown F. K., Bash P. A., Kollman P. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1607 (1987).
30. Caldwell J. W., Agard D. A. Kollman P. A.: *Proteins* **10**, 140 (1991).

**K. Huml<sup>a</sup> and M. Kratochvíl<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague,* <sup>b</sup>*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Chemistry and Alchemy of Computer Simulations of Molecular Behaviour**

Methods of computer simulations in free energy calculations are briefly discussed. A method of thermodynamic integration is given in more detail to elucidate some features of the procedure. The so-called master equation is presented, including the criticism related to its application. Particularly, the thermodynamic cycle is described in connection with more complex tasks met in practice.

# POVRCHOVÁ MODIFIKÁCIA SÚBOROV MIKROELEKTRÓD S INTERAGUJÚCIMI DIFÚZNYMI VRSTVAMI

PETER TOMČÍK<sup>a</sup>, DUŠAN BUSTIN<sup>a</sup>  
a IVAN NOVOTNÝ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra analytickej chémie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, e-mail: tomcik@cvt.stuba.sk, <sup>b</sup>Katedra mikroelektroniky, Elektrotechnická fakulta, Slovenská technická univerzita, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovenská republika

Došlo dňa 13.VII.2000

Kľúčové slová: interdigitovaný súbor mikroelektród, chemická modifikácia, konduktometria, biosenzor

## Obsah

1. Úvod
2. Chemická modifikácia IDA mikroelektród
  - 2.1. Konduktometrické senzory
  - 2.2. Konduktometrické enzýmové biosenzory
  - 2.3. Meranie elektrónového difúzneho koeficientu chemických modifikátorov
3. Záver

## 1. Úvod

Efekty vyplývajúce s prekryvom difúzných vrstiev<sup>1</sup> pri interdigitovaných súboroch (IDA) mikroelektród možno využiť v elektroanalytickej chémii na stanovenie elektrochemicky reverzibilných látok voltampérometricky<sup>2</sup>, alebo elektroinaktívnych látok titráciou v difúznej vrstve podobne ako pri rotačnej diskovej elektróde s prstencom<sup>3</sup>.

Zistilo sa, že IDA mikroelektródy sa dajú modifikovať rozličnými polymérnymi filmami. Vodivosť týchto filmov závisí od prítomnosti určitých látok v roztoku. Na takomto princípe pracuje množstvo konduktometrických senzorov na báze tuhých polymérnych filmov.

Ďalším významným pozitívom chemickej modifikácie IDA mikroelektród je schopnosť imobilizácie enzýmov, alebo receptorových bielkovín priamo do polymérneho filmu, alebo do membrány. Produkty enzýmovej reakcie sú obvykle nabité častice a spôsobujú nárast vodivosti roztoku.

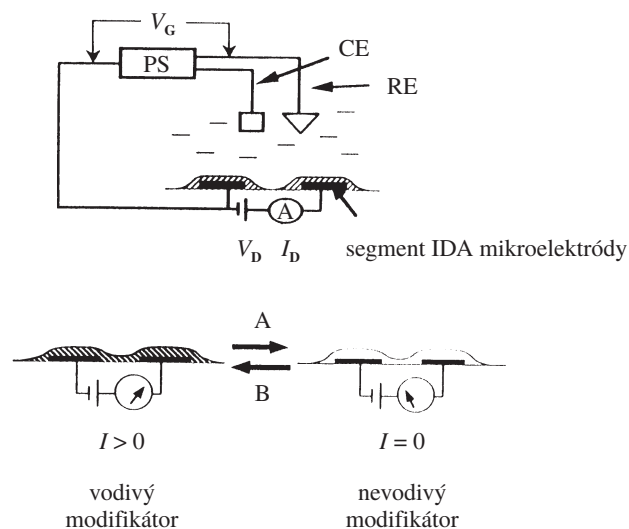
Toto bezosporu otvára nové možnosti analytického uplatnenia IDA mikroelektród, najmä pri bioelektrochemických aplikáciách. Pri nedeštruktívnosti týchto metód spolu s vysokou citlivosťou a selektivitou zabezpečenou modifikátorom môžu byť IDA mikroelektródy vhodným nástrojom pri monitoringu látok, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v biochemických procesoch.

## 2. Chemická modifikácia IDA mikroelektród

### 2.1. Konduktometrické senzory

Ukázalo sa, že mikrovrstvové a IDA mikroelektródy<sup>4-9</sup> sa dajú pokryť rôznymi vodivými filmami napr. polypyrolom<sup>10,11</sup> polyvinylferocénom<sup>12</sup>, polyanilínom<sup>13</sup> a poly(3-metyltiofénom)<sup>14</sup>. Z anorganických látok sa ako chemický modifikátor povrchu IDA mikroelektród uplatnili nerozpustné komplexy železa<sup>15-19</sup>. Najčastejším zástupcom tejto skupiny látok je Berlínska modrá<sup>20,21</sup>.

Takto chemicky modifikované IDA mikroelektródy<sup>22-28</sup> sa správajú ako chemirezistory, ktoré sú citlivé na prítomnosť určitých látok v roztoku. Princíp takéhoto chemirezistora opisuje obr. 1. Stanovovaná látka ovplyvňuje vodivosť polyméru ukotveného na mikroelektróde a v závislosti od jej koncentrácie sa mení ohmický prúd  $I_D$ , pretekajúci medzi dvomi nezávisle polarizovateľnými segmentami IDA mikroelektródy spojenými polymérom (medzi ne sa vkladá malé napätie  $V_D$ ). Vodivosť polyméru veľmi ovplyvňujú redox látky. Ako príklad môže slúžiť redoxný prepínač na báze polyanilínu, ktorého vodivosť stúpa s prídavkom 10 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  (prepínač sa „zapne“) a po prídavku  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$  rovnakej koncentrácie vodivosť klesne prakticky na nulu (prepínač sa „vypne“)<sup>27</sup>. O tom či daný prepínač bude fungovať, závisí od polyméru a interakcií, ktoré medzi ním a látkou nastávajú. Ak je polymérom polypyrol, redoxný prepínač sa aktivizuje nielen  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , ale aj kyselinou antrachinón-2-sulfónovou. Pri zmene modifikátora za kopolymér pyrol-*N*-metylpyrol prepínač nereaguje na kyselinu antrachinón-2-sulfónovú.



Obr. 1. Princíp konduktometrického senzora s IDA mikroelektródou<sup>29,30,41,43</sup>: PS – potenciostat, CE – pomocná elektróda, RE – referenčná elektróda,  $V_G$  – vstupné napätie,  $V_D$  – napätie medzi dvomi IDA segmentami skratovanými modifikátorom,  $I_D$  – prúd medzi dvomi IDA segmentami (výstupný prúd), A – látka, ktorá znižuje vodivosť povrchového filmu resp. B ju zvyšuje

IDA mikroelektrody s elektroimobilizovaným filmom Berlínskej modrej možno využiť na stanovenie alkalických kovov<sup>29</sup>. Z posunu konduktometrických charakteristík ( $I_D$  vs.  $V_G$ ) možno zistiť, že ovplyvňovanie vodivosti závisí od konkrétneho alkalického kovu. Zistila sa selektivita v poradí Cs>Rb>K>Na>Li. Pre tieto elektrody sa získal bez optimalizácie podmienok detekčný limit okolo  $10^{-4}$  mol.dm<sup>-3</sup>.

Na podobnom princípe pracujú aj senzory na meranie vlhkosti<sup>30,31</sup> a na toxické plyny<sup>32</sup> ako sú NO<sub>2</sub> a SO<sub>2</sub>. V prípade NO<sub>2</sub> sa využíva interakcia analytu s filmom ftalocyanínu meďnatého a detekčný limit je na úrovni ppb<sup>33</sup>. Niektoré špeciálne konduktometrické aplikácie IDA mikroelektrod sú zamerané na meranie dielektrických vlastností termosetových polymérov<sup>34</sup> a na priame monitorovanie kvality motorového oleja<sup>35</sup>. Senzory s filmami polymerizovanými plazmou sa využili na stanovenie podielov H<sub>2</sub>O v oleji<sup>36,37</sup>.

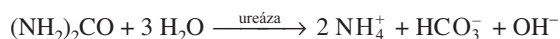
## 2.2. Konduktometrické enzýmové biosenzory

Elektropolymerizácia pyroly je veľmi výhodná pri enzýmových konduktometrických biosenzoroch<sup>38–40</sup>. Ak je v roztoku prítomný enzým, zabudováva sa do štruktúry polypyrolového filmu a tak dochádza k jeho imobilizácii. Nanášanie polypyrolového filmu sa prevádza zväčša pomocou bipotenciostatu anodickou polarizáciou segmentov IDA mikroelektrody (650 resp. 670 mV vs. SCE z roztoku, ktorý obsahuje 0,1 M pyrol a 0,1 M-KNO<sub>3</sub>). Hrúbka filmu narastá až napokon dôjde k skratovaniu oboch segmentov. Okamih skratovania sa prejaví tak, že oba segmenty vykazujú číselne rovnaký prúd, avšak polarita je opačná. Skratovanie segmentov možno presne určiť s chronoampérogramu potenciostatickej polymerizácie. Aby mal polypyrolový film elektrochemicky nanesený na IDA mikroelektrode hladký povrch a pravidelnú štruktúru, je dôležité, aby sa nanášal na hydrofóbny povrch. Hydrofóbnosť povrchu sa dosiahne silanizáciou roztokom 20 mM oktaedecyltrietoxysilánom v benzéne<sup>28</sup>.

Reverzibilná deprotonizácia väzby N–H v polypyrole je príčinou, že vodivosť polypyroly závisí od pH roztoku<sup>41</sup>. Pri znížení pH roztoku na hodnotu 3 vodivosť polypyroly stúpne asi 100 krát v porovnaní s vodivosťou pri pH 11. Polypyrolové filmy sa teda môžu správať ako pH senzitivne mediátory enzýmových biosenzorov<sup>42</sup>.

Ako príklad môže slúžiť biosenzor na penicilín<sup>43</sup>, ktorý pozostáva s IDA mikroelektrody pokrytej polypyrolym a membránou s penicilinázou. Penicilináza katalyzuje hydrolyzu penicilínu na kyselinu penicilínovú, čo sa prejaví zmenou vodivosti polypyroly.

Vyvinulo sa množstvo enzýmových biosenzorov, ktoré vykazujú odozvu na zvýšenie vodivosti roztoku produktami enzýmových reakcií<sup>44–49</sup>, tak ako v prípade biosenzora na stanovenie močoviny<sup>50</sup>, ktorá sa enzýmom ureázou inkorporovanou do gélovej membrány rozkladá podľa rovnice:



Výsledkom rozkladu sú nabité častice, čo sa prejaví veľkým nárastom vodivosti<sup>51</sup>.

Kalibrácia (nájdenie vzťahu medzi vodivosťou a koncentráciou stanovovanej látky) konduktometrických senzorov na

báze planárnych IDA mikroelektrod je zväčša empirická, ale pribúdajú aj teoretické štúdie<sup>52–55</sup>.

## 2.3. Meranie elektrónového difúzneho koeficientu chemických modifikátorov

Je dôležité poznať aké bude mať vlastnosti film ukotvený na IDA mikroelektrode. Elektroaktívne materiály môžu byť charakterizované jednosmernou elektrónovou konduktivitou  $s_e$  (S.cm<sup>-1</sup>), alebo elektrónovým difúznym koeficientom<sup>56</sup>  $D_e$  (cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). Určenie týchto veličín nie je jednoduché vzhľadom na geometriu IDA mikroelektrody<sup>57–63</sup>.

Bol publikovaný teoretický model, pomocou ktorého sa dajú vypočítať dané veličiny zo znalosti limitného prúdu medzi dvoma paralelnými platňami, oddelenými od seba vzdialenosťou  $d$  a z hrúbky polyméru  $t$ . Tento model umožňuje vypočítať  $D_e$  bez merania plochy mikroelektrody a koncentrácie elektroaktívneho materiálu<sup>64</sup>.

Pre každú dvojsegmentovú časť IDA systému s deponovaným filmom platí rovnica pre limitný prúd elektrónov<sup>4</sup>:

$$(I_L)_{\text{segment}} = zFtD_e c_s / d \quad (1)$$

kde  $(I_L)_{\text{segment}}$  – limitný difúzny prúd elektrónov na každom „dvojprstovom“ segmente IDA,  $z$  – nábojové číslo elektrodovej reakcie,  $F$  – Faradayova konštanta,  $l$  – dĺžka dvoch „segmentov“, medzi ktorými je imobilizovaný vodivý polymér s hrúbkou  $t$ ,  $c_s$  – koncentrácia látky v roztoku, z ktorej bude vytvorený film,  $d$  – šírka medzery medzi dvoma segmentami.  $D_e$  je difúzny elektrónový koeficient, ktorý sa vypočíta podľa vzťahu:

$$D_e = \frac{I_L dp}{Q} \frac{N}{N-1} \quad (2)$$

kde  $N$  je počet segmentov IDA mikroelektrody,  $p$  je vzdialenosť ich stredov,  $I_L$  je celkový elektrónový limitný prúd a  $Q$  je celkový náboj.

Pomer  $N/(N-1)$  je korekčný faktor, ktorý zohľadňuje fakt, že najvzdialenejšie segmenty sa neúčastňujú elektrónovej kondukcie. Jeho hodnota je významná len pri IDA mikroelektrodách s malým počtom segmentov.

Z toho<sup>65</sup> pre hrúbku filmu deponovanom na IDA mikroelektrode platí:

$$t = Q/(zFC_s lpN) \quad (3)$$

Rovnica (3) je jednoduchá, pre veľký počet segmentov je korekčný faktor rovný jednotke. Veľký počet segmentov zvyšuje hodnoty  $I_L$  a  $Q$ , čo uľahčuje meranie. Dĺžka segmentov  $l$  tam nie je zastúpená, rovnako ako koncentrácia látky a hrúbka filmu, čo je výhodné pri meraní<sup>66–68</sup>  $D_e$ .

Hodnota  $D_e$  Berlínskej modrej stanovena chronoampérometricky, je  $5.10^{-9}$  resp.  $2.7.10^{-9}$  cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> pre redukciu resp. oxidáciu a je v dobrej zhode s literatúrou<sup>69</sup>. Zistila sa však, rozdielnosť  $D_e$  v duálnom móde oproti jednoduchému, čo sa zdôvodňuje interakciami „film 1–film 2“ a neekvivalentnosťou povrchu oboch filmov<sup>4</sup>.

#### 4. Záver

Ďalšie zlepšenie vlastností IDA mikroelektrod možno dosiahnuť modifikáciou ich povrchu polymérnymi filmami. Pokrytie sa najčastejšie realizuje elektrochemicky a to za potenciostatických podmienok. IDA mikroelektrody pokryté Berlínskou modrou možno považovať za selektívne chemirezistory, ktorých vodivosť závisí od koncentrácie alkalického kovu v roztoku. IDA mikroelektrody pokryté polypyrolom detegujú zmeny pH roztoku a tak môžu byť efektívne pri stanovení látok, ktoré chemickou reakciou poskytujú kyslé alebo zásadité produkty. Interakcia stanovovanej látky s filmom na mikroelektrode je pomerne špecifická, čo je významné pri jej stanovení v zložitej vzorke. Možnosť imobilizácie enzýmov priamo do filmu, alebo do membrány značne rozširuje použitie IDA systémov na konduktometrické a voltampérometrické stanovenia látok s rôznymi oblasťami analytickej chémie.

*Táto práca bola podporená Grantovou agentúrou Slovenskej republiky, VEGA (Grant č. 1/6103/99).*

#### LITERATÚRA

- Tomčík P., Jursa S., Bustin D., Tvarožek V.: Chem. Listy 92, 626 (1998).
- Tomčík P., Bustin D., Tvarožek V.: Chem. Listy 93, 678 (1999).
- Tomčík P., Bustin D., Novotný I.: Chem. Listy 95, 18 (2001).
- Chidsey C. E., Feldman B. J., Lungren C., Murray R. W.: Anal. Chem. 58, 601 (1986).
- Chidsey C. E., Murray R. W.: Science 231, 25 (1986).
- Feldman B. J., Murray R. W.: Science 231, 103 (1986).
- Niwa O., Morita M., Tabei H.: J. Electroanal. Chem. 267, 269 (1988).
- Barger W. R., Wohltjen H., Snow A. W.: Proc. Int. Conf. on Sensors and Actuators-Transducers. Philadelphia 1985.
- Wohltjen H., Barger W., Snow A., Jarris N. L.: IEEE Trans. Electron Devices ED-32, 7 (1985); Chem. Abstr. 103, 114190 (1985).
- White H. S., Kittleson G. P., Wrighton M. S.: J. Am. Chem. Soc. 106, 5375 (1984).
- Kittleson G. P., White H. S., Wrighton M. S.: J. Am. Chem. Soc. 106, 7389 (1984).
- Kittleson G. P., White H. S., Wrighton M. S.: J. Am. Chem. Soc. 107, 7373 (1985).
- Paul E. W., Ricco A. J., Wrighton M. S.: J. Phys. Chem. 89, 1441 (1985).
- Thackeray J. W., White H. S., Wrighton M. S.: J. Phys. Chem. 89, 5133 (1985).
- Itaya K., Ataka T., Toshima S.: J. Am. Chem. Soc. 104, 4767 (1982).
- Ross P. H., Jr: J. Electrochem. Soc. 126, 67 (1979).
- Bocarsly A. B., Sinha S.: J. Electroanal. Chem. 137, 157 (1982).
- Crumbliss A. L., Lugg P. G., Morosoff N.: Inorg. Chem. 24, 3044 (1985).
- Schneemeyer L. F., Spengler S. E., Murphy D. W.: Inorg. Chem. 24, 3044 (1985).
- Neff V. D.: J. Electrochem. Soc. 125, 886 (1978).
- Busev H. J., Schwartzbach D., Petter W., Ludi A.: Inorg. Chem. 16, 2704 (1977).
- Hartmann M., Grabner E. W., Bergweld P.: Sens. Actuators, B 4, 333 (1991).
- McKinnon W. R., Haering J. W.: Mod. Aspects Electrochem. 15, 235 (1983); Chem. Abstr. 100, 54426v (1984).
- Engel D., Grabner E. W.: J. Phys. Chem. N. F. 160, 151 (1988).
- Matsue T., Nishizawa M., Sawaguchi T., Uchida I. J.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. 123, 1029 (1991).
- Aoki A., Matsue T., Uchida I.: Anal. Chem. 62, 2206 (1990).
- Nishizawa M., Sawaguchi T., Matsue T., Uchida I.: Synth. Met. 45, 241 (1991).
- Nishizawa M., Shibuya M., Sawaguchi T., Matsue T., Uchida I.: J. Phys. Chem. 95, 9042 (1991).
- Hartmann M., Grabner E. W., Bergweld P.: Anal. Chim. Acta 242, 249 (1991).
- Hamman C., Kampfrath G., Mueller M.: Sens. Actuators, B 1, 142 (1990).
- Bolthausen T., Baltus H.: Sens. Actuators, A 26, 509 (1991).
- Endres H. R., Prost S.: Sens. Actuators, B 4, 95 (1991).
- Kolesar E. S. Jr, Wiseman J. M.: Anal. Chem. 61, 2355 (1989).
- Sheppard N. F., Day D. R., Lee H. L., Senturia S. D.: Sens. Actuators, B 2, 263 (1982).
- Lee H. S., Wang S. S., Smolenski D. J., Viola M. B., Klusendorf E. E.: Sens. Actuators, B 20, 49 (1994).
- Zaretsky M. C., Melcher J. R., Cooke C. M.: IEEE Trans. Electr. Insul. 24, 1167 (1989); Chem. Abstr. 112, 160959d (1990).
- Zhou G., Kowel S. T., Srinivasan M. P.: IEEE Trans. Compon. Hybrids. Manuf. Technol. 11, 184 (1988); Chem. Abstr. 109, 103048 (1988).
- Foulds N. C., Lowe C. R.: J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 82, 1259 (1986).
- Umaña M., Waller J.: Anal. Chem. 58, 2979 (1986).
- Matsue T., Kasai N., Narumi M., Nishizawa M., Yamada H.: J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem. 300, 111 (1991).
- Matsue T.: Trends Anal. Chem. 12, 100 (1993).
- Nishizawa M., Osawa M., Matsue T., Uchida I.: Denki Kagaku 60, 1195 (1992).
- Nishizawa M., Matsue T., Uchida I.: Anal. Chem. 64, 2642 (1992).
- Valdes J. J., Wall J. G. Jr., Chambers J. P., Eldefrawi M. E.: John's Hopkins Apl. Tech. Dig. 9, 4 (1988); Chem. Abstr. 109, 166556e (1988).
- Taylor R. F., Marenchic I. G., Cook E. J.: Anal. Chim. Acta 213, 131 (1988).
- Thompson M., Krull U. J.: Anal. Chem. 63, 393A (1991).
- Wang J.: Anal. Chem. 63, 235 R (1991).
- Janata J.: Anal. Chem. 62, 33 R (1990).
- Wollenberger U., Paeschke M., Hintsche R.: Analyst 119, 1245 (1994).
- Watson L. D., Maynard P., Cullen D. C., Sethi R. S., Brettell J., Love C. R.: Biosensors 3, 101 (1988).
- Cullen D. C., Sethi R. S., Lowe C. R.: Anal. Chim. Acta 231, 33 (1990).



52. Fouke J. M., Wolin A. D., Saunders K. G., Neuman M. R., McFadden E. R.: *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 35, 877 (1988); *Chem. Abstr.* 108, 107777 (1988).
53. Zaretsky M. C., Mouyad L., Melcher J. R.: *IEEE Trans. Electr. Insul.* 23, 897 (1988); *Chem. Abstr.* 110, 134312 (1989).
54. Zaretsky M. C., Li P., Melcher J. R.: *IEEE Trans. Electr. Insul.* 24, 1159 (1989); *Chem. Abstr.* 110, 164381 (1989).
55. Sheppard N. F., Tucker R. C., Wu C.: *Anal. Chem.* 65, 1199 (1993).
56. Chidsey C. E., Murray R. W.: *J. Phys. Chem.* 90, 1479 (1986).
57. Roston D. A., Kissinger P. T.: *Anal. Chem.* 54, 429 (1982).
58. Rajan K. P., Neff V. D.: *J. Phys. Chem.* 86, 4361 (1982).
59. Mayer G. S., Shoup R. E.: *J. Chromatogr.* 255, 533 (1983).
60. Bond A. M., Fleischmann M., Rolison J.: *J. Electroanal. Chem.* 168, 1075 (1984).
61. Siperko L. M., Kuwana T.: *J. Electrochem. Soc.* 130, 396 (1983).
62. Aoki K.: *Electroanalysis (N.Y.)* 2, 229 (1990).
63. Feldman B. J., Murray R. W.: *Inorg. Chem.* 26, 1702 (1987).
64. Feldman B. J., Murray R. W.: *Anal. Chem.* 58, 2844, (1986).
65. Pickup P. G., Kutner W., Leidner C. R., Murray R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 106, 1981 (1984).
66. Facci J. S., Shmel R. M., Murray R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4959 (1982).
67. Pickup P. G., Murray R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 105, 4510 (1983).
68. Jernican J. C., Chidsey C. E., Murray R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 107, 2826 (1985).
69. Viehbeck A., DeBerry D. W.: *J. Electrochem. Soc.* 132, 1369 (1985).

**P. Tomčík<sup>a</sup>, D. Bustin<sup>a</sup>, and I. Novotný<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic,* <sup>b</sup>*Department of Microelectronics, Faculty of Chemical Engineering, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Microelectrode Arrays with Interacting Diffusion Layers: Surface Modification**

The review deals with some potentials of chemical modification of interdigitated array microelectrodes with various polymer films; their conductometric and enzyme applications are briefly reviewed. The modification can be performed potentiostatically from a modifier solution until both individually addressable segments are interconnected. The conductivity of polymer immobilized on the electrode surface is influenced by the presence of specific compounds. Electropolymerization of polypyrrole also allows immobilization of enzymes directly in the polymer structure. Conductometric enzyme biosensors can detect products of enzyme reactions due to increasing conductivity of solutions. The method is a powerful tool in analysis of species which play an important role in biochemical processes.

# SACHAROSA JAKO PRŮMYSLOVÁ SUROVINA

JITKA MORAVCOVÁ

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
e-mail: Jitka.Moravcova@vscht.cz

Došlo dne 25.V.2000

Klíčová slova: sacharosa, surovina, využití

## Obsah

1. Úvod
2. Degradace na látky s nižším počtem uhlíků
  - 2.1. Hydrolyza, solvolýza
  - 2.2. Oxidace
  - 2.3. Úplná destrukce
3. Modifikace všech osmi hydroxylových skupin
4. Zabudování sacharosy do makromolekul
5. Neselektivní parciální modifikace
6. Selektivní parciální modifikace
7. Biotransformace na oligosacharidy
8. Závěr

## 1. Úvod

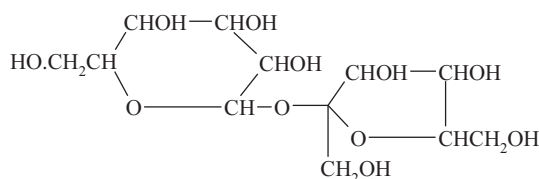
Když 17. listopadu 1747 přednášel německý chemik Andreas Sigismund Marggraf (1709–1782) před členy berlínské Královské akademie věd a krásných umění o výsledcích svých pokusů nalézt „pravý“ cukr v rostlinách rostoucích v evropských zemích, jistě netušil, jak důležitou kapitolu v historii sacharosy otevřel<sup>1</sup>. Sám sice odhadoval, že jednoduchá výroba sirupu z řepy by mohla být pro sedláky v budoucnosti ekonomicky výhodná, ale v této době nemohla konkurovat dovozu třtinového cukru. Zásadní obrat nastal díky námořní blokáde během napoleonských válek, kdy Francie strádala velkým nedostatkem cukru. Jakmile Napoleon uslyšel o otevření prvního cukrovaru (někdy kolem 1806–1807), přispěchal s celým dvorem a dekoroval majitele cukrovaru řádem Čestné legie, který strhnul z vlastní hrudi<sup>2</sup>. Po bitvě u Waterloo začaly prakticky všechny evropské země zpracovávat řepu cukrovou k velké škodě anglických kolonií a ve druhé polovině 19. století už množství cukru vyrobeného z řepy začalo konkurovat cukru třtinovému; v kampani 1994/95 bylo 30 % veškerého cukru vyrobeno z cukrovky.

Sacharosa je vůdčí komoditou po století, a proto nepřekvapuje, že snaha o zjištění její konstituce sahá až do pravěku organické chemie. První spalovací analýzu provedl<sup>3</sup> Prout v roce 1827 a na jejím základě odvodili nezávisle Liebig, Peligot, Berzelius a Dubrunfaut správný sumární vzorec  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Tollens v roce 1883 navrhl pro sacharosu strukturu glukoseptanosylfruktofuranosidu a o 10 let později odvodil Fischer, že

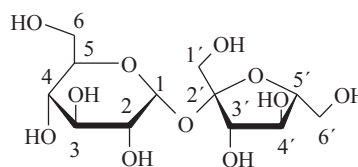
sacharosa je glukofuranosylfruktofuranosa. Až po roce 1926 na základě klasické methylační analýzy Haworth<sup>4,5</sup> postupně navrhl několik dalších strukturálních vzorců, z nichž ten z roku 1929 (obr. 1) je považován za první Haworthovu perspektivní projekci. Sacharosa ( $\beta$ -D-fruktofuranosyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid) (obr. 2) je neredukující disacharid, který obsahuje osm hydroxylových skupin. Tři primární hydroxylové skupiny jsou reaktivnější (v pořadí  $6 \sim 6' > 1'$ ) při alkylicích a acylacích než zbývajících pět sekundárních hydroxylových skupin. S činidlem, které je schopno reagovat se všemi hydroxylovými skupinami, by mohla sacharosa teoreticky poskytnout směs až 255 derivátů se stupněm substituce 1–8.

Sacharosa se světovou roční produkcí vyšší než 115 milionů tun je nejdostupnější organickou sloučeninou se 100% čistotou, s nízkou molekulovou hmotností a nízkou cenou, přesto se jí pro jiné účely než ryze potravinářské používá jen zhruba 5 % produkce. Její fyzikálně-chemické vlastnosti jsou totiž pro další modifikace jak výhodné (je krystalická, není hygroskopická, je chirální a enantiomerně čistá, je z obnovitelných zdrojů a biodegradabilní), tak nevýhodné (vysoká polarita, je polyfunkční a ze všech disacharidů nejlabilnější v kyselém prostředí). Právě zřejmé výhody sacharosy podnítily obrovský zájem chemiků o její využití jako průmyslové suroviny. Zatímco v období do roku 1965 bylo publikováno jen 15 plně identifikovaných derivátů sacharosy, v současné době je popsáno více než 300 těchto sloučenin<sup>6</sup>, což je přičítáno zájmu vyvolaném ropnou krizí v letech sedmdesátých. Rovněž velký počet přehledných článků a monografií výstižně charakterizuje základní orientaci výzkumu sacharosy za posledních 10 let (cit.<sup>6-22</sup>).

Nízká cena vstupní suroviny je nutnou ale nikoliv postačující podmínkou pro technologické uplatnění. Jestliže se uvažuje o tom, jaké průmyslové využití sacharosy jako unikátní chemikálie může mít reálnou naději na komerční úspěch, je nutno zvažovat i další kritéria související s vlastnostmi produktů a meziproductů ze sacharosy a s dostupností technologií. Lze je formulovat například do následujících obecných zásad: i) produkty musejí mít lepší aplikační nebo ekologické



Obr. 1. Strukturální vzorec sacharosy



Obr. 2.  $\beta$ -D-Fruktofuranosyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid

vlastnosti, a nebo musejí být levnější než ty původní, *ii*) meziprodukty by měly být zpracovatelné běžnou průmyslovou chemií (např. polymerizací), *iii*) technologie by měly zahrnovat minimum reakčních kroků s využitím levných činidel za environmentálně bezpečných podmínek, *iv*) reakce by měly probíhat buď ve vodném roztoku nebo bez rozpouštědla, *v*) v žádném stupni nelze použít kyselé prostředí nebo kyselé katalyzátory, *vi*) izolace a separace produktů musí být co nejjednodušší a snadno převoditelná z laboratorního do provozního měřítka.

Tento článek si klade za cíl podat souhrnnou nikoliv však vyčerpávající informaci o možnostech průmyslového využití sacharosy a o současném směru základního výzkumu v této oblasti.

## 2. Degradace na látky s nižším počtem uhlíků

### 2.1. Hydrolyza, solvolýza

Zpracování sacharosy na invertní cukr (ekvimolární směs D-glukosy a D-fruktosy) patří mezi historické technologie. Hydrolyza může být katalyzována minerálními kyselinami<sup>23</sup>,

silně kyselým iontoměničtem<sup>24,25</sup> nebo enzymaticky. Právě poslední jmenovaný postup využívající invertasu<sup>26</sup> ( $\beta$ -fruktofuranosidasa) z různých zdrojů (droždí<sup>19,27</sup>, *Sacharomyces*<sup>28-30</sup>, syrovátka<sup>31</sup>, grepy<sup>32</sup>) byl považován za velice perspektivní, ale stále ještě je ekonomicky méně výhodný než hydrolyza chemická. Podmínkou rentability<sup>19</sup> je totiž konverze vyšší než 70 % při koncentraci sacharosy cca 1 kg.l<sup>-1</sup>. Bohužel aktivita invertasy klesá s rostoucí koncentrací sacharosy již od 0,4 mol.l<sup>-1</sup> jako důsledek silných intra- a intermolekulárních vodíkových vazeb, které způsobují asociaci molekul substrátu do struktur pro účinek enzymu nevýhodných. Invertní cukr lze dokonce získat i hydrolyzou sacharosy bez přidání kyselého katalyzátoru, kdy jako interní katalyzátor působí kyseliny vzniklé oxidací sacharosy přímo v reakční směsi<sup>33</sup>. Chemická hydrolyza je doprovázena tvorbou vedlejších produktů, dianhydridů difruktosy<sup>34</sup>. Perspektiva výroby invertního cukru je do značné míry také ovlivněna ekonomikou jeho dalšího využití. V současné době je hlavní surovinou pro výrobu mannitolu. Katalytickou redukcí se získá směs 2:1 D-glucitolu (sorbitol) a mannitolu, ze které mannitol krystaluje a používá se pro výrobu sladidel<sup>35</sup>; v Německu je touto cestou zpracováváno<sup>36</sup> ročně asi 150 000 tun. Dále slouží k získání L-sorbosy pro výrobu vitamínu C mikrobiální oxidací<sup>37</sup> pomocí *Zymomonas*

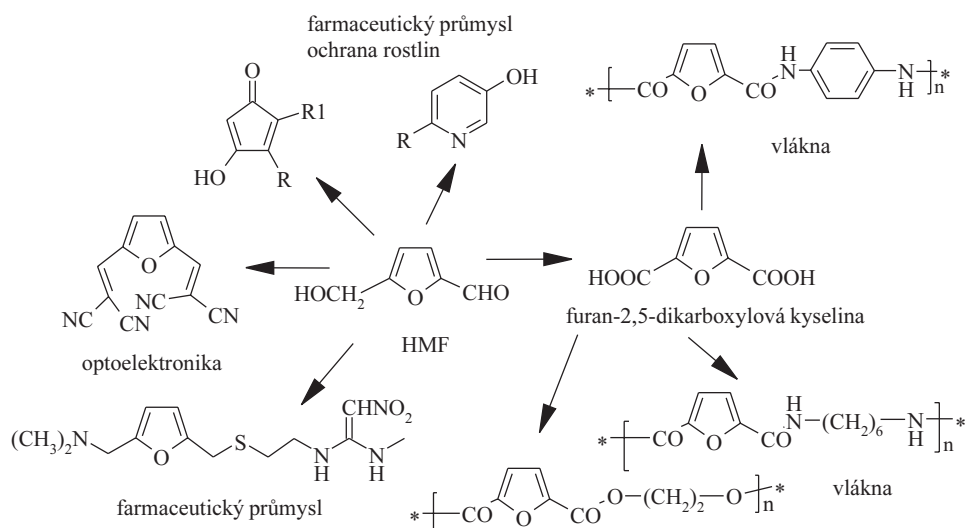


Schéma 1

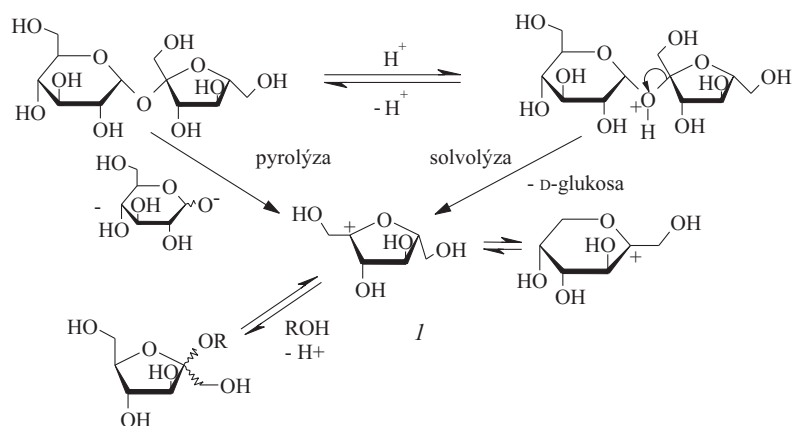


Schéma 2

*mobilis* a *Gluconobacter suboxydans*. Konečně lze invertní cukr fermentovat na směs D-glucitolu a D-glukonanu sodného<sup>38</sup>. Pokud je invertní cukr surovinou pro výrobu čisté D-fruktosy a D-glukosy<sup>39</sup>, je nezbytné zařadit pro separaci obou monosacharidů z matečných louhů po odkrystalování části D-glukosy chromatografií na iontoměničích<sup>40–42</sup>. Tento krok celý proces poněkud znevýhodňuje oproti výrobě D-glukosy a D-fruktosy z jejich alternativních surovin jakými je škrob a celulóza nebo fruktany. Aby se zvýšila účinnost separace směsi D-glukosy a D-fruktosy, je možné převést v první řadě D-glukosu na jinou využitelnou a současně lépe separovatelnou sloučeninu. Výhodné je katalyticky na paladiu oxidovat D-glukosu na D-glukonovou kyselinu vzduchem<sup>43</sup>, možné je to i enzymaticky<sup>44–46</sup> nebo elektrochemicky<sup>47</sup> či chemicky. Další možností je oxidativní dekarboxylace na D-arabinonovou kyselinu, která po hydrogenaci poskytne D-arabinitol<sup>48</sup>. Výroba D-glukosy a D-fruktosy začne být pravděpodobně ještě zajímavější, nalezne-li alespoň jedna z obou hexos nějaké další nové a významné odbytí; lepší vyhlídka je z tohoto pohledu přisuzována D-fruktose, která je perspektivní jako surovina pro výrobu 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF). Tato sloučenina je produktem degradace všech hexulos v kyselém prostředí a Südzucker (SRN) má patentovanou jeho výrobu z D-fruktosy<sup>49</sup>, ve které se výtěžek krystalického HMF se pohybuje mírně nad 40 % po chromatografické separaci na iontoměničích.

HMF vzniká také z D-glukosy za drastičtějších podmínek za zvýšeného tlaku<sup>50</sup>, vedlejšími produkty jsou D-fruktosa a D-mannosa. HMF je sloučenina s velmi širokým uplatněním, která by mohla ve výrobě velkotonážních chemikálií nahradit<sup>9</sup> surovinu založenou na petrochemii (schéma 1); typickým příkladem je náhrada kyseliny tereftalové za furan-2,5-dikarboxylovou kyselinu při výrobě polyamidů.

Solvolýza sacharosy (schéma 2) probíhá přes reaktivní intermediát, D-fruktofuranosylkarboniový kation *1*, který vzniká i pyrolýzou sacharosy<sup>51</sup> a který může dále reagovat za vzniku oligosacharidů, polysacharidů nebo reakcí s nejrůznějšími alkoholy poskytovat glykosidy použitelné jako detergenty<sup>52</sup>. Výběr vhodných alkoholů je prakticky neomezený a je možné, že alkylglykosidy připravené z vyšších alkoholů by se mohly uplatnit jako nová skupina detergentů vedle už vyráběných alkylpolyglykosidů<sup>53</sup>. Ke stejnému účelu by mohla sloužit solvolýza fluorovodíkem, který podporuje tvorbu tohoto oxokarboniového kationtu *1* a narozdíl od jiných minerálních kyselin v něm nedochází k nežádoucí dehydrataci sacharidů až na deriváty furanu. Tímto způsobem lze zatím ekonomicky vyrábět alkylglukosidy z D-glukosy, celulózy nebo škrobu<sup>54</sup>. Reakce sacharosy s fluorovodíkem za mírných podmínek poskytuje<sup>55</sup> snadno dianhydridy *2* a *3* (schéma 3), které nabízejí další možnosti transformací sacharosy na nízkokalorické přísady do potravin nebo na výrobu polymerů.

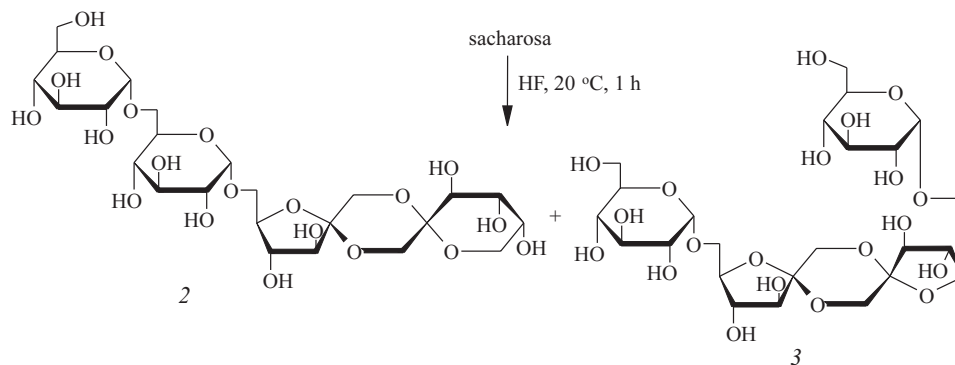


Schéma 3

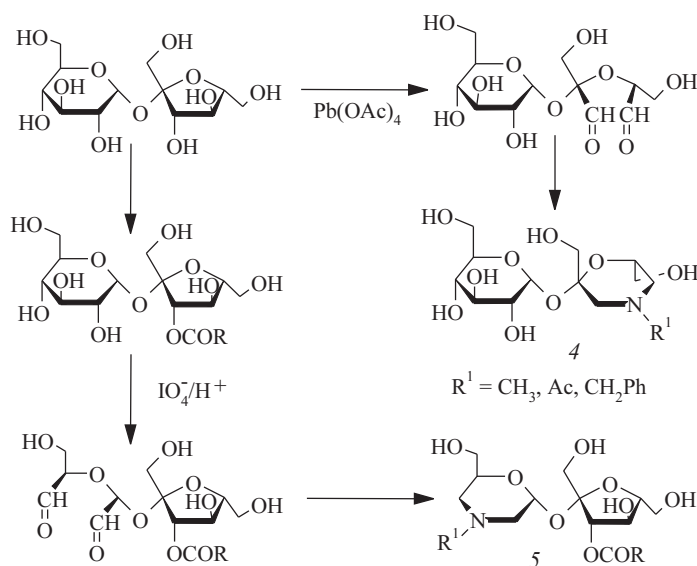


Schéma 4

## 2.2. Oxidace

Oxidační činidla klasicky používaná v chemii sacharidů – octan olovičitý a kyselina jodistá – selektivně štěpí<sup>56</sup> fruktofuranosový a glukopyranosový kruh v molekule sacharosu (schéma 4). Vzniklé dialdehydy lze podrobit reaktivní aminaci za vzniku derivátů morfolinu 4 a 5, z nichž některé jsou sladké a mohly by nalézt uplatnění i v syntéze biologicky aktivních látek. Pokud se k oxidaci použije sacharosa chráněná v polohách 6 a 6', pak obě činidla oxidují oba dva cukerné kruhy na příslušný tetraaldehyd, který redukcí a hydrolyzou poskytne enantiomerně čisté 3-substituované deriváty D-glycerolu<sup>57</sup>. Selektivní oxidace primárních hydroxylových skupin sacharosu na skupiny karboxylové kyslíkem na platině nebo paladiu probíhá zejména na uhlíku C-6 a C-6' za vzniku směsi 6,6'-dikarboxylové a 6- i 6'-monokarboxylových kyselin. Za drastičtějších podmínek<sup>58</sup> se oxiduje i třetí primární hydroxylová skupina v poloze 1' a vzniklá 6, 1', 6'-trikarboxylová kyselina je používána do pracích prášků proti usazování vodního kamene.

## 2.3. Úplná destrukce

Hydrogenolýza sacharosu za vysokých tlaků a teplot vede ke směsi ethylenglykolu, glycerolu a propan-1,2-diolu, která byla za II. světové války prodávána jako nemrzoucí směs pro bojovou techniku. Racemická kyselina mléčná vzniká energeticky oxidací sacharosu ve vysokém výtěžku a i ona představuje perspektivní surovinu z obnovitelných zdrojů pro další průmyslové využití. Alternativní postup výroby L-mléčné kyseliny využívá fermentaci sacharosu ale i D-glukosu nebo melasy pomocí plísní *Rhizopus arrhizus* nebo *R. oryzae*<sup>59-61</sup>. Pyrolýza *O*-acetylderivátu methylesteru kyseliny mléčné poskytuje totiž methylakrylát<sup>62</sup>, důležitý monomer pro výrobu umělých hmot. Dále kyselina mléčná celkem ochotně podléhá<sup>63-65</sup> polykondenzaci na polymer, který je biodegradabilní a vhodný zejména pro výrobu obalů<sup>66</sup> a pro výrobu léků s postupným, dlouhodobým účinkem<sup>67,68</sup>. Polymer L-mléčné kyseliny složený ze 3–19 jednotek má kancerostatický účinek při rakovině tlustého střeva a prsů<sup>69</sup>. Jednou z nejvíce sledovaných přeměn sacharosu je její fermentace na ethanol pomocí

bakterií *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* nebo *Klebsiella oxytoca*<sup>70</sup>. Průmyslovému využití zatím brání nízká konverze (<70 %) díky tvorbě vedlejších produktů a energeticky náročná izolace ethanolu ze zředěného roztoku s koncentrací max 70 g.l<sup>-1</sup>. Pouhá změna experimentálních podmínek se zdá být nedostatečná, a proto se velké naděje vkládají do genového inženýrství<sup>70</sup>. Dále se studuje<sup>71</sup> např. degradace sacharosu na kyselinu šťavelovou pomocí *Aspergillus niger*. Výtěžky jsou bohužel dost nízké (0,3 kg.l<sup>-1</sup> kg sacharosu), protože extracelulární enzymy hydrolyzují sacharosu a D-glukosa je pak oxidována na D-glukonovou kyselinu. Více než 60 let je intenzivně studována výroba methanolu, glycerolu a glykolů hydrokrakováním sacharidů nejnověji s použitím katalyzátorů na bázi tranzitních kovů<sup>72</sup>. Originální myšlenka na využití sacharosu na výrobu syntézního plynu (CO + H<sub>2</sub>), jehož další konverze na širokou paletu chemikálií a paliv je dostatečně prozkoušena, je prozatím v počátečním stadiu. Podobně enzymová konverze sacharosu na vodík už není nereálná alespoň v laboratorním měřítku, dosažená produkce byla 1,34 mol H<sub>2</sub> na 1 mol sacharosu<sup>73</sup>. Nicméně náhrada fosilních paliv obnovitelnými zdroji energie patří mezi technologie budoucnosti.

## 3. Modifikace všech osmi hydroxylových skupin

V této skupině derivátů jednoznačně první místo náleží esterům sacharosu. Oktaacetát sacharosu je hořký a přidává se do nápojů<sup>62</sup>, hlinitá sůl oktasulfátu sacharosu je populární lék proti žaludečním vředům (Sucralfatum, Antheptin, Ulcermin, Ulsanic)<sup>74</sup>. Směsný ester diacetát-hexaisobutyrtát sacharosu (SAIB) je v některých zemích přidáván do nápojů jako plnidlo<sup>75</sup>. Oktamethylsacharosa a karboxymethylsacharosa slouží k výrobě filtračních medií<sup>62</sup>.

## 4. Zabudování sacharosu do makromolekul

Již samotná příprava monomeru je komplikována nejednotností produktu, proto se většinou vede tak, aby vznikla směs asi 50 % monomeru vedle nezreagované sacharosu, a po

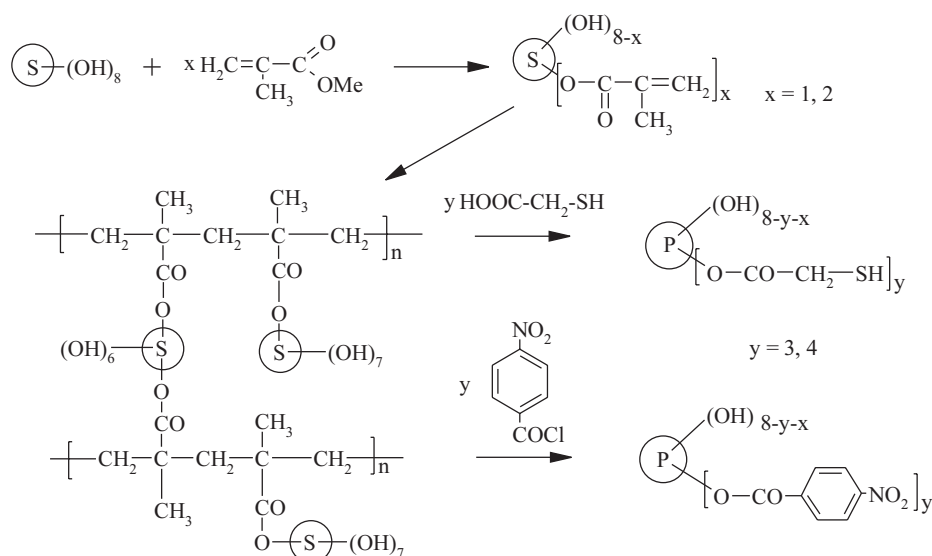
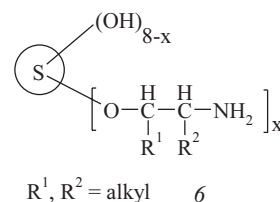


Schéma 5

radikálové polymerizaci se sacharosa odstraní extrakcí<sup>10</sup>. Tak se připravují hydrofilní zesíťované gely na bázi akrylátu nebo methakrylátu sacharosy, které se po vhodné derivatizaci používají k chelataci kovů (schéma 5). Zavedení *p*-nitrobenzoylové skupiny dovoluje ušít chelatační činidlo na míru následnou transformací nitro skupiny přes amino na diazoniovou skupinu, která snadno podléhá nukleofilním substitucím. Z methakrylátů sacharosy byly rovněž připraveny účinné katalyzátory fázového přenosu a fotolýzy vody<sup>10</sup>. Průmyslově by se mohly vyrábět polyurethany (schéma 6), které jsou vhodné díky nižší hořlavosti zejména na autosedačky<sup>76</sup>. Před polymerizací je sacharosa alkylována ethylenoxidem nebo propylenoxidem, protože urethany vyrobené ze sacharosy samotné jsou křehké. Rozsáhlá patentová ochrana výše zmíněných polymerů i dalších dokládá současnou renesanci využití sacharosy na biodegradabilní polymery; nicméně se doposud žádný z nich průmyslově nevyrábí.

## 5. Neselektivní parciální modifikace

Monoestery sacharosy s kyselinou stearovou, laurovou, behenovou, olejovou, palmitovou nebo myristovou se již od roku 1959 používají jako neionogenní detergenty v potravinách a kosmetice. Obsahují obvykle 70 % monoesteru, 30 % diesteru a zbytek je tvořen tri- a polyestery. Vyrábějí se transesterifikací a to buď triacylglycerolu v dimethylsulfoxidu nebo methylesterů mastných kyselin bezrozpouštědlovou technologií<sup>77</sup>. Monoestery sacharosy dispergované ve vodě (Semperfresh<sup>®</sup>), produkt firmy Semperviva (VB), vytvářejí na povrchu ovoce či zeleniny polopropustnou membránu zpomalující zrání, a proto se uplatňují i jako obalový materiál. Aminoalkylethery sacharosy 6 tvoří základ dvou nových perspektivních skupin neionogenních detergentů: *i*) amidy získá-



né reakcí aminu 6 s chloridy mastných kyselin a *ii*) deriváty močoviny získávané reakcí látky 6 s alifatickými isokyanáty. Ve srovnání s běžnými estery sacharosy mají vyšší hydrolytickou stabilitu. Polyfunkční deriváty sacharosy s amidickými skupinami se těší pozornosti jako kondenzační komponenty pro přípravu formaldehydových pryskyřic<sup>78</sup> (schéma 7). Tvorba esterů biologicky aktivních látek se sacharosou nebo D-glukosou zvýší jejich rozpustnost ve vodě až 400×, čehož se využívá v humánní i veterinární medicíně a v ochraně rostlin. V případě sacharosy nemá stupeň esterifikace přesáhnout 2, pak rozpustnost rapidně klesá<sup>10</sup>. Směs esterů sacharosy s kyselinou olejovou se stupněm esterifikace 6 až 8 byla vyvinuta firmou Procter&Gamble jako nekalorická náhrada tuků pod názvem Olestra a po 9 letech výzkumu byla v roce 1997 povolena pro použití v potravinách. Vyrábí se bezrozpouštědlovou transesterifikací a ve druhém stupni jsou mono- až pentaestery odstraněny enzymovou hydrolyzou lipasami. Olestra má tu výhodu, že není organismem metabolizována, na druhou stranu je nutno dodávat vitaminy rozpustné v tucích, které mohou být z těla vyplavovány.

## 6. Selektivní parciální modifikace

4,1',6'-Trichlor-4,1',6'-trideoxy-galakto-sacharosa (sukralosa), intenzivní sladidlo vyvinuté firmami Tate&Lyle a John-

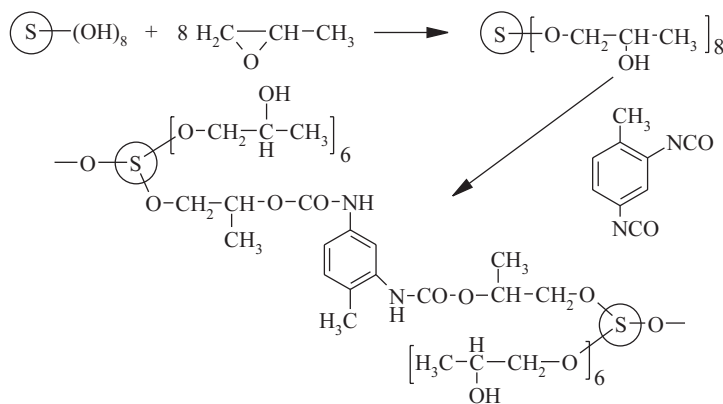


Schéma 6

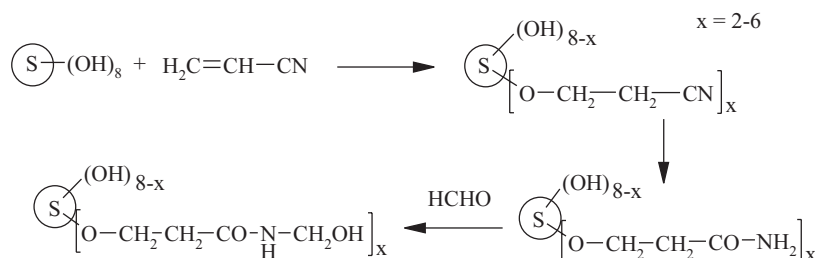


Schéma 7

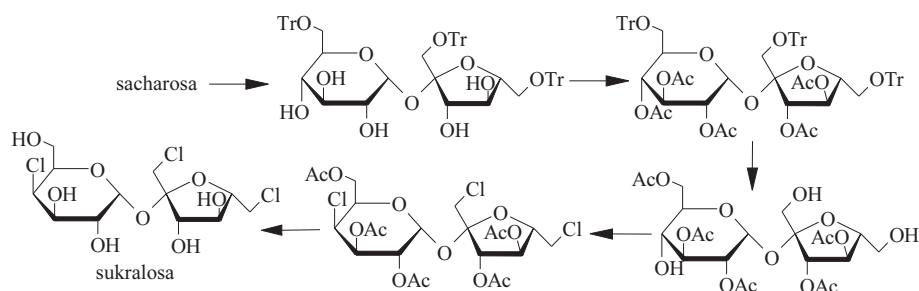


Schéma 8

son&Johnson, je asi 650× sladší než sacharosa a může sloužit jako důkaz, že v průmyslovém měřítku je možno realizovat i složitou technologii na polyfunkční surovině, pokud lze očekávat výrazný finanční úspěch. Impuls k zavedení sukralosu do výroby dal obchodní úspěch aspartamu, jehož produkce skočila z 11 milionů dolarů v roce 1981 na 700 milionů v roce 1985. Podle původního postupu<sup>79,80</sup> (schéma 8) byla sacharosa nejprve tritylována na primárních hydroxylových skupinách a poté acetylována. Při odstraňování chránících tritylových skupin současně migruje acetyl z polohy 4 do polohy 6 a vzniklý 2,3,6,3',4'-pentaacetát je substituován chlorem v polohách 4, 1' a 6'. Celý postup by bylo možno zkrátit selektivním chráněním primární hydroxylové skupiny v poloze 6. Řešením je současný výrobní postup<sup>81,82</sup> využívající třístupňovou cestu přes diacetal sacharosy 7, který kontrolovanou acetolýzou poskytne 6-*O*-acetát 8 a ten je již přímo chlorován Vilsmeierovým činidlem (schéma 9). Za tímto účelem byla rovněž studována příprava 6-*O*-acetylsacharosy tak, že *D*-glukosa byla nejprve fermentována s *Bacillus megaterium* na 6-*O*-acetyl-*D*-glukosu a ta byla glykosylována *D*-fruktosou pomocí nového kmene *B. subtilis*<sup>83</sup>. Maximální dosažená koncentrace 6-*O*-acetylsacharosy byla 120 g.l<sup>-1</sup>, což odpovídá výtěžku 58 %.

Pokud sacharosa má být skutečnou průmyslovou surovinou, je třeba nalézt jednoduché a do velkého měřítko snadno převoditelné selektivní reakční cesty od sacharosy k meziproduktům, které mohou být dále zpracovávány arsenálem organické chemie. Pravděpodobně největší perspektivu nabízí zavedení aktivované dvojné vazby např. oxidací některé sekundární hydroxylové skupiny. Tak přístup k derivátům sacharosy modifikovaným v poloze 2 otevírá 2-*O*-benzylsacharosa 9, kterou lze získat přímou benzylací v silně alkalickém prostředí<sup>84</sup> (schéma 10). Reakce se ukončí při 50% konverzi, protože pak je izolace benzyletheru 9 od nezreagované sacharosy jednoduchá. Dále je výhodné<sup>85</sup> ether 9 acetylovat a podrobit

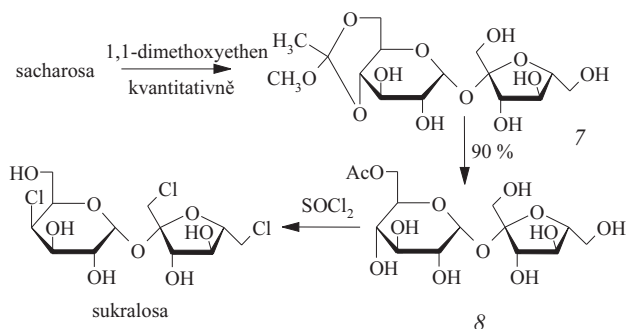


Schéma 9

hydrogenolýze na krystalický hepta-*O*-acetylderivát 10, jehož celkový výtěžek je 21 %, počítá-li se na skutečně zreagovanou sacharosu, tak 40 %. Podobně lze připravit i hepta-*O*-benzylderivát 11, který se snadno oxiduje na odpovídající 2-ketosacharosu 12. V mírně alkalickém prostředí se kvantitativně eliminuje kyselina benzoová a vznikne fruktosylovaný dihydropranon 13 v celkovém výtěžku 14 % na sacharosu. Krystalická hepta-*O*-pivaloylsacharosa 14 zase představuje<sup>85</sup> vstup k derivátům sacharosy v poloze 4 (schéma 11). Lehce může být oxidována<sup>86</sup> na 4-ketosacharosu 15, která v silně alkalickém prostředí eliminuje<sup>85</sup> kyselinu pivalovou na dihydropranon 16, který se získá s celkovým výtěžkem na sacharosu kolem 40 %. Nízký počet reakčních kroků, příznivé celkové výtěžky a relativně jednoduché čistící operace činí z dihydropranonů 13 a 16 perspektivní chirální stavební bloky pro průmyslové aplikace.

Až do roku 1974 nebyl znám žádný cyklický acetal sacharosy, přestože tento způsob chránění hydroxylových skupin cukrů je možno označit za klasický. Možnost modifikovat

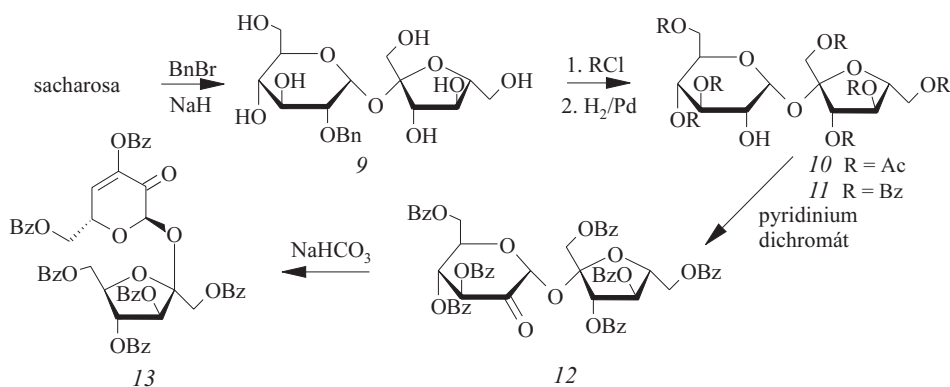


Schéma 10

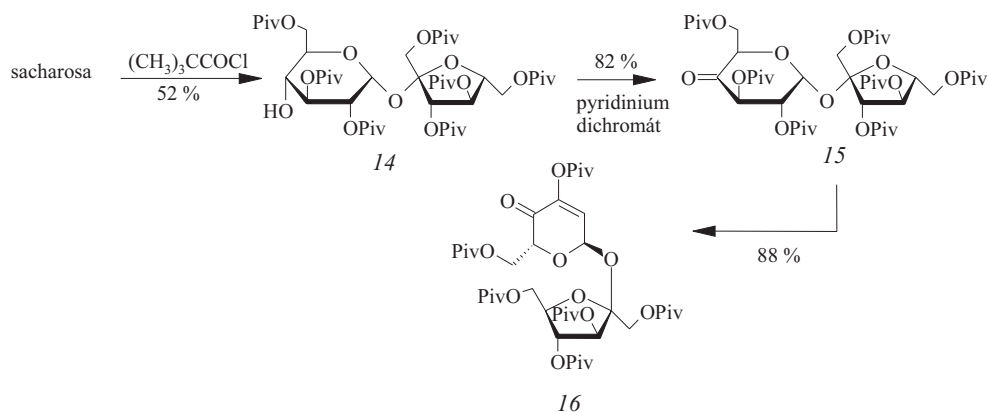


Schéma 11

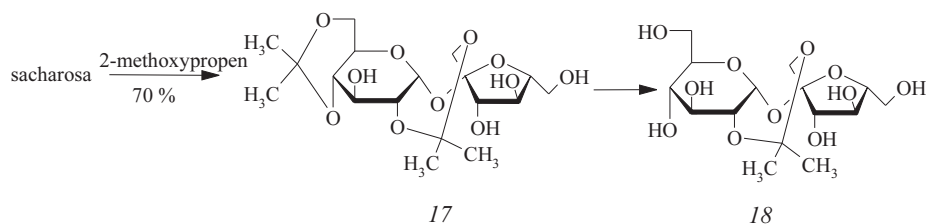


Schéma 12

sacharosu v poloze 2 a/nebo 1', resp. v polohách 3,4,6,3',4' a 6', nabízí diisopropylderivát 17, který lze kontrolovanou hydrolyzou převést na 2,1'-diisopropylderivát 18 ve vysokém výtěžku<sup>87</sup> (schéma 12).

K parciálním modifikacím sacharosy si rychle našly cestu i biokatalyzátory, které mají řadu nepřehlédnutelných výhod: biotransformace probíhají obvykle za mírných podmínek (vodné prostředí, neutrální pH, normální teplota), jsou regio- a stereoselektivní a izolace produktů je snadnější. Velké úsilí bylo a stále je upřeno na využití enzymů jako jsou esterasy nebo lipasy pro přípravu parciálních derivátů sacharosy, ale v tomto případě je selektivita enzymových reakcí často paralelní k selektivitě reakcí chemických, jak ilustruje<sup>88</sup> příprava 6-*O*- a 6'-*O*-acylderivátů sacharosy ve výtěžcích 20–27 %. Jednou z nejvíce studovaných reakcí je oxidace sacharosy pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, která vede<sup>89</sup> ke 3-ketosacharose (19) a vhodně tak zapadá do koncepce naznačené výše. Aby byla taková reakce ekonomicky výhodná ve velkovýrobě, musí<sup>17</sup> být koncentrace sacharosy v médiu nejméně 10–12 %. Bohužel výtěžek oxidace silně závisí na koncentraci sacharosy<sup>89</sup> (60 % pro 5 g.l<sup>-1</sup> a 40 % pro 20 g.l<sup>-1</sup>), proto nelze zatím reálně uvažovat o průmyslové využití. Nicméně některé další reakce 3-ketosacharosy jsou zajímavé; rozkladem v alkalickém prostředí vzniká eliminací endiol 20, který se izoluje jako acetat nebo benzoát v celkovém výtěžku až 30 % na sacharosu (schéma 13) a představuje další typ chirálního synthonu odvozeného od dihydropyranonu.

## 7. Biotransformace na oligosacharidy

Největší pole působnosti zatím našly biotechnologie ve výrobě oligosacharidů, kdy sacharosa může být jak donorem D-glukosy nebo D-fruktosy, tak jejich akceptorem. Leukrosa (5-*O*-( $\alpha$ -D-glukopyranosyl)- $\beta$ -D-fruktopyranosa) se vyrábí fermentací 65 % roztoku obsahujícího 1/3 sacharosy a 2/3 fruk-

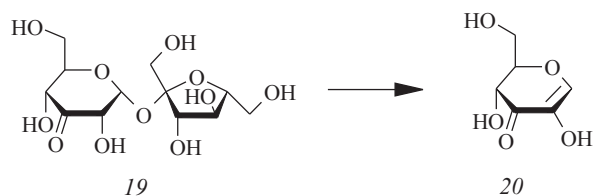


Schéma 13

tosy pomocí dextransacharasy produkované bakterií *Leuconostoc mesenteroides*<sup>90</sup>. Výtěžek je na hranici 90 % a posledním krokem je separace leukrosy od fruktosy na ionoměničích. Produkce leukrosy v roce 1989 byla 10 t (Pfeifer&Langen, SRN). Protože má leukrosa jen asi 50 % sladivosti sacharosy a je dražší, není jako sladidlo příliš perspektivní, i když není kariogenní. Ovšem potenciál jejího dalšího chemického zpracování není zdaleka vyčerpán. Glykosidická vazba  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 5) je hydrolyticky stabilnější a leukrosa má jen dvě primární hydroxylové skupiny, což ji proti sacharose zvyhodňuje.

Velkým úspěchem biotechnologií je výroba isomaltulosy (palatinosa, 6-*O*-( $\alpha$ -D-glukopyranosyl)- $\beta$ -D-fruktufuranosa), která dosáhla 20 000 t v roce 1991 (Südzucker). Na izomerizaci se používají<sup>91,92</sup> imobilizované buňky bakterií *Protaminobacter rubrum*, isomaltulosa se izoluje ve výtěžku asi 80 % krystalizací a vedlejším produktem ve výtěžku ca 10 % je trehalulosa (1-*O*-( $\alpha$ -D-glukopyranosyl)- $\beta$ -D-fruktopyranosa). Isomaltulosa má asi 42 % sladivosti sacharosy, ale sama se jako sladidlo nepoužívá, nýbrž se katalyticky hydrogenuje na směs 6-*O*- $\alpha$ -D-glukopyranosyl-D-glucitolu a 1-*O*- $\alpha$ -D-glukopyranosylmannitolu, která je nízkokalorickým sladidlem s obchodním názvem Isomalt (palatinitol). Není kariogenní a je vhodný pro diabetiky. I isomaltulosa má před sebou velkou perspektivu jako průmyslová surovina. V jednom kroku ji lze převést<sup>93</sup> na  $\alpha$ -glukosyloxymethylfurfural ve výtěžku kolem 70 %, který by mohl být další velkotonážní chemikálií, neboť na něm lze provádět řadu reakcí bez chránění cukerné části.



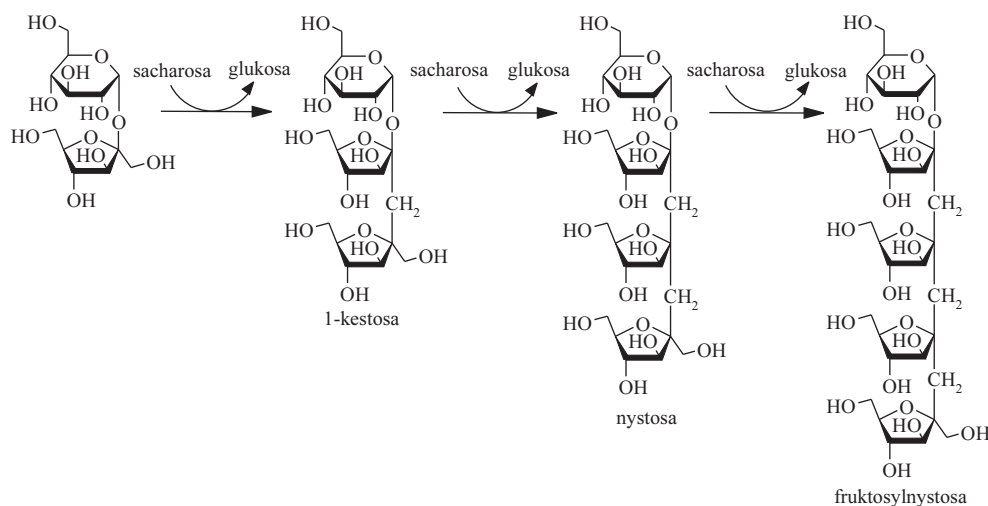


Schéma 14

Za zmínku stojí i snadná oxidace<sup>94</sup> isomaltulose vzduchem v alkalickém prostředí na glukosyl- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-arabinonát s výtěžkem 80–90 %. Jak leukrosa tak isomaltulosa jsou oxidovány<sup>17</sup> pomocí *Agrobacterium tumefaciens* v poloze 3 glukosové části molekuly a to v daleko vyšším výtěžku než sacharosa, což je jejich další výhoda.

Pro transglukosylace se sacharósu jako donorem lze použít různé mikroorganismy i různé akceptory (maltosa, cellobiosa aj.) a produktem jsou lineární dextransy, které mohou být surovinou pro výrobu iontoměníčů nebo komplexačních činidel.

Řada mikroorganismů (*B. subtilis*, *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus salivarius*, *Zymomonas mobilis*, *B. polymyxa*) produkuje fruktosyltransferasy, které přenášejí fruktosovou část sacharósy na sacharósu jako akceptor, přičemž odpadá glukosa jako vedlejší produkt. Průmyslově se vyrábí<sup>95</sup> směs fruktooligosacharidů pod obchodním názvem Actilight (dříve Neosugar, Meiji Seiko Comp., Japonsko) a používá se jako sladidlo (nerozkládá se v žaludku, ale fermentuje se střevními bakteriemi a podporuje tak růst bifidobakterií). Vstupní surovinou je 60% roztok sacharósy, který je fermentován s buňkami *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* nebo *Aspergillus niger* a vyrobí se produkt s obsahem 1-kestosy a nystosy kolem 25 %, D-glukosa tvoří 27 %, sacharósa 13 % a zbytek jsou vyšší oligomery (schéma 14). Actilight se oddělí od glukosy a vyšších oligomerů chromatografií na ionexech.

## 8. Závěr

Přes nemalé finanční prostředky a úsilí řady vědců investované do využití sacharósy jako suroviny pro velkotonážní výroby nelze říci, že by bylo dosaženo zásadního obratu situace. Nicméně se zdá, že trend zaměřený na náhradu fosilních surovin tak, aby byly ze sacharósy získány např. polymery s identickými užitnými vlastnostmi, pomalu ustupuje do pozadí. V současnosti se spíše hledají nové produkty s novými užitnými vlastnostmi, ve kterých by sacharósa vystupovala jako unikátní surovina. Ekonomiku výroby může pozitivně ovlivnit i to, že jako vstupní surovina může figurovat i některý cukrovarnický meziprodukt jako je např. surový cukr.

## Seznam zkratk

Ac	acetyl
Bn	benzyl
Bz	benzoyl
Ph	fenyl
Piv	2,2-dimethylpropionyl (pivaloyl)
Tr	trifenylmethyl (trityl)

*Tato práce je součástí řešení výzkumného záměru MŠMT č. 223300005.*

## LITERATURA

1. Bruhns G.: *Zuckerindustrie* 122, 771 (1997).
2. Aykroyd W. R., v knize: *Sugars in Nutrition* (Sipple H. L., McNutt K. W., ed.), str. 6. Academic Press, New York 1974.
3. Prout W.: *Phil. Trans.* 1, 355 (1827).
4. Charlton W., Haworth W. N., Peat S.: *J. Chem. Soc.* 1926, 89.
5. Haworth W. N., Hirst E. L.: *J. Chem. Soc.* 1926, 1858.
6. Khan R.: *Int. Sugar J.* 96, 12 (1994).
7. Khan R., Jones H. F.: *Sugar Ser.* 9, 367 (1988).
8. James C E., Hough L., Khan R.: *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 55, 117 (1989).
9. Schiwech H., Numir M., Rapp K. M., Schneider B., Vogel M.: *Zuckerindustrie* 115, 555 (1990).
10. Gruber H., Greber G.: *Zuckerindustrie* 115, 476 (1990).
11. Mantovani G., Vaccari G.: *Ind. Sacc. Ital.* 83, 139 (1990).
12. Dobrzycki J.: *Gaz. Cukrov.* 99, 81 (1991).
13. Lichtenthaler F. W.: *Carbohydrates as Organic Raw Materials*. VCH, Weinheim 1991.
14. deWit D., Maat L., Kieboom A. P. G.: *Ind. Crops Prod.* 2, 1 (1993).
15. Descotes E.: *Carbohydrates as Organic Raw Materials II*. VCH, Weinheim 1993.
16. Khan R.: *Sucrose* 1995, 264.
17. Buchholz K.: *Zuckerindustrie* 120, 692 (1995).
18. Mathlouthi M., Reiser P.: *Sucrose: Properties and Applications*. Blackie & Professional, London 1995.
19. Monsan P.: *Zuckerindustrie* 120, 705 (1995).

20. Van Bekkum H., Roeper H., Voragen F.: *Carbohydrates as Organic Raw Materials III*. VCH, Weinheim 1996.
21. Jarosz S.: Pol. J. Chem. 70, 972 (1996).
22. Lichtenthaler F. W., Mondel S.: Pure Appl. Chem. 69, 1853 (1997).
23. Moiseev Yu. V., Khalturinskij N. A., Zaikov G. E.: Carbohydr. Res. 51, 23 (1976).
24. Asakawa T., Asano S. (Japan Organo Co.): JP 09308500 (1997); Chem. Abstr. 128, 76799 (1998).
25. Sinha C., Gehlawat J. K.: Indian J. Chem. Technol. 2, 171 (1995).
26. Godbole S. S., Kubal B. S., D'Souza S. F.: Enzyme Microbiol. Technol. 12, 214 (1990).
27. Krastanov A.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 476 (1997).
28. Vygovskaya E. L., El'chits S. V.: Pishch. Prom-st. 37, 102 (1991).
29. Garncarek Z., Garncarek B.: Pr. Nauk. Akad. Ekon. im. Oskara Langego Wroclawiu 605, 7 (1991); Chem. Abstr. 117, 88675 (1992).
30. Miyazawa F., Yoshihiro Y., Kida M., Yoshikawa T.: JP 02023869 (1990); Chem. Abstr., 113, 227141 (1990).
31. Zarin P. Ya., Ozola V. A., Kharald V.: SU 1824451 (1993); Chem. Abstr. 124, 149142 (1996).
32. Nakanishi N., Yokozuka K.: JP 04117297 (1992); Chem. Abstr. 117, 110146 (1998).
33. DeOliveira L., Antonio C., Ferreira C. M., Nakamura L. M. K., Ferreira V. F.: BR 9602893 (1987); Chem. Abstr. 108, 188787 (1988).
34. Rearick D. E., Olmstead L. J.: Proc. Sugar Process. Res. Conf. 1992, 1993, 97; Chem. Abstr. 119, 141490 (1993).
35. Kulhanek M., Tadra M.: CS 244023 (1987); Chem. Abstr. 110, 58001 (1989).
36. Reinefeld E.: Zuckerindustrie 12, 1049 (1987).
37. Kim W. K., Chun U. H., Young M., Kim C. H., Choi E. S., Rhee S. K.: Process Biochem. 29, 277 (1994).
38. Rehr B., Sahm H.: DE 4017103 (1991); Chem. Abstr. 116, 104489 (1992).
39. Heikkila H., Hyoky G., Niittymaki P., Viljava T., Myohanen T.: WO 9207097 (1992); Chem. Abstr. 117, 29136 (1992).
40. Dorta A., Dhingra Y. R., Pynnonen B. W.: US 5176832 (1993); Chem. Abstr. 118, 235560 (1993).
41. Saska M., Clarke S. J., Wu M. D., Iqbal K.: Int. Sugar J. 93, 223 (1991).
42. Strube J., Haumreisser S., Schmidt-Traub H., Schulte M., Ditz R.: Org. Process Res. Dev. 2, 305 (1998).
43. Gallezot P.: Catal. Today 37, 405 (1997).
44. Asakura A., Hoshino T., Masuda S., Setoguchi Y.: WO 9218637 (1992); Chem. Abstr. 118, 5761 (1993).
45. Quirasco-Baruch M., Iturbe-Chinas F., Novak M. F., Lopez-Munguia A.: Rev. Latinoam. Microbiol. 35, 273 (1993); Chem. Abstr. 121, 228885 (1997).
46. Rosenberg M., Svitel J., Rosenbergoval I., Sturdik E.: Acta Biotechnol. 12, 311 (1992).
47. Jokic M. M., Ristic N., Kotorcevic M., Simovic D., Lacnjevac C., Jaksic M. M.: Hem. Ind. 50, 414 (1996); Chem. Abstr. 126, 104320 (1996).
48. Elseviers M., Lemmens H. O. J., Coomans S. M. J., Roper H. W. W.: EP 820979 (1998); Chem. Abstr. 128, 140962 (1998).
49. Rapp K. M.: US 4,740,605 (1988); Chem. Abstr. 107, 154231 (1987).
50. Martin T.: DE 19319075 (1997); Chem. Abstr. 128, 24278 (1998).
51. Rosenberg M., Kristofikova L., Richardson G. N., Shafizadeh F. D.: Aust. J. Chem. 31, 1825 (1978).
52. Kamy H., Kita H., Nobutaka T.: JP 02306988 (1990); Chem. Abstr. 114, 185924 (1991).
53. von Rybinski W., Hill K.: Angew. Chem. Int. Ed. 37, 1328 (1998).
54. Defaye J., Wong E., Pedersen C.: FR 2,567,891 (1986); Chem. Abstr. 105, 227221 (1986).
55. Bouchu A., Chedin J., Defay J., Lafont D., Wong E.: FR 2,599,040 (1987); Chem. Abstr. 109, 95053 (1988).
56. Badel A., Descotes G., Mentech J.: Carbohydr. Res. 205, 323 (1990).
57. Fechter M. H., Stutz A. E.: J. Carbohydr. Chem. 16, 1293 (1997).
58. Leupold E. I., Schoenwaelder K. H., Fritsche-Lang W., Schlingmann M., Linkies A. H., Gohla W., Dany F. J.: DE 3900677 (1990); Chem. Abstr. 113, 214316 (1990).
59. Rosenberg M., Kristofikova L.: SK 278555 (1997); Chem. Abstr. 129, 342744 (1998).
60. Dominguez J. M., Cao N., Gong C. S., Tsao G. T.: Polym. Prep. 39, 282 (1998).
61. Du J., Cao N., Gong C. S., Tsao G. T.: Appl. Biochem. Biotechnol. 70–72, 323 (1998).
62. Reinefeld E.: Zuckerindustrie 12, 1049 (1987).
63. Akutsu F., Inoki M., Uei H., Sueyoshi M., Kasashima Y., Naruchi K., Yamaguchi Y., Sunahara M.: Polym. J. 30, 421 (1998).
64. Koyanagi K., Shibamoto M., Sumihiro Y., Fukushima T., Hashimoto N., Sakai T.: JP 10231358 (1998); Chem. Abstr. 129, 189815 (1998).
65. Sumihiro Y., Yukihiro S., Tadamoto K., Kunihiro F., Takeshi Y., Sakai T., Koyanagi K., Fukushima T., Hashimoto N.: JP 10101783 (1998); Chem. Abstr. 128, 295217 (1998).
66. Kuyama H., Ota M.: JP 09296102 (1997); Chem. Abstr. 128, 35509 (1998).
67. Kobayashi D., Tsubuku S., Yamanaka H., Asano M., Miujima M., Yoshida M.: Drug. Dev. Ind. Pharm. 24, 819 (1998).
68. Wang N., Wu X. S.: J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 9, 75 (1997).
69. Naganushi Y., Imanashi Y., Nagato Y., Takada S., Sato K.: JP 10130153 (1998); Chem. Abstr. 129, 12737 (1998).
70. Ingram L. O., Gomez P. F., Lai X., Monirurraman M., Wood B. E., Yoomano L. P., York S. W.: Biotechnol. Bioeng. 58, 204 (1998).
71. Cameselle C., Bohlmann J. T., Nunez M. J., Lema J. M.: Bioprocess Eng. 19, 247 (1998).
72. Andrews M. A., Klaeren S. A., Gould G. L., v knize: *Carbohydrates as Organic Raw Materials II* (Descotes E., ed.) VCH, Weinheim 1993.
73. Woodward J., Orr M.: Biotechnol. Prog. 14, 897 (1998).
74. Ardizzone S., Petrillo M., Antonacci C. M., Porro G. B.: Aliment. Pharmacol. Ther. 10, 957 (1996).
75. Reynolds R. C., Chappel C. I.: Food Chem. Toxicol. 36, 81 (1998).

76. Keller G., Kuester J.: DE 19619216 (1997); Chem. Abstr. 128, 23631 (1998).
77. Parker W. J., Khan R. A., Mufti K. S.: GB 1,399,053 (1973); Chem. Abstr. 82, 100608 (1975).
78. Tutin K.K.: US 5710239 (1998); Chem. Abstr. 128, 115406 (1998).
79. Fairclough P. H., Hough L., Richardson A. C.: Carbohydr. Res. 40, 285 (1975).
80. Hough L.: GB 1543168 (1979); Chem. Abstr. 91, 193577 (1979).
81. Khan R. A., Sankey G. H., Simpson P. J., Vernon N. M.: EP 260979 (1988); Chem. Abstr. 113, 152966 (1990).
82. Simpson P. J.: US 4889928 (1989); Chem. Abstr. 113, 6739 (1990).
83. Jones J. D., Hacking A. J., Cheetham P. S. J.: Biotechnol. Bioeng. 39, 203 (1992).
84. Reinefeld E., Heincke K. D.: Chem. Ber. 104, 265 (1971).
85. Lichtenthaler F. W., Himmel S., Martin D., Müller V., v knize: *Carbohydrates as Organic Raw Materials II* (Descotes E., ed.), str. 59. VCH, Weinheim 1993.
86. Chin A. K. B., Hough L., Richardson A. C., Toufeili I. A., Dziedzic S. Z.: Carbohydr. Res. 162, 316 (1987).
87. Fanton E.: J. Org. Chem. 46, 4057 (1981).
88. Sarney D. B., Barnard M. J., MacManus D. A., Vulson E. N.: J. Am. Oil Chem. Soc. 73, 1481 (1996).
89. Stoppok E., Matalla K., Buchholz K.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 604 (1992).
90. Schwengers D., Benecke H.: EP 185 302 (1985); Chem. Abstr. 105, 77815 (1986).
91. Kunz M., v knize: *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, sv. 25A, str. 426. VCH, Weinheim 1994.
92. Bucke C., Cheetham P. S. J.: GB 2063268 (1980); Chem. Abstr. 95, 95468 (1981).
93. Lichtenthaler F. W., Martin D., Weber T. A., Schiweck H. M.: EP 426.176 (1990); Chem. Abstr. 115, 92826 (1991).
94. Röger H., Puke H., Kunz M.: Zuckerindustrie 115, 174 (1990).
95. Fuji S., Komoto K.: Zuckerindustrie 116, 197 (1991).

**J. Moravcová** (*Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Sucrose as Raw Material**

The potential of sucrose as a raw material obtained from renewable resources is discussed in terms of its degradation to compounds with a lower number of carbon atoms, modification of all hydroxy groups, synthesis of polymers, other chemical transformations of sucrose, and the enzymatic oligosaccharide synthesis.

# ROSTLINNÉ CYTOCHROMY P450 A PEROXIDASY A JEJICH ÚLOHA PŘI DEGRADACI KONTAMINANTŮ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

LUDMILA CHROMÁ<sup>a</sup>, MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>,  
TOMÁŠ MACEK<sup>b</sup>, VÁCLAV MARTÍNEK<sup>c</sup>  
a MARIE STIBOROVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>c</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

Došlo dne 8.VI.2000

Klíčová slova: cytochrom P450, peroxidasa, metabolismus xenobiotik v rostlinách, fytoremediace, polutanty

## Obsah

1. Úvod
2. Přeměna xenobiotik v rostlinách
  - 2.1. Enzymy první fáze biotransformace xenobiotik
    - 2.1.1. Cytochromy P450
      - 2.1.1.1. Mechanismus katalýzy cytochromy P450
      - 2.1.1.2. Detoxikační reakce cytochromu P450
    - 2.1.2. Peroxidasy
      - 2.1.2.1. Mechanismus katalýzy peroxidasami
        - 2.1.2.1.1. Reakce katalyzované peroxidasami využívající  $H_2O_2$  v nepřítomnosti  $O_2$ , využívající  $O_2$  a využívající  $H_2O_2$  i  $O_2$
  - 2.2. Význam cytochromů P450 a peroxidas v oxidaci xenobiotik v rostlinách
3. Závěr

## 1. Úvod

S rozvojem technologických procesů se do životního prostředí začaly dostávat a postupně se v něm i hromadit cizorodé látky (xenobiotika), se kterými se organismy dříve nesetkaly. Jde o sloučeniny cíleně produkované a využívané v průmyslu nebo zemědělství. Na zdravotní stav organismů, včetně člověka, však nemají vždy pozitivní vliv. V tomto směru jsou největším problémem sloučeniny, které jsou pro organismy potenciálně toxické, a dále ty, které se v prostředí bioakumulují.

Řada xenobiotik (např. ropné deriváty, polycyklické aromatické uhlovodíky, halogenované uhlovodíky) nachází, vzhledem ke svým fyzikálním a chemickým vlastnostem, široké uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích. Naneštěstí však byly tyto látky donedávna používány bez podstatných

znalostí o jejich vlastnostech a chování v životním prostředí, nebyl kontrolován ani jejich únik do prostředí ani jejich působení na živé i neživé složky životního prostředí<sup>1</sup>. Dnes tyto látky v řadě případů představují, díky vysoké toxicitě a perzistenci, závažný problém pro přírodu a jejich odstranění je z mnoha hledisek velmi náročné.

V minulosti již byly navrženy specifické technologie, které by měly takové látky z životního prostředí odstraňovat. Klasické fyzikálně-chemické metody jsou většinou ekonomicky nákladné. Snahou je proto využívat nejen postupy levnější, ale pro životní prostředí i přirozenější a šetrnější, jako jsou biologické dekontaminace prostředí pomocí mikroorganismů či rostlin. Ty jsou v současnosti označovány jako bioremediace. Pro využití zelených rostlin k odstranění, zneškodnění nebo zadržení kontaminantů životního prostředí se užívá speciálnější označení – fytoremediace<sup>2,91</sup>. Vedle praktického využívání jsou uvedené procesy předmětem zájmu i teoretických oborů. Jde především o poznání chemismu dekontaminace a poznání enzymů, které jsou v mikroorganismech a rostlinách za metabolismus xenobiotik zodpovědné. Znalost enzymů přeměňujících xenobiotika je pro jejich efektivní odstranění stěžejní, neboť může posloužit k výběru organismů, v nichž jsou právě takové nejefektivnější enzymové systémy hojně zastoupeny. Zatímco u mikroorganismů jsou metabolické cesty odbourávání řady xenobiotik dobře prozkoumány, u rostlin jsou informace o přeměně cizorodých látek stále dosud nedostačující.

Rostlinná buňka obsahuje pestrou škálu enzymů, které jsou potenciálně schopné metabolizovat xenobiotika. Je tomu tak proto, že v rostlinných buňkách je syntetizována řada sloučenin složitých struktur v mnohých směrech podobných strukturám látek cizorodých.

## 2. Přeměna xenobiotik v rostlinách

Za biotransformaci xenobiotik jsou označovány procesy, které by měly vést k jejich snadnému vyloučení nebo potlačení jejich negativního působení v organismech. Je členěna na dva základní směry. V případě, že biotransformačními reakcemi dochází ke snížení toxicity sloučenin, je označována jako detoxikace. Jestliže však dochází k reakcím, které vedou ke zvýšení toxického účinku cizorodé látky, je biotransformace označována jako aktivace xenobiotik. Jde zejména o metabolickou aktivaci nemutagenních látek (promutagenů) na mutagenní produkty. Tato oblast není v tomto přehledu zahrnuta. Zájemce najde podrobné informace v přehledném článku<sup>92</sup>.

Biotransformace xenobiotik v živočišných organismech probíhá ve dvou fázích. V první fázi dochází k zabudování funkčních reaktivních skupin do skeletu lipofilního xenobiotika, či demaskování funkčních skupin již v molekule xenobiotika přítomných. Proto je někdy tato fáze nazývána funkcionalizační nebo derivatizační. Tím se zvyšuje polarita sloučeniny a možnost pro následnou konjugaci (2. fáze biotransformace). Převážná většina reakcí první fáze probíhá oxidačně (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace,

dealkylace, deaminace, desulfurace a další). Nicméně některé reakce probíhají i redukčním mechanismem (nitro, azoredukce) nebo hydrolyticky. Druhá fáze biotransformace je označovaná jako konjugací, neboť při ní dochází k navázání (konjugaci) endogenních molekul (glukuronátu, sulfátu z aktivního sulfátu, glutathionu, cysteinu, glycinu apod.) na reaktivní funkční skupiny metabolitů zavedených do molekuly xenobiotika v první fázi biotransformace. Těmito reakcemi se ještě více zvýší polarita molekuly původně hydrofobní povahy a usnadní se tím její eliminace z buněk a exkrece z organismu močí a výkaly.

V metabolismu cizorodých látek v rostlinách nacházíme několik odlišností od procesů, které probíhají v organismech živočišných. Přeměna cizorodých látek rostlinami může být (na rozdíl od živočichů) členěna do tří fází<sup>3</sup>, neboť zde nedochází ke skutečnému, efektivnímu vylučování metabolitů xenobiotik. 1. fáze (rovněž označovaná jako derivatizační) zahrnuje opět enzymově katalyzované zavedení (či odkrytí) polárních skupin molekuly xenobiotika. U toxických sloučenin vedou reakce této fáze (podobně jako u živočichů) většinou ke tvorbě detoxikačních metabolitů. V řadě případů však dochází, jak již bylo výše uvedeno, i k aktivaci xenobiotik za tvorby toxičtějších produktů.

Jestliže již cizorodá látka obsahuje vhodnou funkční skupinu, její biotransformace v rostlinách probíhá reakcemi druhé fáze. Ta je v případě rostlin označována přesněji jako primární konjugace. Polárnější metabolity jsou spojovány kovalentní vazbou s molekulami endogenních hydrofilních sloučenin jako jsou např. některé sacharidy, aminokyseliny nebo glutathion. V případě toxických sloučenin jejich toxicita reakcemi této fáze výrazně klesá. Konjugáty jsou pak v rostlinách ukládány v některých částech buňky. Úložným místem pro rozpuštěné konjugáty jsou vakuoly. Některé produkty konjugací fáze procházejí ještě fází další, označovanou za 3. fázi biotransformace (nebo také za sekundární konjugaci), reakcemi s některými složkami buněčné stěny – s ligniny, pektiny, hemicelulosami. Uložení produktů vzniklých v druhé fázi ve vakuole předchází transport konjugátů přes membránu vakuoly. Bylo zjištěno, že podobně jako u živočichů se i v rostlinných buňkách vyskytuje ATP-dependentní membránový přenašeč, který se v rostlinách využívá právě pro transport do vakuol. Uvedený přenašeč konkrétně zprostředkovává přenos konjugátů glutathionu vznikajících v cytoplazmě do vnitřního prostoru vakuol. Přenašeč je v rostlinách lokalizován přímo v membráně tonoplastu. Podobá se savčímu membránovému přenašeči svojí citlivostí k vanadu a dalším inhibitorům.

Vakuolární pumpa je specifická pro glutathionové konjugáty, včetně oxidovaného glutathionu, glutathion (v redukováném stavu) nebo cysteinové konjugáty transportovány nejsou<sup>4</sup>. Mechanismus přenosu není jasný. Pravděpodobně jsou dva modely – model pumpy (transmembránové proteiny tvoří pór, kterým mohou procházet hydrofilní substráty) a model „flip-flop“, při kterém se substrát váže na vnější část membrány a překlopením se dostane do vakuoly<sup>5</sup>. Komplexy glutathionu uložené ve vakuole mohou podléhat další úpravě, při níž se uplatňují především hydrolytické enzymy. Jejich produkty se poté většinou ukládají v buněčné stěně. Poločas rozpadu glutathionových konjugátů ve vakuole závisí na struktuře molekuly původního xenobiotika<sup>3</sup>.

Pro konjugací reakce xenobiotik v rostlinách svědčí nález některých konjugátů. Byly např. izolovány *O*- $\beta$ -glukosylové

a (*O*-malonyl)-*O*- $\beta$ -D-glukosylové konjugáty herbicidu pentachlorofenolu či *N*-malonylové a *N*-glukosylové konjugáty dalších xenobiotik 4-chloranilinu a 3,4-dichloranilinu<sup>4</sup>. Rovněž enzymy odpovědné za tvorbu těchto konjugátů byly v rostlinných tělech prokázány, konkrétně v extraktech přípravných ze soji a pšenice.

V rostlinných buňkách se podařilo identifikovat určité enzymy obdobné těm, které se v savčích játrech účastní detoxifikačního procesu. Z enzymů participujících na 1. fázi biotransformace jsou to hlavně systémy monooxygenas (oxidas) se smíšenou funkcí s cytochromem P450 jako terminální oxidasou a popřípadě peroxidasy. Z konjugací enzymů jsou podobné živočišnému enzymu rostlinné glutathiontransferasy<sup>6</sup> a eventuálně sulfotransferasy a *N*-acetyltransferasy. Naopak *O*-glukosyl- a *O*-malonyltransferasy, ale také *N*-glukosyl- a *N*-malonyltransferasy se specifitou např. k chlorovaným xenobiotikům<sup>4</sup>, dále pak *O*- a *N*-glykosyltransferasy, jsou specifické pro rostliny.

Nedávné studie prokázaly, že v rostlinách jsou enzymy biotransformující xenobiotika přítomny v mnoha izoenzymových formách, které jsou úžeji substrátově specifické než je tomu u většiny obdobných enzymů živočišných, včetně specifity k určité poloze v molekule substrátu a stereochemii funkčních skupin. Tyto studie víceméně vyvrátily dřívější předpoklady, že xenobiotika jsou v rostlinách metabolizována díky široké substrátové specifitě enzymů sekundárního metabolismu<sup>3</sup>.

Studium specifity rostlinných enzymů, jejich molekulových hmotností, izoelektrického bodu a charakterizace jejich cDNA, prokázalo příbuznost některých skupin rostlinných enzymů účastnících se metabolismu cizorodých látek s enzymy, které plní tutéž funkci v organismu mikrobiálním i savčím<sup>7,8</sup>. I když evoluční příbuznost je zřejmá, mechanismus a působení selekčního tlaku, který přispěl k evoluci těchto enzymů v rostlinách, je zatím neznámý. Účast uvedených rostlinných enzymů na přeměně cizorodých látek je o to podivuhodnější, když si uvědomíme, že xenobiotika se do přírody dostala až v tomto století.

## 2.1. Enzymy první fáze biotransformace xenobiotik

Biotransformačních reakcí první fáze metabolismu xenobiotik rostlinami se účastní několik enzymových systémů. Z minoritně působících enzymů je třeba zmínit fenoloxidasy (lakasy) oxidující fenoly a polyfenoly a tyrosinasy. Flavinové monooxygenasy, které participují na oxidaci xenobiotik v živočišných organismech a plísních<sup>9</sup>, v rostlinách doposud nalezeny nebyly. Podstatnou úlohu při metabolismu xenobiotik v rostlinách hrají monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO – mixed function oxidases) s cytochromy P450 jako terminální oxidasou a dále pak peroxidasy. Proto se v další části práce věnujeme těmto dvěma typům enzymů.

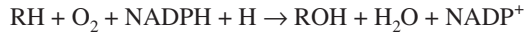
### 2.1.1. Cytochromy P450

Mikrosomální monooxygenasový systém je systém enzymů vázaných v membráně hladkého endoplazmatického retikula. Jako terminální oxidasu obsahuje hemoprotein cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) (cit.<sup>10</sup>). Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v proteinové molekule enzymu vázán hydro-

fobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX). Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování uvedených hemoproteinů a odlišuje je od hemoproteinů ostatních (odlišné spektrální a katalytické vlastnosti)<sup>11–13</sup>. Šestáým ligandem je atom kyslíku molekuly vody.

#### 2.1.1.1. Mechanismus katalýzy cytochromu P450

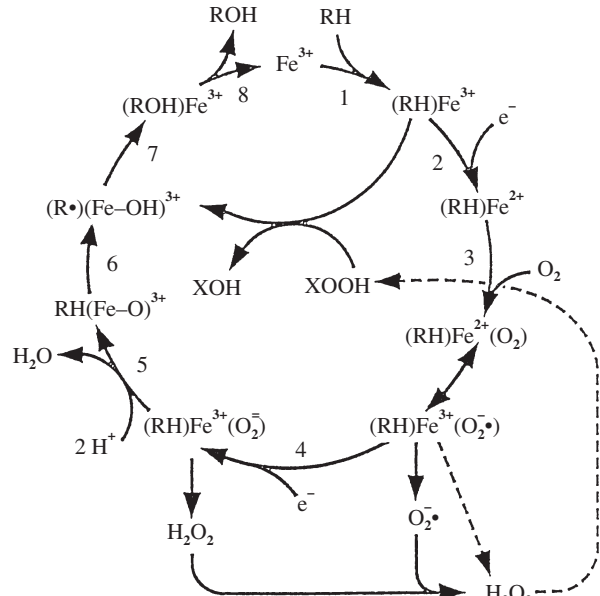
Cytochrom P450 spolupůsobí s dalším enzymem lokalizovaným v endoplazmatickém retikulu – NADPH:cytochrom P450 reduktasou – nebo dalšími enzymy mitochondrií. Většina reakcí, které lze sumárně vyjádřit jako



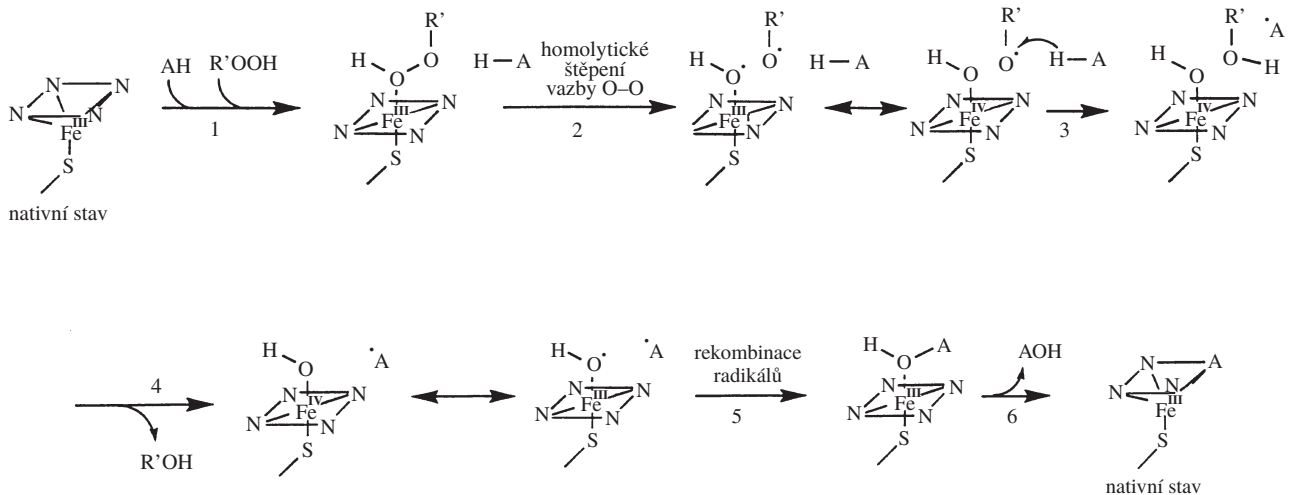
začíná přenosem elektronů z NADPH buď na NADPH:cytochrom P450 reduktasu v endoplazmatickém retikulu (kde je MFO systém lokalizován) nebo na ferredoxin reduktasu a nehemový Fe–S protein v mitochondriích, a poté na vlastní cytochromy P450. Redukovaný cytochrom P450 pak aktivuje molekulu kyslíku, z níž jeden atom je inkorporován do molekuly substrátu a druhý tvoří molekulu vody. Schéma reakčního cyklu cytochromu P450 je uvedeno na obrázku 1. Reakční sled pravděpodobně sestává alespoň z osmi kroků. Nejprve se váže substrát na ferri formu cytochromu P450 (reakce 1), přičemž se mění konformace molekuly enzymu (Fe v hemu se z formy hexakoordinované dostává do formy pentakoordinované). Poté dochází k přenosu elektronu z NADPH:cytochrom P450 reduktasy a Fe<sup>3+</sup> cytochromu P450 je redukováno na Fe<sup>2+</sup> (reakce 2). Na ion železa této formy enzymu se pak váže biatomická molekula kyslíku (ale též jiné ligandy, např. CO), za tvorby ternárního komplexu cytochrom P450–O<sub>2</sub>–substrát (reakce 3). Ternární komplex přechází do jiného mezomerního stavu, na ferri-superoxidový komplex, který je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou (nebo jiným enzymem NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou), za vzniku ferro-superoxidového

komplexu (reakce 4). Posledně jmenovaná reakce je finálním stupněm tzv. aktivační fáze reakčního cyklu cytochromu P450. Následně je štěpena biatomická molekula kyslíku, přičemž jeden atom kyslíku je redukován na vodu a druhý zůstane vázán na iontu Fe v hemu ve formě ferrioxenového komplexu (reakce 5). V dalším kroku dochází k odštěpení vodíkového atomu z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na ion železa hemu (reakce 6). Po reakci radikálů se uvolňuje hydroxylovaná molekula substrátu a nativní forma cytochromu P450 (obr. 1).

Vedle kyslíku může cytochrom P450 pro oxidativní reakce

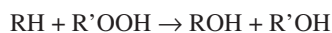


Obr. 1. Reakční cyklus cytochromu P450 (upraveno podle cit.<sup>14</sup>); RH – substrát, ROH – monoxygenní produkt, XOOH – peroxy-sloučenina (alternativní donor kyslíku), Fe – atom hemového železa enzymu



Obr. 2. Pravděpodobný mechanismus peroxidase aktivity cytochromu P450; R'OOH – organický peroxid nebo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AH – substrát, R'OH – alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu nebo voda vzniklá redukcí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AOH – oxidovaná molekula substrátu

využívat peroxidy a peroxikyseliny. Ty se stávají donorem atomu kyslíku. Podobně mohou reagovat i hydroperoxidy vzniklé peroxidací lipidů, např. hydroperoxid kyseliny lino-*leové*. Běžně používaným substrátem cytochromu P450 je kumoylhydroperoxid, v jehož přítomnosti dochází např. k *N*-demethylačním reakcím. Podobná stereochemie i regioselektivita NADPH-dependentní a hydroperoxid-dependentní oxidace katalyzované cytochromy P450 naznačuje, že aktivovaná forma enzymu je u obou mechanismů stejná<sup>14</sup> (obr. 1). Sumární rovnice peroxidasové aktivity cytochromů P450 je potom následující:



kde RH je substrát, R'OOH je hydroperoxid, ROH hydroxylovaný produkt reakce a R'OH alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu. Předpokládaný mechanismus peroxidasové aktivity cytochromu P450 je podrobněji zobrazen na obrázku 2. Nejprve se na nativní cytochrom P450 váže hydroperoxid a oxidovaný substrát (reakce 1). Následně dochází k homolytickému štěpení vazby O–O v hydroperoxidu, za vzniku hydroxylového radikálu (který je vázán na Fe hemu) a příslušného alkoxylového radikálu (reakce 2). Tento alkoxylový radikál odštěpí atom vodíku z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu (reakce 3). Redukovaný hydroperoxid se uvolní z enzymu (reakce 4). Hydroxylový radikál a radikál substrátu spolu reagují za vzniku hydroxylovaného substrátu (reakce 5), který se uvolní a cytochrom P450 se vrátí do nativního stavu (reakce 6) (cit.<sup>15</sup>).

Reakce s organickými hydroperoxidy probíhá, na rozdíl od reakce v přítomnosti NADPH a O<sub>2</sub>, neuspořádaným mechanismem, takže vazba peroxidu není závislá na vazbě substrátu. Některé hydroperoxidy mohou dokonce sloužit jako redukovatelné i oxidovatelné substráty. Účinnost oxidace organických substrátů peroxidasovou aktivitou cytochromu P450 je obvykle nižší než reakce za přítomnosti NADPH a O<sub>2</sub>, a to především z důvodů významné destrukce enzymu. Bylo např. zjištěno, že inaktivace cytochromu P450 působením H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebo kumoylhydroperoxidu je způsobena degradací hemu na reaktivní fragmenty. Tyto fragmenty se pak mohou kovalentně vázat do aktivního centra enzymu, a tak jej ireverzibilně inaktivovat<sup>16</sup>.

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (izoenzymech, izoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry (stupně) homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou P450. Následuje velké písmeno označující podrodinu<sup>17</sup>. Jednotlivé isoenzymy jsou pak označeny číslem za písmenem podrodiny. Např. isoenzym P450 1A2 je členem podrodiny A náležející do enzymové rodiny 1. Do stejné rodiny náleží cytochromy P450, u kterých byla nalezena více než 40 % homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii více než 60 % (cit.<sup>18</sup>). Pro zjednodušení Nebert a spolupracovníci navrhli nové systematické názvosloví genů a forem P450 (cit.<sup>19</sup>), ve kterém se formy P450 označují zkratkou CYP (CYtochrom P450), za níž pak následují označení rodin a podrodin podle výše uvedených kritérií. Výsledné označení příslušného enzymu je pak např. pro cytochrom P450 1A2 zkracováno na CYP1A2. Označení rostlinných cytochromů P450 je obdobné.

Vedle CYP51 jsou rostlinné cytochromy P450 řazeny do rodin CYP71 až CYP97 (tab. I). Za číslo rodiny jsou opět řazena písmena podrodin a číslo určitého enzymu podrodiny.

Cytochromy P450 byly nalezeny v mnoha rostlinách, a lze předpokládat, že alespoň některé z nich jsou přítomné prakticky ve všech rostlinných druzích (např. CYP51 katalyzující biosyntézu sterolů)<sup>20,21</sup>. Stále více příkladů také ukazuje, že se cytochromy P450 v rostlinách vyskytují v mnoha formách (izoenzymech), není však doposud známo, zda jejich multiplacita je tak vysoká jako v živočišných tkáních. Dodnes rovněž není přesně známo, zda mají cytochromy P450 rostlin tak širokou substrátovou specifitu jako enzymy živočišné. Jak již bylo výše zmíněno, v současnosti se řada laboratoří spíše přiklání k názoru o výskytu mnoha isoenzymů cytochromů s poměrně vyhraněnou substrátovou specifitou. Ale ani toto tvrzení není konečné, neboť rostlinné cytochromy P450 nejsou ještě z hlediska substrátové specifity dostatečně prozkoumány. Navíc, zdaleka ne všechny dosud známé isoenzymy byly také z rostlin izolovány a kineticky charakterizovány. Identifikace genů rostlinných cytochromů P450 a poznání biochemických funkcí těchto enzymů je v současnosti centrem pozornosti většiny výzkumů týkajících se rostlinných cytochromů P450. Ironií těchto výzkumů je však skutečnost, že většina genů cytochromů P450 nebyla ještě klonována a navíc, i v případě těch genů, které již klonovány byly, nebyla dosud určena přirozená funkce příslušného enzymu *in vivo* (tab. I) (cit.<sup>22</sup>).

#### 2.1.1.2. Detoxikační reakce cytochromu P450

Ekonomicky významnou funkcí rostlinných cytochromů P450, která je pouze částečně vysvětlena, je jejich úloha v detoxikaci herbicidů<sup>23–27</sup>. Selektivní aktivita cytochromů P450 vysvětluje selektivitu herbicidů u různých rostlinných druhů. Výbava jednotlivých rostlinných druhů specifickými cytochromy P450 umožňuje u jednoho druhu rostlin herbicidy detoxikovat, zatímco u druhých zůstávají buď ve formě původní nebo se metabolizují na dokonce biologicky aktivnější formu.

Velké množství rostlinných cytochromů P450 participuje na biosyntetických reakcích sekundárních rostlinných metabolitů jako jsou terpeny, alkaloidy, ligniny, fytosteroly, fytolalexiny, pigmenty, gibereliny a eventuálně i dalších<sup>22,28–31</sup>. V poslední době byla také prokázána katalytická aktivita různých cytochromů P450 v metabolismu xenobiotik. V řadě případů byla účast rostlinných cytochromů P450 na oxidaci xenobiotik prokázána pouze nepřímou, s využitím mikrosomální frakce připravené z rostlinných pletiv a inhibitorů uvedených enzymů<sup>23,24,29,32,33</sup>. Činit závěry pouze z takových experimentů je však poněkud nepřesné. Rostlinné mikrosomy obsahují totiž vedle cytochromů P450 ještě další enzymy, konkrétně peroxidasy, které mohou být za oxidaci xenobiotik také zodpovědné<sup>25,34–36</sup>.

Přeměna xenobiotik purifikovanými cytochromy P450 v rekonstituovaném systému s NADPH:cytochrom P450 reduktasou (EC 1.6.2.4.) byla prokázána pouze v několika případech. Cytochrom P450 izolovaný z avokáda, za přítomnosti NADPH:cytochrom P450 reduktasy, katalyzoval oxidaci (*N*-demethylaci) xenobiotika 4-chloro-*N*-methylanilinu<sup>37</sup>. Rychlost demethylace však byla řádově vyšší za katalýzy peroxidasovou aktivitou tohoto enzymu s kumoylperoxidem jako kosubstrátem, než v rekonstituovaném systému s reduktasou. Demethylace tohoto substrátu byla také měřena v kvasinkách transfor-

Tabulka I  
Klonované geny rostlinných cytochromů P450

Rodina/podrodina cytochromu P450	Název enzymu	Rostlinný druh
CYP51	obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylasa	<i>Sorghum bicolor</i>
CYP71A1	<sup>a</sup>	<i>Persea americana</i>
CYP71A2	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP71A3	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP71A4	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP71A5	<sup>a</sup>	<i>Nepeta racemosa</i>
CYP71A6	<sup>a</sup>	<i>Nepeta racemosa</i>
CYP71B1	<sup>a</sup>	<i>Thlaspi arvense</i>
CYP71B7	<sup>a</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP71C1	HBOA- <i>N</i> -synthasa <sup>b</sup>	<i>Zea mays</i>
CYP71C2	2-OI hydroxylasa <sup>c</sup>	<i>Zea mays</i>
CYP71C3	HBOA- <i>N</i> -hydroxylasa	<i>Zea mays</i>
CYP71C4	2-OI hydroxylasa	<i>Zea mays</i>
CYP71D6	<sup>a</sup>	<i>Solanum chacoense</i>
CYP71D7	<sup>a</sup>	<i>Solanum chacoense</i>
CYP72A1	<sup>a</sup>	<i>Catharanthus roseus</i>
CYP73A1	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Helianthus tuberosus</i>
CYP73A2	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Phaseolus aureus</i>
CYP73A3	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Medicago sativa</i>
CYP73A4	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Catharanthus roseus</i>
CYP73A5	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP73A9	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Pisum sativum</i>
CYP73A10	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Petroselinum crispum</i>
CYP73A12	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Zinia elegans</i>
CYP73A13	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Populus tremuloides</i>
CYP73A16	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Populus kitakamiensis</i>
CYP73A?	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Populus kitakamiensis</i>
CYP73A?	cinnamát 4-hydroxylasa	<i>Populus kitakamiensis</i>
CYP74A1	allenoxid synthasa	<i>Linum usitatissimum</i>
CYP74A2	„rubber particle protein“	<i>Parthenium argentatum</i>
CYP74A3	allenoxid synthasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP74B	lyasa hydroperoxidu mastných kyselin	<i>Capsicum annuum</i>
CYP75A1	flavonoid 3'5'-hydroxylasa	<i>Petunia hybrida</i>
CYP75A2	flavonoid 3'5'-hydroxylasa	<i>Solanum melongena</i>
CYP75A3	flavonoid 3'5'-hydroxylasa	<i>Petunia hybrida</i>
CYP75A4	flavonoid 3'5'-hydroxylasa	<i>Gentiana triflora</i>
CYP76A1	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP76A2	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP76B1	<sup>a</sup>	<i>Helianthus tuberosus</i>
CYP77A1	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP77A2	<sup>a</sup>	<i>Solanum melongena</i>
CYP78A1	<sup>a</sup>	<i>Zea mays</i>
CYP78A2	<sup>a</sup>	<i>Phalaenopsis</i> sp.
CYP79	tyrosin- <i>N</i> -hydroxylasa	<i>Sorghum bicolor</i>
CYP80	berbamuninsynthasa	<i>Berberis stolonifera</i>
CYP82	<sup>a</sup>	<i>Pisum sativum</i>
CYP83	<sup>a</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP84	ferulátsynthasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP85	<sup>a</sup> (syntéza brassinosteroidů?)	<i>Lycopersicon esculentum</i>
CYP86	<sup>a</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP88	<sup>a</sup> (syntéza gibberelinů?)	<i>Zea mays</i>
CYP89A2	<sup>a</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP90	kathasteron 23-hydroxylasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>



Tabulka I – pokračování

Rodina/podrodina cytochromu P450	Název enzymu	Rostlinný druh
CYP92A2	<sup>a</sup>	<i>Nicotiana tabacum</i>
CYP93A1	<sup>a</sup>	<i>Glycine max</i>
CYP93A2	<sup>a</sup>	<i>Glycine max</i>
CYP97B1	<sup>a</sup>	<i>Pisum sativum</i>

<sup>a</sup> Neznámý, <sup>b</sup> HBOA – 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-on, <sup>c</sup> 2-OI hydroxylasa – indolin-2-on hydroxylasa, upraveno podle cit.<sup>22</sup>

movaných rekombinantním cytochromem P450 CYP71A1 z avokáda<sup>38</sup>, což potvrdilo, že CYP71A1 avokáda je za demethylaci uvedeného substrátu zodpovědný. Rekombinantní rostlinná cinnamát-4-hydroxylasa CYP73A (EC 1.14.13.11.) (z hlífz *Helianthus tuberosus*) produkovaná také v kvasinkách je sice vysoce specifická k přirozenému substrátu<sup>32,39,40</sup>, ale demethyluje rovněž herniarin<sup>39,40</sup>, hydroxyluje 2-naftoovou kyselinu<sup>32,41</sup> a oxygenuje dalších pět xenobiotických substrátů zahrnujících herbicid chlorotoluron<sup>39,40</sup>. Podobně jako řada živočišných cytochromů P450, jsou i rostlinné cytochromy P450 inducibilními enzymy. Takovým zástupcem je např. inducibilní CYP76B1, jenž byl izolován z *Helianthus tuberosus*. Je enzymem, který katalyzuje dealkylaci modelového xenobiotika 7-ethoxykumarinu a metabolizuje také xenobiotika další (alkoxykumariny, alkoxyresorufiny) a několik herbicidů na bázi fenylmočoviny<sup>42</sup>. Dalším zástupcem rostlinných enzymů, který oxiduje herbicidy skupiny fenylmočoviny, je produkt genu CYP cDNA pro CYP71A10 (cit.<sup>43</sup>). Cytochrom P450 izolovaný z mikrosomů cibulek tulipánů (*Tulipa fosteriana*) rekonstituovaný s NADPH:cytochrom P450 reduktasou katalyzuje oxidaci xenobiotik *N*-nitrosaminů, azobarviv a aminopyrinu<sup>36,44-46</sup>. S prudkým rozvojem molekulární biologie lze jen doufat, že bude připraveno daleko větší množství rekombinantních rostlinných cytochromů P450, které mohou být snadněji purifikovány, a u nichž může být přesněji objasněna jejich substrátová specifita vůči cizorodým substrátům.

### 2.1.2. Peroxidasy

Peroxidasy (EC 1.11.1.7) jsou enzymy, které redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny (endogenní i xenobiotika). Funkcí společnou pro všechny peroxidasy je schopnost detoxikovat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Spektrum sloučenin, které se spoluúčastní rozkladu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je velmi široké. Svou širokou substrátovou specifikou se peroxidasy blíží MFO systému obsahujícímu cytochrom P450 jako terminální oxidasu. Substráty jsou látky organické i anorganické. Mezi nejlepší substráty peroxidasy lze řadit fenoly a aromatické aminy<sup>47,48</sup>. Dlouhou dobu nebyly peroxidasy přímo zařazovány mezi enzymy 1. fáze biotransformace xenobiotik, v současnosti je však známo, že svými reakcemi na metabolismu xenobiotik participují, a to jak v organismech živočišných (např. peroxidasa prostaglandin H synthasa ledvin a močového měchýře)<sup>49</sup>, tak především v rostlinách. Jejich obsah v rostlinách je totiž vysoce významný.

Typickou vlastností peroxidasy je schopnost katalyzovat velké množství různých typů reakcí:

- klasické peroxidasové redoxní reakce (vedoucí k dehydrogenaci),
- halogenace a dehalogenace (halogenperoxidasy, thyroid peroxidasa),
- oxidace halogenidů (myeloperoxidasa),
- oxidační kondenzace aromatických aminů,
- oxidační polykondenzace fenolu a jeho derivátů (vznik ligninu),
- dekarboxylační reakce (např. dekarboxylace kyseliny indolyloctové),
- oxidační štěpení azoskupiny (vznik diazoniového iontu),
- disproportionace peroxidu vodíku (peroxidasy a nedávno nalezená katalasa-peroxidasa),
- oxygenace, hydroxylace,
- N- a O-demethylace.

Peroxidasy jsou většinou hemoglykoproteiny<sup>50</sup>, jejichž prostetickou skupinu tvoří obvykle ferriprotoporfyrin IX. Železo této skupiny je pentakoordinované<sup>51,52</sup>, přičemž pátý ligand tvoří dusík histidinového zbytku proteinové části enzymu. Existují peroxidasy s pozmeněným porfyrinovým skeletem nebo v nich porfyrinový skelet dokonce chybí. Takové peroxidasy obsahují např. ionty manganu (Mn<sup>2+</sup>) nebo vanadu (V<sup>5+</sup>) (cit.<sup>50</sup>). Právě podle charakteru aktivního místa jsou peroxidasy členěny do tří skupin – hemové peroxidasy, vanadové peroxidasy a ostatní peroxidasy. Nejpočetnější je skupina peroxidasy, jejichž katalytické centrum obsahuje hem.

Obsah sacharidů se u jednotlivých peroxidasy velmi liší. Relativní molekulová hmotnost funkční peroxidasy se pohybuje v rozmezí 42 000–158 000 (cit.<sup>50</sup>).

O peroxidasách je známo, že se vyskytují ve velkém množství forem (pravděpodobně izoenzymů). Například křenová peroxidasa (HRP – horseradish peroxidase) se vyskytuje ve čtrnácti formách, laktoperoxidasa v šesti až deseti, myeloperoxidasa ve třech<sup>50,53</sup>. Jsou-li tyto formy skutečnými izoenzymy, které jsou dány i geneticky podmíněnými rozdíly v primární sekvenci aminokyselin nebo jsou to formy vzniklé posttranslačními modifikacemi není známo. Dokonce se zvažuje, nejedná-li se i o arteficiální rozdíly způsobené extrakcí, izolací či způsobem stanovení<sup>54</sup>.

Rostlinné peroxidasy vykazují jasnou příbuznost, což vyplývá z jejich aminokyselinových sekvencí. Peroxidasy křenu, tuřínu, tabáku a brambor jsou homologní v rozmezí 36–50 % (cit.<sup>51</sup>). Mezi kationtovou peroxidasou ředkve a křenovou peroxidasou typu C byla dokonce nalezena 73–81 % homologie. Kationtové peroxidasy jsou více konzervovány během evoluce než aniontové.

V rostlinných buňkách jsou peroxidasy bohatě zastoupeny. Mohou být buď volné (přítomné v cytoplazmě, vakuolách,

mezibuněčném prostoru) nebo vázané (v buněčné stěně, plazmatické membráně nebo organelových membránách). Vazba může být iontová, ale i kovalentní. Distribuce souvisí s bazicitou peroxidas. Ve volné formě jsou především aniontové formy, zatímco kationtové jsou spíše vázané ve strukturách<sup>56</sup>. Peroxidasy byly nalezeny prakticky ve všech rostlinných plechtech (kořeny, stonky, listy, jehlice a další). Je zajímavé, že se peroxidasová aktivita v rostlinách zvyšuje v průběhu stárnutí a jako reakce na stres (biotický jako virová, mikrobiální infekce, požer hmyzem aj., či abiotický, např. vysoká koncentrace solí, přítomnost těžkých kovů, organických toxických látek apod.)<sup>57,89,90</sup>. Další funkcí peroxidas v rostlinách je zapojení do regulace růstu. Peroxidasy zřejmě soustavnou reakcí regulují hladinu růstového hormonu auxinu<sup>58</sup> a jsou rovněž klíčovými molekulami v procesech rychlé adaptace rostlin při změně vnějšího prostředí<sup>58</sup>. Peroxidasy lokalizované v buněčné stěně se podílejí na vychytávání radikálů, které poškozují membrány. Hrají také významnou roli při všech oxidačně-kondenzačních procesech tj. především procesech lignifikace. Při růstu buněčné stěny jsou do ní upevňovány monomery, které se prostřednictvím peroxidasy řetězí, poté zesílují, a tak formují matrix buněčné stěny. Jiné peroxidasy (ligninperoxidasa, manganperoxidasa) mají schopnost lignin depolymerovat. Tyto enzymy jsou sekretovány dřevokaznými houbami (např. *Phanerochaete chrysosporium*)<sup>59</sup>. Jsou účinné v přeměně řady substrátů, které jsou typickými xenobiotiky (např. benzo[*a*]pyren, pyren, benzo[*a*]anthracen, anthracen, polychlorované fenoly, azobarviva)<sup>60</sup>. Nedávno byly uvedené peroxidasy detegovány i v rostlinných buňkách<sup>61</sup>. Jejich přímá úloha při biotransformaci xenobiotik v rostlinách však doposud nebyla prokázána.

Zajímavý je enzym nalezený v plísni bílé hniloby, přeměňující derivát anthracenu – barvivo Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (cit.<sup>62</sup>). I když je v literatuře označován jako RBBR-oxidasa nebo RBBR-oxygenasa, důkaz, že skutečně patří do skupiny oxidas či oxygenas dosud chybí. Vzhledem k tomu, že k přeměně RBBR jako substrátu je nezbytná přítomnost peroxidu vodíku, existuje reálný předpoklad, že jde o zvláštní typ peroxidasy<sup>62</sup>. Přesný mechanismus, stejně jako struktura enzymu, nejsou dosud známy. Enzym vykazující aktivitu k uvedenému substrátu (RBBR) byl nalezen i v buňkách určitých rostlinných druhů<sup>63</sup>.

V praxi byly některé rostlinné peroxidasy užity při dekontaminaci půd obsahujících fenolové sloučeniny. V jiných experimentech byl detoxikační efekt zprostředkovaný peroxidasami obsaženými v rostlinné tkáni zjištěn nejen pro fenoly<sup>64,65</sup>, ale i pro aromatické aminy<sup>66</sup>. Uvedené sloučeniny byly oxidovány na volné radikály nebo na chinony a chinoniminy. Tyto reaktivní oxidační produkty dále reagovaly a poskytovaly oligomery nerozpustné ve vodě. V půdním prostředí se pak takové produkty vázaly na humus, čímž výrazně poklesla toxicita výchozích látek<sup>67,68</sup>. Klibanov se spolupracovníky (cit.<sup>69</sup>) navrhli, že by oxidační reakce zprostředkované křenovými peroxidasami mohly být využívány pro odstranění fenolů, anilinů a jiných aromatických sloučenin z vodných roztoků. Stejně reakce byly také testovány při dekontaminaci půdních sedimentů. Zpětné uvolňování detoxikovaných polutantů z oligomerů nebo humusu probíhá jen ve velmi malém měřítku, proto by oxidační reakce mohly být považovány za snadný a bezpečný způsob dekontaminace. Křenové peroxidasy jsou rostlinnými enzymy, které jsou v současnosti nejvíce

studovány z hlediska jejich potenciálního využití k odstraňování polutantů z prostředí.

#### 2.1.2.1. Mechanismus katalýzy peroxidasami

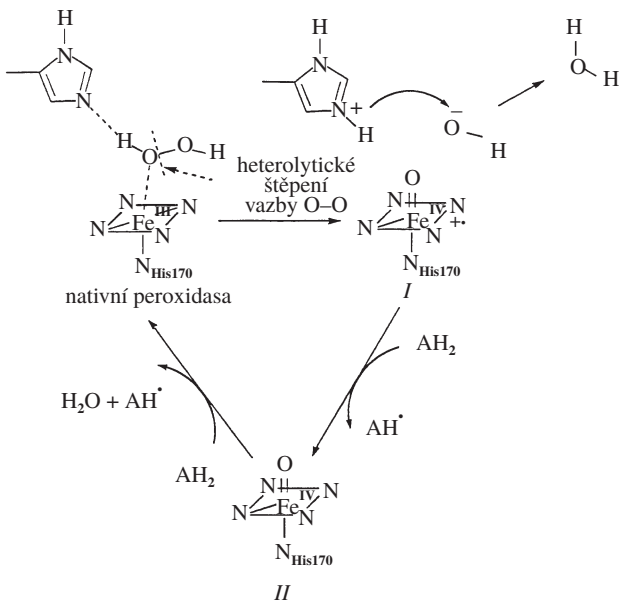
Charakteristickým rysem hemových peroxidas je jejich schopnost existovat v různých oxidačních stavech. Dosud byly v literatuře popsány následující oxidační stavy peroxidas<sup>50,70-73</sup>:

1. Nativní peroxidasa [hemové železo je v tomto stavu peroxidasy ve ferri formě ( $\text{Fe}^{3+}$ )].
2. Redukovaná forma molekuly peroxidasy. V té je hemové železo ve ferro formě ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Efektivní oxidační číslo hemu je dvě.
3. Sloučenina *I*. Při interakci nativního enzymu s  $\text{H}_2\text{O}_2$  nebo jiným peroxidem (ROOH) se tvoří intermediát o dva oxidační ekvivalenty vyšší než nativní (klidový) stav molekuly. Jedná se tedy o efektivní oxidační číslo pět. Tento intermediát je pokládán za oxyferryporfyrinový  $\pi$ -kation radikál, ve kterém je jeden oxidační ekvivalent obsažen ve ferrylovém železe ( $\text{Fe}^{4+}$ ) a druhý ekvivalent je v porfyrinovém skeletu jako  $\pi$ -kation radikál<sup>74,75</sup>. Sloučenina *I* je nestabilní intermediát s poločasem rozpadu menším než minuta. Tento intermediát je typický pro mechanismus působení HRP a má charakteristickou zelenou barvu.
4. Sloučenina ES. Tato forma peroxidas vzniká obdobně jako sloučenina *I*. Tvoří se pouze v některých peroxidasách (např. v cytochrom *c* peroxidase) a má charakteristickou červenou barvu. Sloučenina ES má také o dva oxidační ekvivalenty více než příslušná nativní peroxidasa. Jeden oxidační ekvivalent je obsažen v iontu  $\text{Fe}^{4+}$ , ale druhý je nesen některou aminokyselinou proteinové části molekuly (např. v cytochrom *c* peroxidase je to *Trp* 191, v prostaglandin H synthase *Tyr* 385) (cit.<sup>76,77</sup>).
5. Sloučenina *II*. Vzniká jednoelektronovou redukcí sloučeniny *I* nebo sloučeniny ES. Celkové efektivní číslo je čtyři. Poločas života uvedeného intermediátu je větší než jedna hodina. Sloučenina *II* křenové peroxidasy má červenou barvu.
6. Sloučenina *III*. Při reakci nativního enzymu se superoxidovým anion radikálem ( $\text{O}_2^-$ ) nebo při reakci redukované (ferro) formy peroxidasy s molekulárním kyslíkem vzniká sloučenina *III* (označovaná též jako oxyperoxidasa)<sup>78</sup>.
7. Sloučenina X. Tato forma peroxidas vzniká reakcí nativního enzymu s chloritanem ( $\text{ClO}_2^-$ ). Poločas sloučeniny X je několik dní.
8. Sloučenina EOX. Sloučenina EOX vzniká interakcí halogenidů ( $\text{X}^-$ ) se sloučeninou *I*.

Některé výše zmíněné stavy peroxidas jsou uvedeny na obrázcích 3–5.

##### 2.1.2.1.1. Reakce katalyzované peroxidasami využívající $\text{H}_2\text{O}_2$ v nepřítomnosti $\text{O}_2$ , využívající $\text{O}_2$ a využívající $\text{H}_2\text{O}_2$ i $\text{O}_2$

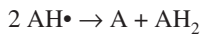
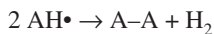
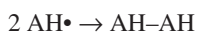
Vazbou  $\text{H}_2\text{O}_2$  nebo jiného peroxidu (ROOH) na nativní peroxidasu se tento enzym aktivuje. Vzniká sloučenina *I* (případně sloučenina ES), která je o dva oxidační ekvivalenty nad nativním enzymem<sup>74,75</sup>. Tato sloučenina nese aktivovaný kyslík. V nativní peroxidase je železo pentakoordinované<sup>51,52</sup>, proximálním ligandem je dusík histidylového zbytku proteinové molekuly. Po reakci s  $\text{H}_2\text{O}_2$  vzniká ferrylporfyrinový

Obr. 3. Reakční mechanismus peroxidasy za účasti  $\text{H}_2\text{O}_2$ 

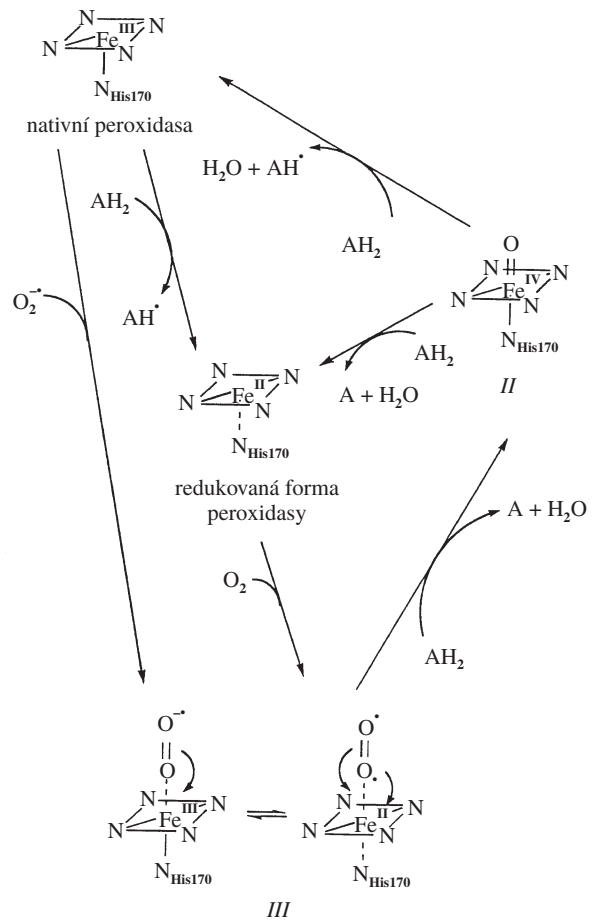
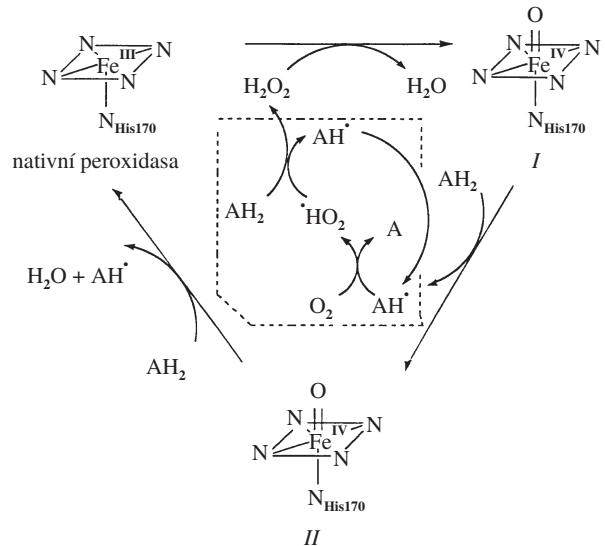
$\pi$ -kation radikál (sloučenina *I*), ve kterém je na místě šestého ligandu vázán aktivovaný kyslík. Vzhledem k tomu, že železo v oxidačním čísle pět (V) není stálé, vyskytuje se ve sloučenině *I* i ES v oxidačním čísle čtyři (IV) a chybějící ekvivalent je přítomný buď na hemu (v případě sloučeniny *I*) nebo na aminokyselinovém zbytku proteinu, nejčastěji Trp a Tyr (v případě sloučeniny ES).

Reakcí sloučeniny *I* (případně ES) se substrátem (donorem elektronů) vzniká sloučenina *II* (cit.<sup>74,75</sup>) a radikál substrátu. Tímto elektronem se doplní deficit na porfyrinovém skeletu nebo na aminokyselinovém zbytku. Bylo zjištěno, že sloučenina *I* oxiduje substrát 10–100× rychleji než sloučenina *II* (cit.<sup>79</sup>). Cyklus se uzavírá reakcí sloučeniny *II* s další molekulou substrátu, přičemž se obnoví peroxidasa v základním, nativním stavu (obr. 3).

Radikály vzniklé jednoelektronovou oxidací substrátu pak mohou reagovat buď za vzniku polymeračních nebo oxidačních produktů:



Peroxidasový cyklus odpovídá modifikovanému ping-pongovému mechanismu, kterého se účastní dvě molekuly redukčního a jedna molekula oxidačního substrátu. Oxidace substrátu ( $\text{AH}_2$ ) peroxidasami je zprostředkována dvěma jednoelektronovými přenosy. Existují však výjimky. Bylo totiž zjištěno, že např. jodidy jsou oxidovány sloučeninou *I* thyroïdperoxidasy reakcí přenášející dva elektrony. V tomto případě není sloučenina *II* intermediátem reakce. Podobně mohou být oxidovány i aromatické sulfidy na sulfoxidy. Stabilita sloučeniny *I* závisí na koncentraci  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V nepřítomnosti re-

Obr. 4. Reakce vzniku sloučeniny *III* za přítomnosti  $\text{O}_2$ 

Obr. 5. Vznik superoxidového anionradikálu reakcí radikálu s kyslíkem

dukčního substrátu je peroxidasa velkým množstvím peroxidu degradována.

Některé sloučeniny mohou být oxidovány peroxidasou i v nepřítomnosti peroxidu. Jedná se např. o hydrochinony, naftochinony a kyselinu indolyloctovou<sup>80,81</sup>. Možný mechanismus reakcí je znázorněn na obrázku 4. Předpokládá se participace sloučeniny III.

Reakce, při kterých se využívá  $H_2O_2$  i  $O_2$  jsou zdrojem řetězových reakcí. Radikály vzniklé z donorů elektronů jednoelektronovou oxidací za přítomnosti  $H_2O_2$  jsou nestabilní a je-li přítomen kyslík, reagují s ním. Tato reakce následně generuje superoxidový anionradikál, který sám oxiduje jiné molekuly donorů elektronů. Uvedeným způsobem jsou zahajovány řetězové reakce volných radikálů (obr. 5). Například oxidace NADH na  $NAD^+$  může probíhat touto cestou, přičemž enzymová oxidace NADH je daleko méně efektivní než radikálové řetězové procesy. Vzniklý radikál ( $NAD\bullet$ ) redukuje  $O_2$  na  $O_2\bullet^-$  za vzniku  $NAD^+$ , následuje jednoelektronová oxidace další molekuly NADH pomocí  $O_2\bullet^-$  za vzniku  $NAD\bullet$  a celý cyklus se opakuje<sup>82</sup>.

O peroxidasách (konkrétně např. HRP) je známo, že za přítomnosti  $H_2O_2$  i  $O_2$  katalyzují také reakce, při nichž dochází k inkorporaci kyslíku do molekuly substrátu (hydroxylační a oxygennační reakce). Některé takové reakce vyžadují přítomnost kosubstrátu, přičemž zahrnují jednoelektronovou oxidaci tohoto kosubstrátu na radikál. Ten pak reaguje s biatomickou molekulou kyslíku za tvorby peroxylového radikálu ( $ROO\bullet$ ), jenž je zodpovědný za inkorporaci kyslíku do molekuly substrátu<sup>83,84</sup>. HRP také katalyzuje některé reakce typické pro cytochrom P450 (např. N-dealkylace, hydroxylace benzylmethylenové skupiny). Ve většině těchto případů není zdrojem inkorporovaného atomu kyslíku peroxid vodíku ani molekulární kyslík. Předpokládá se, že pro takové reakce je jako zdroj kyslíku využívána molekula vody<sup>85</sup>.

## 2.2. Význam cytochromů P450 a peroxidas v oxidaci xenobiotik v rostlinách

Přesná funkce a účinnost rostlinných peroxidas a cytochromů P450 v první fázi biotransformace xenobiotik není dosud zcela jasná. Je stále otevřenou otázkou, zda za oxidační reakce v rostlinách zodpovídají především cytochromy P450, podobně jako u živočichů, nebo hrají v oxidaci xenobiotik majoritní úlohu peroxidasy<sup>34–36,86–88</sup>.

Po srovnání metabolismu benzo[*a*]pyrenu rostlinnými mikrosomálními enzymy a peroxidasami byla již v roce 1991 vyslovena hypotéza o majoritní úloze peroxidas při transformaci tohoto a eventuálně i dalších xenobiotik v rostlinách<sup>34</sup>. Hypotéza byla založena na několika faktech. Reakční i substrátová specifita rostlinných peroxidas vůči sloučeninám, které jsou pro rostliny xenobiotiky, jsou velice široké. Naopak membránový systém rostlinných cytochromů P450 vykazuje užší substrátovou specifitu. Cytochromy P450 se vyskytují pouze v mikrosomální buněčné frakci, a navíc ve velmi nízkých koncentracích. Naproti tomu se peroxidasy nacházejí ve všech částech rostliny a v daleko vyšších koncentracích. Jsou přítomny v intracelulárním i extracelulárním prostoru a jsou dokonce často transportovány i do místa působení. Afinita rostlinných peroxidas k exogenním substrátům je vysoká. Při studiu metabolismu xenobiotik rostlinnými systémy byla pozorována větší podobnost metabolitů několika xenobiotik

(např. právě uvedeného benzo[*a*]pyrenu) *in vivo* s metabolity vytvořenými *in vitro* peroxidasami než s produkty cytochromu P450 (cit.<sup>34</sup>).

Zda-li skutečnost odpovídá uvedenému hypotetickému předpokladu není však dosud experimentálně dostatečně ověřeno. Hypotéza byla podpořena např. výsledky zjištěnými v naší laboratoři. Jedná se o nález, že aktivita peroxidas rostlinných buněk v tkáňových kulturách koreluje se schopností oxidovat polychlorované bifenyly (PCB) (cit.<sup>63</sup>). Výsledky je však nutné doplnit poznatky o obsahu a aktivitě cytochromů P450 v uvedených tkáňových kulturách a jejich vztahu k degradaci PCB a o poznání oxidace těchto látek izolovanými enzymy *in vitro*. Situace v rostlinných buňkách je zřejmě daleko složitější. Další nejnovější poznatky totiž naopak prokazují, že za oxidaci jiných xenobiotik (*N*-nitrosaminů a azobarviva Sudanu I) jsou v rostlinných mikrosomech zodpovědné především cytochromy P450 (cit.<sup>36</sup>). Tato studie tedy naopak svědčí o větším významu rostlinných cytochromů P450.

Pro vysvětlení přesné úlohy peroxidas a cytochromů P450 v metabolismu endogenních a exogenních substrátů u rostlin jsou tedy rozhodně nutné další studie<sup>16</sup>. Nezodpovězené otázky se týkají především přesné substrátové specifity izolovaných cytochromů P450 a izolovaných rostlinných peroxidas a srovnání metabolismu několika dalších typů xenobiotik *in vivo* s konverzí těchto sloučenin izolovanými rostlinnými enzymy *in vitro*. Jedná se o studium úlohy právě uvedených dvou hemových enzymů (cytochromů P450 a peroxidas) rostlin, a to při biotransformaci vybraných typů xenobiotik; *i*) vysoce toxických (karcinogenních) sloučenin a *ii*) rekalcičních chemikálií, které patří mezi těžko odbouratelné residuální kontaminanty ve složkách životního prostředí.

## 3. Závěr

Poznání úlohy rostlinných enzymů (cytochromů P450 a peroxidas) při přeměně různých typů chemických sloučenin *in vitro*, zapojení těchto enzymů do metabolismu cizorodých látek v rostlinných buňkách *in vivo* a určení metabolitů těchto reakcí a jejich potenciální toxicity, je důležité nejen pro základní výzkum, ale je významné i z praktického hlediska. Je totiž možné do budoucna počítat s využitím poznatků z této oblasti především k odstraňování cizorodých látek z rozličných složek životního prostředí. Bioremediace prostřednictvím mikroorganismů je v dnešní době používána v širokém měřítku v zahraničí i v naší republice. Využití rostlin pro podobné účely – fytořemediace – však zatím tak široké uplatnění nenašla, je však považována ze velice perspektivní oblast výzkumu i aplikace (cit.<sup>91</sup>). Je tomu tak proto, že metabolismus cizorodých látek v rostlinách nebyl zdaleka tak podrobně studován a vhodné rostlinné druhy tak ani nemohly být pro remediaci vybrány. Poznání osudu xenobiotik při jejich biotransformaci v rostlinách je tedy pro možnost a urychlení praktického využití rostlin a popřípadě jejich enzymového aparátu samotného v remediaci nezbytné.

*Autoři děkují za podporu Grantové agentury ČR (grant 203/99/1628) and Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR (grant VS 96141).*

## LITERATURA

1. Sandermann H.: *TIBS* 17, 82 (1992).
2. Cunningham S. D., Ow D. W.: *Plant. Physiol.* 110, 715 (1996).
3. Sandermann H.: *Pharmacogenetics* 4, 225 (1991).
4. Marrs K. A.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127 (1996).
5. Coleman J. O. D., Blahe-Kalff M. M. A., Davies T. G. E.: *Trends Plant Sci.* 2, 146 (1997).
6. Kreuz K., Tommasini R., Martinoia E.: *Plant Physiol.* 111, 349 (1996).
7. Toungh Y.-P.S., Hsieh T.S., Tu C.P.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 31 (1990).
8. La Roche S. D., Leisinger T.: *J. Bacteriol.* 172, 164 (1990).
9. Sariaslani F. S.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 9, 171 (1989).
10. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem. Listy* 93, 229 (1999).
11. Anzenbacher P., Dawson J. H., Kitagawa T.: *J. Mol. Struct.* 214, 149 (1989).
12. Anzenbacher P., Hudeček J., Stiborová M., Larroque C., Lange R., Heibel G., Hildebrandt P., v knize: *Cytochrome P-450. Biochemistry and Biophysics* (Archakov A. I., Bachmanova G. I., ed.), str. 1. INCO-TNC, Moscow 1992.
13. Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 811 (1998).
14. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A.D.N.: *FASEB J.* 6, 669 (1992).
15. Hollenberg R. F.: *FASEB J.* 6, 686 (1992).
16. He K., Bornheim L. M., Falick A. M., Maltby D., Yin H., Correia M. A.: *Biochemistry* 37, 17448 (1998).
17. Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gonzales F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., Okada K., Nebert D. W.: *DNA Cell Biol.* 12, 1 (1993).
18. Spatzenegger M., Jaeger W.: *Drug Metab. Rev.* 27, 397 (1995).
19. Nebert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Esrabrook R. W., Gonzales F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Phillips J. R., Sato R., Waterman M. R.: *DNA Cell Biol.* 8, 1 (1989).
20. Riviére J. L., Cabanne F.: *Biochimie* 69, 743 (1987).
21. Werck-Reichhardt D.: osobní sdělení.
22. Chapple C.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 311 (1998).
23. Moreland D. E., Corbin F. T., McFarland J. E.: *Pestic. Biochem. Physiol.* 45, 43 (1993).
24. Moreland D. E., Corbin F. T., McFarland J. E.: *Pestic. Biochem. Physiol.* 47, 206 (1994).
25. Bolwell P., Bozak K., Zimmerlin A.: *Phytochemistry* 37, 1491 (1997).
26. Frear D. S.: *Drug Metabol. Drug Interact.* 12, 329 (1995).
27. Thies F., Backhaus T., Bossmann B., Grimme L. H.: *Plant Physiol.* 112, 361 (1996).
28. Durst F., Benveniste I.: *Handbook Exp. Pharmacol.* 105, 293 (1993).
29. Durst F., O'Keefe D. P.: *Drug Metabol. Drug Interact.* 12, 171 (1995).
30. Schuller M.: *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 235 (1996).
31. Tijet N., Helvig C., Pinot F., Le Bouaguin R., Lesot A., Durst F., Salaun J. P., Benveniste I.: *Biochem. J.* 332, 583 (1998).
32. Schalk M., Batard Y., Sever A., Nedelkina S., Durst F., Werck-Reichhardt D.: *Biochemistry* 36, 15253 (1997).
33. Batard Y., LeRet M., Schalk M., Robineau T., Durst F., Werck-Reichhardt D.: *Plant J.* 14, 111 (1998).
34. Stiborová M., Anzenbacher P.: *Gen. Physiol. Biophys.* 10, 209 (1991).
35. Chiappella C., Ysern P., Riera J., Llagostera M.: *Mutat. Res.* 329, 11 (1995).
36. Stiborová M., Schmeiser H. H., Frei E.: *Phytochemistry*, v tisku.
37. O'Keefe D. P., Leto K. J.: *Plant Physiol.* 89, 1141 (1989).
38. Bozak K. R., O'Keefe D. P., Christoffersen R. E.: *Plant Physiol.* 100, 1976 (1992).
39. Pierrel M. A., Batard Y., Kazmaier M., Mignotte-Vieux C., Durst F., Werck-Reichhardt D.: *Eur. J. Biochem.* 224, 835 (1994).
40. Urban P., Werck-Reichhardt D., Teutsch H. G., Durst F., Regnier S., Kazmaier M., Pompon D.: *Eur. J. Biochem.* 222, 8812 (1994).
41. Durst F., Benveniste I., Schalk M., Werck-Reichhardt D.: *Methods Enzymol.* 272, 259 (1996).
42. Robineau T., Batard Y., Nedelkina S., Cabello-Hurtado F., LeRet M., Sorokine O., Didierjan L., Werck-Reichhardt D.: *Plant Physiol.* 118, 1049 (1998).
43. Siminzsky B., Corbin F. T., Ward E. R., Fleischmann T. J., Dewey R. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1750 (1999).
44. Hansíková H., Frei E., Anzenbacher P., Stiborová M.: *Gen. Physiol. Biophys.* 13, 149 (1994).
45. Hansíková H., Frei E., Schmeiser H. H., Anzenbacher P., Stiborová M.: *Plant Sci.* 110, 53 (1995).
46. Stiborová M., Hansíková H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 1689 (1996).
47. Meunier B.: *Biochimie* 69, 3 (1987).
48. Stiborová M., Asfaw B., Anzenbacher P.: *FEBS Lett.* 232, 378 (1988).
49. Eling T. E., Thompson D. C., Foureman G. L., Curtis J. F., Hughes M. F.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 1 (1990).
50. Neidelman S. L., Giegert J., v knize: *Biohalogenation*. Ellins Horwood Limited, London 1986.
51. Smulevich G.: *Biochemistry* 33, 7398 (1994).
52. Smulevich G., English A. M., Martini A. R., Marzocchi M. P.: *Biochemistry* 30, 772 (1991).
53. Hoyle M. C.: *Plant Physiol.* 60, 787 (1977).
54. Borchert R., Decedue C. J.: *Plant Physiol.* 62, 794 (1978).
55. Fujiyama K., Takemura H., Shinmyo A., Ohada H., Takano M.: *Gene* 89, 163 (1990).
56. Grison R., Pilet P.: *J. Plant Physiol.* 37, 1180 (1986).
57. Castillo F. J., Penel C., Grepin H.: *Plant Physiol.* 74, 846 (1984).
58. Van Huystee R. S., Chibbar R. N.: *Cur. Top. Biol. Med. Res.* 13, 155 (1986).
59. Farel R. L., Murtagh K. E., Tien M., Mosuch M. D., Kirk T. J.: *Enzyme Microb. Technol.* 11, 322 (1989).
60. Field J. A., Jong E., Feijoo-Costa G., Bont J. A. M.: *TIBTECH* 11, 44 (1993).

61. Kučerová P., Poláchová L., Macek T., Burkhard J., Tříška J., Macková M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42, 250 (1998).
62. Vyas B. R. M., Molitoris H. P.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3919 (1995).
63. Kučerová P., Macková M., Poláchová L., Burkhard J., Demnerová J., Macek T.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 1497 (1999).
64. Dec J., Bollag J. M.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1132 (1994).
65. Nicell J. A., Bewtra K., Biswas N., Taylor K. E.: *Water Res.* 27, 1629 (1993).
66. Klibanov A. M., Morris E. D.: *Enzyme Microbiol. Technol.* 3, 119 (1981).
67. Bollag J. M., Shuttleworth K. L., Auderson D. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3086 (1998).
68. Shannon M. J. R., Bartha R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1719 (1988).
69. Klibanov A. M., Tu T. M., Scott K. P.: *Science* 221, 259 (1983).
70. Gaspar J., Penel C., Greppin H.: *Bull. Groupe Polyphenols* 23, 259 (1986).
71. Nakamura M., Yamaruki J., Nahagava H., Ohtaki S.: *J. Biol. Chem.* 258, 3878 (1983).
72. Dunford H. B.: *Heme Peroxidases*. Wiley-VCH, New York 1999.
73. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M.: *Carcinogenesis* 13, 1221 (1992).
74. Aasa R., Vangart T., Dunford M.: *Biochim. Biophys. Acta* 391, 259 (1986).
75. Sitter A., Recreks C., Ternner J.: *J. Biol. Chem.* 260, 7517 (1985).
76. Mauro J. K.: *Biochemistry* 27, 6243 (1988).
77. Sivaraja M., Goodin D. B., Smith M., Hoffmann B. M.: *Science* 245, 738 (1989).
78. Rodriguez-Lopez J. N., Smith A. T., Thorneley R. N.: *J. Biol. Chem.* 272, 389 (1997).
79. Hayashi Y., Yanazaki J.: *J. Biol. Chem.* 254, 9101 (1979).
80. Sukhybani A. A., Khowaiter S. H.: *Acta Chim. Hung* 120, 93 (1985).
81. Duran N., Brunet J., Gallardo H.: *Biochem. Educ.* 12, 173 (1984).
82. Yokota K., Yamazaki J.: *Biochemistry* 16, 1913 (1977).
83. Ortiz de Montellano P. R., Grab L. A.: *Biochemistry* 26, 5310 (1987).
84. MacDonald J. D., Dunford H. B.: *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 185 (1989).
85. Anzenbacher P., Niwa T., Tolbert L. M., Sirimanne S. R., Guengerich F. P.: *Biochemistry* 35, 2511 (1996).
86. Gichner T., Cabrera López G., Wagner E. D., Plewa M. J.: *Mutat. Res.* 306, 165 (1994).
87. Gichner T., Stavreva D. A., Čeřovská N., Wagner E. D., Plewa M. J.: *Mutat. Res.* 331, 127 (1995).
88. Plewa M. J., Wagner E. D., Stavreva D. A., Gichner T.: *Mutat. Res.* 350, 163 (1996).
89. Macek T., Macková M., Očenášková J., Demnerová K., Pazlarová J., Křen V., v knize: *Plant Peroxidases* (Obinger C., Burner U., Ebermann R., Penel C., Grepin H., ed.). Univ. of Geneva, Geneva 1996.
90. Macková M., Ferri E. N., Demnerová K., Macek T.: *Chem. Listy* 95, 130 (2001).
91. Macek T., Macková M., Káš J.: *Biotechnol. Adv.* 18 (1), 23 (2000).
92. Plewa M. J., Wagner E. D.: *Annu. Rev. Genet.* 27, 93 (1992).

**L. Chromá<sup>a</sup>, M. Macková<sup>a</sup>, T. Macek<sup>b</sup>, V. Martínek<sup>c</sup>, and M. Stiborová<sup>c</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*, <sup>b</sup>*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, <sup>c</sup>*Department of Biochemistry, Faculty of Natural Science, Charles University, Prague*): **Plant Cytochromes P450 and Peroxidases and Their Role in Degradation of Environmental Contaminants**

Transformation of various xenobiotics by plant cells usually proceeds in three phases: derivatization of the xenobiotic to a more polar and reactive agent (phase 1), conjugation (phase 2) and secondary conjugation (phase 3) with endogenous molecules. The mixed-function oxidases with cytochromes P450 as terminal oxidases and peroxidases belong to the enzymes of phase 1. These enzymes, in addition to other functions, probably play an important role in the metabolism of xenobiotics in plants. The mechanisms of detoxification are described.

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### EXTRAKCE OLEJŮ ZE VZORKŮ KRYSTALICKÉHO POLYSTYRENU METODOU ZRYCHLENÉ EXTRAKCE ROZPOUŠTĚDLEM

KAREL VENTURA, MARTIN ADAM a PETRA VÁLKOVÁ

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, e-mail: Karel.Ventura@upce.cz*

Došlo dne 6.XII.1999

**Klíčová slova:** zrychlená extrakce rozpouštědlem, olej, krystalický polystyren

### Úvod

Zrychlená extrakce rozpouštědlem (accelerated solvent extraction<sup>1</sup> – ASE, popř. Fast Extraction nebo Pressurized Solvent Extraction) je technika založená na principu extrakce v systému tuhá látka–kapalina, která je prováděna při teplotě nad atmosférickým bodem varu použitého rozpouštědla (50–200 °C), zvýšeném tlaku (5–20 MPa) a po krátký časový interval<sup>2</sup> (5–20 min).

Tuto metodu je možné využít pro extrakci tuhých a polotuhých vzorků<sup>3</sup>, ze kterých lze izolovat polotěkavé bazické, neutrální a kyselé sloučeniny, organofosforové a organochlorované pesticidy, chlorované herbicidy, polyaromatické uhlovodíky a polychlorované bifenyly z půd, jílů, kalů a sedimentů<sup>4</sup>. Z dalších aplikací lze uvést např. aditiva z výbušin a polymerů, tuky v potravinách, účinné látky v léčivech nebo ropné znečištění půd apod.

Srovnávání výsledků ukazuje, že zrychlená extrakce rozpouštědlem poskytuje extrakční účinnost srovnatelnou s extrakcí v Soxhletově extraktoru, popřípadě ještě vyšší. Uvádí se, že spotřeba rozpouštědla je až patnáctkrát, a času dokonce šedesátkrát menší<sup>3</sup>.

Existují dva hlavní fyzikálně-chemické důvody, proč je tato metoda tak účinná. Jsou to vliv rozpustnosti a přenosu hmoty, kdy se zvyšuje jak rychlost difuze, tak i rozpouštěcí kapacita použitých rozpouštědel<sup>5</sup>, a dále narušení povrchové rovnováhy, kdy zvýšená teplota může rozrušit pevné interakce mezi maticí a analytem<sup>6</sup> založené na van der Waalsových silách, vodíkových vazbách a dipólových přitažlivých silách mezi molekulami analytu a aktivními centry tuhé matrice<sup>7</sup>. Vyšší teplota také snižuje viskozitu kapalných látek a snižuje se i povrchové napětí, což umožňuje lepší penetraci částic tuhé matrice.

Důležitým faktorem ovlivňujícím účinnost zrychlené extrakce rozpouštědlem je i úprava vzorku před extrakcí, kdy je třeba tento vzorek rozmělnit na malé částice. Takto připravený vzorek je pak extrahován rychleji a efektivněji než kompaktní matrice<sup>8</sup>.

Přímý vliv tlaku na extrakční účinnost nebyl pozorován, jeho hlavním úkolem je udržet horké rozpouštědlo v kapalném stavu. Díky zvýšenému tlaku je rozpouštědlo tlačeno do porů matrice a je tak možné extrahovat i analyty, které jsou v pórech tuhé matrice uzavřeny<sup>9</sup>.

U polymerních látek jsou předmětem analýzy často aditiva v nich obsažená. Při použití klasických extrakčních metod<sup>10</sup> trvá izolace aditiv z polymerních matic velmi dlouho (až 48 h). Značné urychlení umožňuje použití zrychlené extrakce rozpouštědlem, kdy se jako rozpouštědlová soustava používá rozpouštědlo, které účinně extrahuje daný analyt, s přidáním malého množství jiného rozpouštědla, které způsobí nabobtnání polymerní matrice a tím i zpřístupnění analytů uzavřených v pórech<sup>11</sup>.

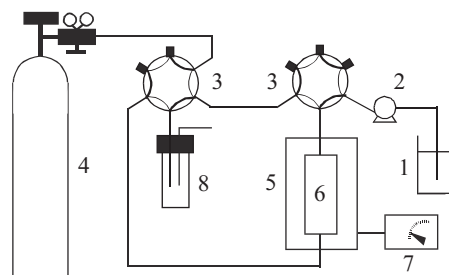
### Experimentální část

#### Použité chemikálie

Jako extrakční rozpouštědlo byl použit propan-2-ol (Riedel-de Haën, Seelze, SRN), do kterého bylo přidáno cca 2,5 % cyklohexanu (Lachema a.s., Brno, Česká republika), který zajišťoval lepší nabobtnání vzorků a tím i účinnější extrakci. Testována byla rovněž rozpouštědlová soustava *n*-hexan (Lachema a.s., Brno, Česká republika) se 2,5 % acetonu (J. T. Baker, Deventer, Holandsko). Pro propláchnutí celého systému po skončení extrakce byl použit dusík čistoty 4,0 (Linde Technoplyn a. s., Praha, Česká republika).

#### Extraktor FastEx 01

Všechny extrakce byly provedeny na přístroji FastEx 01 (obr. 1), který byl ve spolupráci s Univerzitou Pardubice navržen a vyvinut v Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně a vyroben v jeho dílnách. Tento přístroj je schopen pracovat v teplotním rozsahu od 70 do 200 °C a při tlacích, které jsou limitovány použitými přepínacími ventily (25 MPa) s maximálním objemem kapalně fáze 500 ml, daným objemem pracovního válce vysokotlakého čerpadla HPP 5001 (Laboratorní



Obr. 1. Zjednodušené schéma extraktoru FastEx 01; 1 – zásobník s rozpouštědlem, 2 – vysokotlaká pumpa, 3 – šesticestné ventily, 4 – tlaková láhev s inertním plynem, 5 – vyhřívací pec, 6 – extrakční cela se vzorkem, 7 – regulátor vyhřívání extraktoru, 8 – záchytná nádobka

přístroje, Praha, Česká republika). K extraktoru jsou dodávány extrakční patrony z nerezové oceli o velikostech 11, 22 a 33 ml.

### Vzorky krystalického polystyrenu

Jedná se o krystalický polystyren, z něž je extrahován medicínský olej. Tento olej se do polystyrenu přidává pro zlepšení reologických vlastností, aby lépe procházel tryskou vstříkovačím přístrojem při výrobě různých plastových výrobků a vyplňoval tak celou formu. Analyzovány byly vzorky s označením V 106, V 114, V 126, V 136, V 214, V 224, V 325, K 562a, K 562b, K 149 a K 171 (VÚSK Kaučuk a.s., Kralupy nad Vltavou), u kterých byly od výrobce udány obsahy oleje stanovené extrakcí v Soxhletově přístroji. Tyto hodnoty byly brány jako referentní a veškeré výtěžky získané metodou zrychlené extrakce rozpouštědlem k nim byly vztahovány.

### Podmínky extrakce

Pro extrakci bylo naváženo cca 1 g vzorku krystalického polystyrenu, který byl pak smíchán s přibližně stejným množstvím mořského písku. Tato směs pak byla zabalena do jemné buničiny a vložena do extrakční cely o objemu 22 ml. Pro snížení spotřeby rozpouštědla byl zbývající objem této cely zaplněn skleněnými kuličkami o průměru 1 mm. Následovala statická extrakce při teplotě 140 °C, tlaku 10 MPa a s rozpouštědlovou soustavou 2,5 % cyklohexanu v propan-2-olu. Tato extrakce byla provedena ve dvou 10 minutových krocích, mezi nimiž došlo k výměně rozpouštědla v extrakční cele za čisté. Po skončení byly extrakty vypuštěny do jedné nádoby a celý systém pak byl propláchnut nejprve čistým rozpouštědlem a pak dusíkem při tlaku 0,3 MPa.

### Analýza extraktů

Všechny extrakty byly analyzovány gravimetricky. Ze získaných extraktů v záchytné nádobě bylo na vodní lázni odpařeno veškeré rozpouštědlo a tyto nádoby byly dosušeny v horkovzdušné sušárně při teplotě 85 °C po dobu 30 min. Po ochlazení a zvážení byly výtěžky extrakcí vypočteny ze vztahu:

$$\text{Obsah oleje [\%]} = \frac{m_{\text{po}} - m_{\text{před}}}{m_{\text{vz}}} \cdot 100 \quad (1)$$

kde  $m_{\text{po}}$  je hmotnost záchytné nádoby po extrakci,  $m_{\text{před}}$  je hmotnost stejné nádoby před extrakcí a  $m_{\text{vz}}$  je navážka extrahovaného vzorku.

### Výsledky a diskuse

Dříve, než může být metoda zrychlené extrakce rozpouštědlem používána pro sériové analýzy, je třeba provést optimalizaci jednotlivých parametrů, jakými jsou teplota, tlak, doba extrakce, množství vzorku, volba rozpouštědla a úprava vzorku před vlastní extrakcí. Vzhledem k tomu, že pracovní tlak nemá přímý vliv na účinnost extrakce, ale slouží pouze k udržení extrakčního rozpouštědla v kapalném stavu, nebyl

tento parametr optimalizován. Při experimentech byl tedy zvolen tlak 10 MPa, který byl při použitých teplotách plně dostačující. V následujícím textu tedy budeme diskutovat jednotlivé optimalizované parametry odděleně.

### Volba množství extrahovaného vzorku

Toto množství vzorku bylo přímo závislé na následně analytické koncepci, kterou byla gravimetrická analýza, a na předpokládaném obsahu zkoumané látky. Vzhledem k tomu, že zkoumané polymery dle výrobce obsahovaly okolo 3 % olejů a některé z nich i méně, bylo třeba volit takovou navážku vzorku, aby se výsledná vyvážka oleje pohybovala minimálně v desítkách miligramů. Pokud by však bylo extrahováno příliš velké množství tohoto vzorku, byla by extrakce méně účinná díky omezenému objemu extrakční patrony a záchytné nádoby. Byla tedy zvolena navážka 1 g, kdy předpokládaná vyvážka činila 30 mg.

### Volba vhodného rozpouštědla

Pro extrakci olejů z polymerů je vhodné takové rozpouštědlo, které by rozpouštělo analyt, ne však polymer, a které by současně nabobtnalo tento polymer, čímž dojde ke zvýšení účinnosti extrakce. Rozpouštědlo, které by splňovalo všechny tyto parametry, lze nalézt jen velmi obtížně. Z toho důvodu byly zvoleny směsi rozpouštědel, kde vždy převažující složkou bylo rozpouštědlo, které rozpouštělo analyt. Menšinovou složkou bylo rozpouštědlo, které mělo za úkol nabobtnat polymer a zefektivnit tak vlastní extrakční proces. Byly tedy zkoumány tři směsi rozpouštědel. Jednalo se o směs 2,5 % acetonu v *n*-hexanu, 2,5 % acetonu v propan-2-olu a 2,5 % cyklohexanu v propan-2-olu. Byly tedy provedeny tři série po pěti extrakcích při 80 °C a 10 MPa ve dvou 5 minutových krocích, kdy byl použit vzorek V 214. Výsledky jsou uvedeny v tabulce I, ze které je vidět, že nejlepší výsledky poskytuje směs 2,5 % acetonu v *n*-hexanu. Při použití této směsi ale dochází k narušení polymeru a k jeho částečnému rozpouštění, což je pro tuto práci nežádoucí. Proto při dalších experimentech byla používána výhradně směs 2,5 % cyklohexanu v propan-2-olu.

#### Tabulka I

Vliv rozpouštědlové směsi na množství vyextrahovaného oleje (80 °C, 10 MPa, 2×5 min, vzorek V 214 s předpokládaným obsahem oleje 3 %)

Rozpouštědlová soustava	Nalezeno [%]
2,5 % acetonu v propan-2-olu	0,80±0,13
2,5 % acetonu v <i>n</i> -hexanu	2,41±0,28
2,5 % cyklohexanu v propan-2-olu	1,29±0,16

### Optimalizace pracovní teploty

Při optimalizaci tohoto parametru bylo postupováno tak, že cca 1 g vzorku V 214 byl extrahován ve dvou 5 minutových krocích při 10 MPa a se směsí 2,5 % cyklohexanu v propan-2-olu. Provedeno bylo vždy pět extrakcí při stejné teplotě,



kteřá byla měněna od 80 °C do 140 °C po 20 °C. Výsledky jsou následující:

Teplota [°C]	80	100	120	140
Nalezeno [%]	1,29±0,16	2,12±0,17	2,53±0,14	3,19±0,17

Je vidět, že nejlepší výsledky byly dosahovány při 140 °C, proto při dalších experimentech byla používána pouze tato teplota.

#### Úprava vzorku polymeru před extrakcí

Při 140 °C již dochází k roztavení polymeru, který pak v extrakční cele tuhne, což po ukončení extrakce komplikuje jeho odstranění z cely. Čištění se pak musí provádět rozpouštěním nejprve v acetonu a pak v kyselině sírové. Další komplikací je, že při takto vysoké teplotě dochází ke spojování jednotlivých částic polymeru, což snižuje jeho povrch a tím se zmenšuje i účinnost extrakce. Bylo tedy provedeno pět extrakcí cca 1 g vzorku V 214 smíchaného v poměru 1:1 s mořským pískem při 140 °C, 10 MPa po dobu 5 min se směsí 2,5 % cyklohexanu v propan-2-olu, kde byl sledován pouze stav vzorku po ukončení extrakce vzhledem k jeho výměně. Při těchto experimentech bylo zjištěno, že již nedochází k tak výraznému slévání vzorku, ale při jeho výměně stále přetrvávaly výše uvedené problémy se zapékáním vzorku v extrakční cele.

Byl tedy zvolen postup, kdy byl cca 1 g vzorku V 214 smíchan se stejným množstvím mořského písku a tato směs byla zabalena do jemné buničiny, která vykazovala nulovou hodnotu slepého pokusu, a vložena do extraktoru. Dále bylo opět provedeno pět extrakcí při výše uvedených podmínkách, kde byl opět sledován pouze stav vzorku po ukončení extrakce. Bylo zjištěno, že výměna vzorku v extrakční cele po ukončení extrakce již probíhá bez problémů a proto byl dále používán výhradně tento postup.

#### Optimalizace doby statické extrakce

Pro nalezení doby statické extrakce potřebné pro kvantitativní extrakci bylo provedeno pět experimentů opět se vzorkem V 214, kde byly vždy provedeny celkem čtyři kroky statické extrakce s jedním vzorkem. První po dobu 10 min a další tři po 5 min. Navážený vzorek byl smíchan se stejným množstvím mořského písku a po zabalení do buničiny vložen do extrakční cely. Extrakce probíhaly při 140 °C, 10 MPa a s rozpouštědlovou směsí 2,5 % cyklohexanu v propan-2-olu. Výsledky těchto měření jsou následující:

Extrakční krok (doba)	1. (10 min)	2. (5 min)	3. (5 min)	4. (5 min)
Nalezeno [%]	2,46±0,12	0,63±0,07	0,36±0,05	0,12±0,04

Je vidět, že vyextrahované množství oleje ve čtvrtém kroku je ve srovnání s předchozími kroky malé a proto byla při dalších experimentech zvolena statická extrakce ve dvou 10 min krocích se zachytem do jedné sběrné nádoby. Aby to bylo možné, bylo třeba snížit spotřebu rozpouštědla během jednoho kroku tak, že byl zbylý prázdný objem v extrakční cele po vložení vzorku zaplněn skleněnými kuličkami o průměru 1 mm.

#### Gravimetrická analýza extraktů

Po ukončení extrakce bylo třeba ze získaných extraktů odstranit veškerá rozpouštědla, což lze provést několika způsoby. Buď odpařením na vodní lázni nebo odfoukáním v proudě inertního plynu. Druhý zmíněný způsob je sice šetrnější vzhledem ke zkoumaným analytům, ale trvá nepoměrně déle. Vzhledem k tomu, že stanovovaný olej je při bodech varu použitých rozpouštědel (v obou případech je to okolo 83 °C) tepelně stabilní, byl použit první zmíněný postup. Postupováno bylo tak, že záchytná nádoba s extraktem byla umístěna na vodní lázeň a veškeré rozpouštědlo bylo odpařeno. V momentě, kdy zbývalo odpařit přibližně 1 ml rozpouštědel, byla tato vodní lázeň sundána z vařiče a zbylé rozpouštědlo se nechalo samovolně odpařit. Záchytná nádoba s vyextrahovaným olejem pak byla na 30 min umístěna do horkovzdušné sušárny vyhřáté na teplotu 85 °C a po zchladnutí zvážena. Množství vyextrahovaného oleje bylo vypočteno dle rovnice (1).

#### Analýza vzorků krystalického polystyrenu

Obsah oleje ve vzorcích krystalického polystyrenu byl stanoven gravimetricky po extrakci při optimalizovaných podmínkách. Extrakce probíhaly při 140 °C, 10 MPa, ve dvou 10 minutových statických krocích s rozpouštědlovou směsí 2,5 % cyklohexanu v propan-2-olu a se zachytem do jedné sběrné nádoby. Extrahováno bylo vždy množství cca 1 g vzorku, který pak byl smíchan v poměru 1:1 s mořským pískem a zabalen do papíru. Výsledky jsou uvedeny v tabulce II.

V této tabulce jsou rovněž uvedeny i hodnoty získané pomocí extrakce v Soxhletově extraktoru prováděné *n*-pentanem po dobu 40 hodin s následnou gravimetrickou koncovkou. Tyto analýzy byly prováděny výrobcem analyzovaných vzorků.

Tabulka II

Srovnání zrychlené extrakce rozpouštědlem (140 °C, 10 MPa, 2×10 min, rozpouštědlová směs 2,5 % cyklohexanu v propan-2-olu) s extrakcí v Soxhletově extraktoru pro izolaci olejů ze vzorků krystalického polystyrenu

Vzorek	Nalezeno [%]	
	Soxhlet	ASE <sup>a</sup>
V 106	0,48	0,72±0,15
V 114	0,70	0,72±0,08
V 126	0,70	0,90±0,01
V 136	0,47	1,11±0,15
V 214	3,00	3,19±0,17
V 224	1,94	2,53±0,02
V 325	2,72	3,22±0,40
K 562a	2,52	2,52±0,14
K 562b	3,52	2,52±0,12
K 149 <sup>b</sup>	–	3,10±0,14
K 171 <sup>b</sup>	–	0,82±0,08

<sup>a</sup> Výsledky jsou průměrnými hodnotami z pěti extrakcí, <sup>b</sup> u těchto vzorků nebyl výrobcem uveden obsah oleje

## Závěr

Práce ukázala, že zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE) poskytuje při extrakci oleje z krystalického polystyrenu výsledky srovnatelné s dosud používanou extrakcí v Soxhletově extraktoru, ale v mnohem kratším čase a při menší spotřebě organických rozpouštědel.

V této práci byl ze vzorků krystalického polystyrenu extrahován medicínský olej, který se do těchto polymerů přidává pro zlepšení jejich zpracovatelnosti. Olej byl po optimalizaci jednotlivých parametrů extrahován při 140 °C, 10 MPa ve dvou 10 min statických krocích s rozpouštědlovou směsí 2,5 % cyklohexanu v propan-2-olu se záchytem do jedné sběrné nádoby. Vzorek byl před extrakcí smíchán s mořským pískem v poměru 1:1 a zabalen do jemné buničiny, což velmi usnadňovalo jeho následnou výměnu.

Při gravimetrické analýze extraktů bylo zjištěno, že zkoumaná metoda poskytuje srovnatelné výsledky s extrakcí v Soxhletově extraktoru i pro extrakci olejů z krystalického polystyrenu. Doba samotné extrakce je 20 min, což je mnohem méně, než doba extrakce v Soxhletově extraktoru, která činila 40 h. Rovněž spotřeba rozpouštědel je zde snížena přibližně na objem 25 ml na vzorek, což současně zkracuje dobu nezbytnou pro gravimetrickou analýzu.

Na základě výše uvedených faktů lze říci, že metoda zrychlené extrakce rozpouštědlem je schopná plně nahradit dosud používané extrakční techniky pro extrakci olejů z polymerních materiálů a díky své rychlosti umožňuje i rychlejší kontrolu kvality vyráběných polymerů a tím i rychlejší odhalení možných poruch při jejich výrobě.

*Práce byla provedena za podpory GA ČR 203/99/0044 a VS 96058.*

## LITERATURA

1. Dionex Corporation: *Better Solution for Food and Beverage Analysis*, 2. vyd. Dionex, Sunyvale 1997.

2. Dean J. R.: *Extraction Methods for Environmental Analysis*. Wiley, Chichester 1998.
3. Korba T.: *Extrakce organických polutantů z půd, kalů a pevných odpadů dle EPA 3545*. Sborník semináře „Příprava vzorků pro chemickou analýzu III“, Radějov u Strážnice 1998.
4. U.S. EPA: *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Method 3545, SW-846, Update III*. U.S. GPO, Washington DC 1995.
5. Perry R. H., Green D. W., Maloney J. O.: *Perry's Chemical Engineers Handbook*. McGraw-Hill, New York 1984.
6. Richter B. E., Jones B. A., Ezzel J. L., Porter N. L., Avdalovic N., Pohl C.: *Anal. Chem.* 68, 1033 (1996).
7. Sekine T., Hasegawa Y.: *Solvent Extraction Chemistry*. Marcel Dekker, New York 1997.
8. Majors R. E.: *LC-GC Int.* 14, 638 (1996).
9. Richter B. E., Ezzel J. L., Roberts K. A., Later D. W.: *Am. Lab.* 27, 24 (1995).
10. Ventura K.: *Příprava vzorku ve stopové analýze organických látek, extrakce kapalinou, plynem, sorbentem, superkritická fluidní extrakce a chromatografie*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1995.
11. Lou X., Jensen H. G., Cramers C. A.: *Anal. Chem.* 69, 1598 (1997).

**K. Ventura, M. Adam, and P. Válková** (*Department of Analytical Chemistry, University of Pardubice, Pardubice*): **Extraction of Oil from Samples of Crystalline Polystyrene by Accelerated Solvent Extraction**

Oil was removed from crystalline polystyrene by accelerated solvent extraction. Optimized extraction parameters (temperature, pressure, sample amount, sample pretreatment, extraction time, solvent type and its amount) were used for the purpose. The oil content in extracts was determined by gravimetric analysis. The obtained results were compared with those using Soxhlet extractors.

## FÁZOVÉ ROVNOVÁHY SÍRANU AMONNO-HLINITÉHO V ROZTOCÍCH PŘI SANACI CHEMICKÉ TĚŽBY URANU

JAROSLAV NÝVL<sup>a\*</sup>, JIŘÍ HOSTOMSKÝ<sup>a</sup>,  
VĚRA HOSTOMSKÁ<sup>a</sup> a VÍT PAVELKA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav anorganické chemie, Akademie věd České republiky, 250 68 Řež u Prahy, e-mail: nyvlt@iic.cas.cz, <sup>b</sup>Spolchemie a. s., 400 68 Ústí nad Labem

Došlo dne 9.XII.1999

Klíčová slova: fázové rovnováhy, síran amonný, síran hlinitý, síran železitý, kyselina sírová, kamenec amonný

### Úvod

Hydrochemická těžba uranu *in situ* pomocí vyluhovacích vrtů vedených z povrchu jako alternativa ke standardní podzemní hornické těžbě byla u nás zavedena v letech 1968–1992 v lokalitě Stráž pod Ralskem. Bez ohledu na devastaci životního prostředí bylo do podzemí vpraveno téměř 4 miliony t  $H_2SO_4$ , na 300 tis. t  $HNO_3$  a řádově stejné množství amonných iontů, čímž byly zejména ohroženy tamní významné zásoby pitných vod. Celková výsledná solnost kyselých důlních vod je způsobena hlavně síranovými, hlinitými, železitými/železnatými a amonnými ionty. Na základě vládního usnesení z roku 1992 dochází k útlumu chemické těžby a je zahájen rozsáhlý program sanace, který potrvá po dobu minimálně dvou desetiletí s celkovými náklady přesahujícími 30 miliard Kč. Program sanace má několik etap. Ve druhé etapě by měl být k zahuštěným roztokům přicházejícím z podzemí přidáván síran amonný, aby bylo dosaženo stechiometrického poměru  $NH_4^+$  a  $Al^{3+}$  iontů a ve vakuových krystalizátorech pak bude krystalizovat dodekahydrát síranu amonno-hlinitého  $NH_4Al(SO_4)_2$ , který tedy bude hlavním produktem při přepracování roztoků v rámci sanace chemické těžby uranu. Pro zabezpečení technologie je nutno na základě literárních dat i vlastního výzkumu vytvořit soustavu základních fyzikálně-chemických a chemicko-inženýrských dat týkajících se krystalizace kamence amonno-hlinitého. Patří sem především fázové rovnováhy v systémech síran amonno-hlinitý–síran amonný–síran hlinitý–kyselina sírová–síran amonno-železitý–voda v širokém rozmezí koncentrací a teplot.

Cílem této práce je zpracování literárních dat o fázových rovnováhách v nejdůležitějších dílčích systémech síranu amonno-hlinitého uplatňujících se při asanaci podzemních výluhů při chemické těžbě uranu.

### Teoretická část

Z termodynamické podmínky pro fázovou rovnováhu mezi tuhou a kapalnou fází lze odvodit základní vztah<sup>1</sup>, který lze pro tříložkový systém upravit na tvar:

$$\log \frac{x_1 y_2}{x_2 y_1} = \varphi_1 - \varphi_2 \quad (1)$$

nebo

$$K = \frac{y_2 x_1}{y_1 x_2} \approx \frac{p_2^1 p_1^2}{p_1^1 p_2^2} \quad (2)$$

kde  $K$  je distribuční koeficient. Tyto rovnice tvoří základ pro metodu rozvoje relativních aktivitních koeficientů<sup>1</sup>.

Jsou-li rozpuštěné složky disociovány a mají společný anion, lze z rovnice (1) odvodit vztah<sup>1</sup>

$$\frac{1}{v_1} \log \left[ \left( X_1 + X_2 \frac{m_{20}}{m_{10}} \right)^{v_1-} X_1^{v_1+} \right] - \log y_1 = \varphi_1 \quad (3)$$

platící pro popis rozpustnosti složky 1, přičemž funkce  $\varphi_1$  lze aproximovat rozvojem

$$\varphi_1 = Q_{12} m_2 + Q_{122} m_2^2 + \dots \quad (4)$$

Řešení této rovnice je poměrně komplikované, ale pro uspokojivý popis systému, ve kterém se netvoří tuhé roztoky, ji lze zjednodušit<sup>1</sup> na tvar

$$\frac{1}{v_1} \log \left[ \left( X_1 + X_2 \frac{m_{20}}{m_{10}} \right)^{v_1-} X_1^{v_1+} \right] = \varphi_1 \quad (5)$$

Jestliže studované složky tvoří v celém koncentračním rozsahu tuhé roztoky s neomezenou mísitelností v tuhé fázi, můžeme předpokládat<sup>1-3</sup>, že obdobnými vztahy lze empiricky popsat i složení tuhé fáze.

Jestliže dochází k tvorbě podvojných solí, metoda rozvoje relativních aktivitních koeficientů přechází na tvar<sup>4</sup>

$$\frac{1}{a_1 + b_1 + g_1 + h_1} \log \left[ \left( X_1 + \frac{a_2}{a_1} X_2 \right)^{a_1} X_1^{b_1} X_2^{g_1} \left( X_1 + \frac{h_2}{h_1} X_2 \right)^{h_1} \right] =$$

$$= Q_{12} m_2 + Q_{122} m_2^2 \quad (6)$$

kde koeficienty  $a_1$  a  $a_2$  značí počet společných kationtů ve složkách 1 a 2,  $b_1$  počet rozdílných kationtů ve složce 1,  $g_1$  počet rozdílných aniontů ve složce 1 a  $h_1$  resp.  $h_2$  počet společných aniontů ve složkách 1 a 2.  $X_i$  značí relativní molalitu  $i$ -té složky vztaženou na její rozpustnost ve vodě.

\* Podrobné tabulky dat a výsledky hydratační analýzy jsou k dispozici u autorů

## Data a jejich zpracování

Rozpustnosti čistých složek tvořících síran amonno-hliní-  
tý ve vodě v závislosti na teplotě byly převzaty z tabulek<sup>5</sup>  
a jsou vyjádřeny rovnicemi

$$\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2: \log x = -80,63512 + 2402,164/(T + 273,15) + \\ + 28,39789 \log (T + 273,15) \quad (7)$$

$$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3: \log x = -72,84785 + 3100,222/(T + 273,15) + \\ + 24,54281 \log (T + 273,15) \quad (8)$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4: \log x = -8,41382 + 222,1496/(T + 273,15) + \\ + 2,685048 \log (T + 273,15) \quad (9)$$

Pro fázové rovnováhy v systému  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{--Al}_2(\text{SO}_4)_3\text{--H}_2\text{O}$  byly nalezeny údaje pro teplotu 25 °C v literatuře<sup>6,7</sup>, pro teploty 0, 25, 50, 75 a 90 °C v literatuře<sup>8</sup> a pro teploty 30, 40 a 60 °C v literatuře<sup>6</sup>. Výsledky výpočtu a porovnání s experimentálními hodnotami jsou znázorněny na obr. 1 a 2.

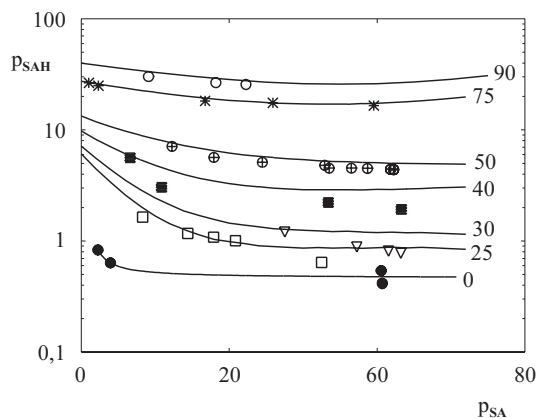
V literatuře<sup>10</sup> byly nalezeny hodnoty rozpustnosti síranu amonno-hliníového ve vodných roztocích kyseliny sírové při 30 °C, v práci<sup>11</sup> při teplotách 20 a 30 °C. Data byla doplněna vlastním měřením<sup>12</sup> při teplotách 25, 30, 40, 50 a 60 °C a několika body při vyšších teplotách. Zatím co izotermní data v literatuře byla získávána analytickou metodou, stanovení při vyšších teplotách byla prováděna syntetickou polytermní metodou a vykazují větší rozptyl (obr. 3).

V literatuře<sup>7</sup> byly nalezeny údaje o fázové rovnováze v systému síran amonno-hliníový–síran amonno-železitý–H<sub>2</sub>O při 25 °C.

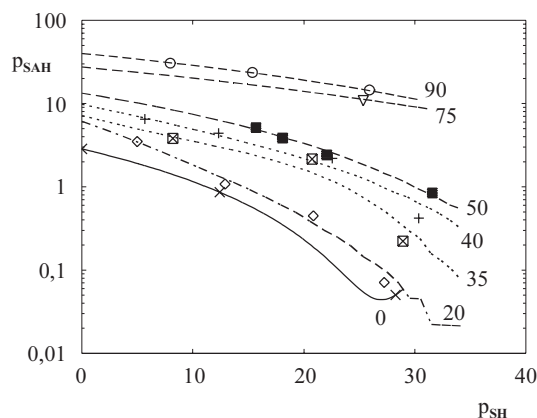
## Výsledky zpracování dat

Hodnoty konstant  $Q$  systémů síran amonno-hliníový–síran amonno-železitý–voda a síran amonno-hliníový–síran hliníový–voda stanovené postupem podrobně popsaným v monografii<sup>1</sup> jsou uvedeny v tabulce I. Jak bylo možno očekávat, mají absolutní hodnoty interakčních konstant  $Q$  s rostoucí teplotou klesající tendenci.

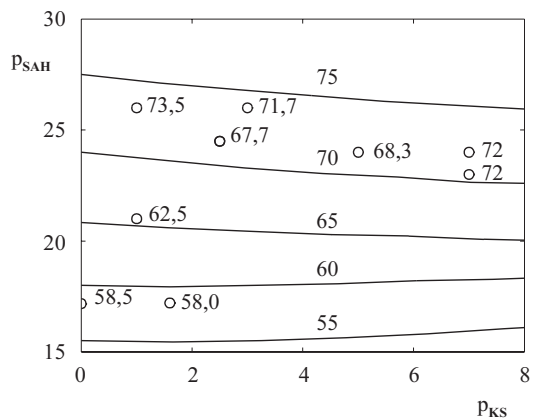
Obdobným způsobem byly vypočteny interakční konstanty systému síran amonno-hliníový–kyselina sírová–voda (tab. II) a systému síran amonno-hliníový–síran amonno-železitý–voda v tomto případě se ukázalo, že zatímco pro rozpustnost tuhé fáze v roztoku nasyceném síranem amonno-hliníovým bylo možno uspokojivě zpracovat všechna data, zpracování dat o složení tuhé fáze dávalo použitelné konstanty pouze pro uvedené vybrané hodnoty, zatímco pro ostatní body byly výsledky rozdílné a značně rozptýlené. Označuje-li index 1 síran amonno-hliníový a index 2 síran amonno-železitý v kapalné fázi, dostáváme pro vyhodnocení složení kapalné fáze nasycené složkou 1 konstanty  $Q_{12}^* = 0,5203822$ ,  $Q_{122} =$



Obr. 1. Rozpustnost síranu amonno-hliníového (SAH) v roztocích síranu amonnoho (SA)



Obr. 2. Rozpustnost síranu amonno-hliníového (SAH) v roztocích síranu hliníového (SH)



Obr. 3. Polytermní data rovnováhy síran amonno-hliníový–kyselina sírová–voda a jejich vyrovnání metodou rozvoje relativních aktivních koeficientů

$-0,2509605$ , a pro výpočet odpovídajícího složení tuhé fáze  $Q_{12} = 0,2326636$  a  $Q_{122} = -0,1331672$ .

\* Konstanty jsou uváděny na plný počet vypočtených míst. Vzhledem ke složité závislosti dané vztahem (3) resp. (6) by případné zaokrouhlení mohlo vést k horšímu vystižení závislosti.

Tabulka I

Hodnoty interakčních konstant  $Q$  síranu amonno-hlinitého ve vodných roztocích síranu amonného a síranu hlinitého

$T$ [°C]	Systém ALAS–SA–H <sub>2</sub> O		Systém ALAS–SH–H <sub>2</sub> O	
	$Q_{12}$	$Q_{122}$	$Q_{12}$	$Q_{122}$
0	0,3508854	-0,03030142	1,434151	-0,792496
25	0,2355117	-0,01950545	0,5798548	-0,3859894
30	0,2176214	-0,01740949	0,7121069	-0,3927404
40	0,1895511	-0,013775201	0,4075232	-0,1740108
50	0,1614808	-0,01014892	0,2438685	-0,1077782
75	0,05687488	0,009157112	0,07406823	0
90	-0,01282468	0,01927143	-0,1000000	0,030000

Tabulka II

Interakční konstanty  $Q$  systému síran amonno-hlinitý–kyselina sírová–H<sub>2</sub>O

$T$ [°C]	$Q_{12}$	$Q_{122}$	$Q_{1222}$	Pramen dat
20	0,6419676	-0,3811565	0,0726740	3
25	0,5770921	-0,3082100	0,0554983	vlastní měření
30	0,5254287	-0,2902007	0,0567978	3
	0,4898426	-0,2410185	0,0418761	2
	0,4625706	-0,2245395	0,0397830	vlastní měření
40	0,3358683	-0,1309507	0,0206475	vlastní měření
50	0,1837431	-0,0255506	0	vlastní měření
55	0,170	-0,0150	0	interpolace
60	0,1545808	-0,0195539	0	vlastní měření
65	0,110	-0,010	0	extrapolace
70	0,080	-0,0018	0	extrapolace
75	0,070	-0,0010	0	extrapolace

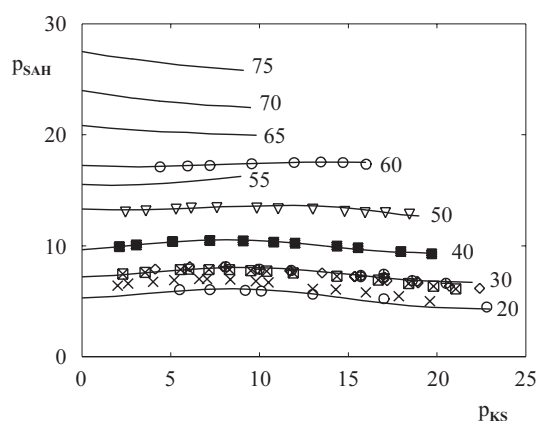
Výsledky výpočtu jsou znázorněny na obr. 4 (kamenec–kyselina sírová–voda) a obr. 5 (kamenec hlinitý a železitý).

Ze známých konstant  $Q$  je pak možno z rovnice (5) resp. (6) zpětně vypočítat vyrovnané hodnoty rozpustnosti složky 1 pro zvolenou koncentraci složky 2.

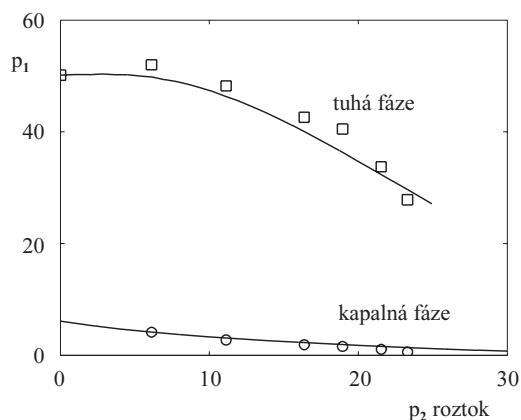
## Diskuse a závěry

Jak je patrné z obr. 1, síran amonný snižuje rozpustnost síranu amonno-hlinitého až do koncentrace síranu amonného 20 %, vyšší koncentrace jsou už bez výrazného vlivu. Rovněž s rostoucí teplotou vliv síranu amonného klesá. Vliv síranu hlinitého na rozpustnost síranu amonno-hlinitého (obr. 2) naopak s rostoucí koncentrací síranu hlinitého nabývá na intenzitě, zejména při nižších teplotách. Při kladné hodnotě  $Q_{12}$  a záporné hodnotě  $Q_{122}$  stechiometrický přebytek druhé složky má na roztok složky 1 destruktační efekt (narušuje hydratační sféru složky 1).

Pro zpracování literárních údajů v systému síran amonno-



Obr. 4. Rozpustnost v systému síran amonno-hlinitý [SAH]–kyselina sírová [KS]–H<sub>2</sub>O; jednotlivé křivky jsou vypočtené pomocí vztahu (6)



Obr. 5. Složení odpovídající fáze jako funkce koncentrace síranu amonno-železitého v kapalné fázi

-hlinitý–kyselina sírová–voda byla použita data získaná pro koncentrace kyseliny sírové pod 23 %. Data s vyšší koncentrací kyseliny se pomocí vztahu (5) s uvedenými konstantami  $Q$  nepodařilo uspokojivě korelovat, což ukazuje na složitější druh interakce mezi oběma složkami a rovněž na větší nepřesnost dat. Rovněž v práci<sup>3</sup> bylo zjištěno, že se charakter rozpustnosti při koncentracích kyseliny sírové nad 30 % mění: rozpustnost do cca 8 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mírně stoupá, od 8 do 32 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> klesá, prochází minimem a při vyšších koncentracích kyseliny opět stoupá. Jak je patrné z tabulky II, mají absolutní hodnoty interakčních konstant  $Q$  s rostoucí teplotou klesající tendenci. To bylo možno očekávat, protože s rostoucí teplotou se chování roztoku blíží chování ideálnímu. Do teplot kolem 50 °C je k vystižení rozpustnosti zapotřebí tří konstant, při vyšších teplotách je konstanta  $Q_{122} = 0$  a vystačíme tedy pouze se dvěma konstantami. Konstanty platící pro teploty nad 60 °C byly získány grafickou extrapolací a jejich použitelnost ověřena na polytermních datech, jak ukazuje obr. 3. Z hodnot interakčních konstant lze usuzovat<sup>7</sup>, že zejména při vyšších koncentracích kyseliny sírové dochází k destruktační roztoku, protože  $Q_{12} > 0$  a  $Q_{122} < 0$ . Kyselina sírová v koncentracích do 20 % neodebírání vodu z hydratační sféry kamence.

## Seznam symbolů

$a$	koncentrace [g/100 g H <sub>2</sub> O]
$a_i$	počet společných kationtů v složce $i$
$b_1$	počet rozdílných kationtů ve složce 1
$g_1$	počet rozdílných aniontů ve složce 1
$h_i$	počet společných aniontů ve složce $i$
$K$	distribuční koeficient
$m_i$	molalita $i$ -té složky [mol/kg H <sub>2</sub> O]
$m_{0i}$	rozpuštěnost čisté $i$ -té složky ve vodě [mol/kg H <sub>2</sub> O]
$p, p_i$	koncentrace [hm. %]
$Q$	interakční konstanta
$T$	teplota [°C]
$w_i$	koncentrace
$X$	relativní molalita
$x_i$	molární zlomek $i$ -té složky v kapalně fázi
$X_i$	relativní molalita $i$ -té složky
$x$	molární zlomek
$y_i$	molární zlomek $i$ -té složky v tuhé fázi
$v_i$	počet iontů v molekule $i$ -té složky
$\phi_i$	funkce definovaná vztahem (4)

ALAS, SAH	síran amonno-hlinitý
FELAS	síran amonno-železitý
SA	síran amonný
SH	síran hlinitý

Autoři děkují za podporu této práce Grantové agentuře České republiky, číslo grantu 203/99/1222.

## LITERATURA

- Nývlt J.: *Rovnováhy tuhé fáze–kapalina*, str. 28. Academia, Praha 1975.
- Nývlt J., Majrich A., Kočová H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **35**, 165 (1970).
- Nikl S., Nývlt J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **41**, 2657 (1976).
- Nývlt J.: *Cryst. Res. Technol.* **30**, 1065 (1995).
- Broul M., Nývlt J., Söhnel O.: *Tabulky rozpustnosti anorganických látek ve vodě*. Academia, Praha 1979.
- Linke F. W., Seidell A.: *Solubilities of Inorganic and Metallorganic Compounds*. Nostrand, New York 1958.
- Hill A. E., Kaplan N.: *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 550 (1938).
- Urazov G. G., Kindjakov P.S.: *Tr. Mosk. Inst. Tonkoi Khim. Tekhnol.* **7**, 81 (1958).
- Funaki K.: *Bull. Tokyo Inst. Technol. Ser. B*, No. 1 (1950).
- Bretsznajder S., Kotowska W.: *Przem. Chem.* **11**, 285 (1955).
- Žúžiová A., van Viet, Khandl V., Fellner P.: *Chem. Papers* **49**, 173 (1995).
- Pavelka V.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 1995.

**J. Nývlt<sup>a</sup>, J. Hostomský<sup>a</sup>, V. Hostomská<sup>a</sup>, and V. Pavelka<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež u Prahy*, <sup>b</sup>*Spolchemie Comp., Ústí n. L.*): **Phase Equilibria in Aluminium Ammonium Sulfate Solutions in Decontamination of Chemical Extraction of Uranium**

Literature data on and own measurements of phase equilibria in the systems aluminium ammonium sulfate–ammonium sulfate–water, aluminium ammonium sulfate–aluminium sulfate–water, aluminium ammonium sulfate–sulfuric acid–water, and aluminium ammonium sulfate–ammonium ferric sulfate–water were elaborated. Data correlation using the method of relative activity coefficient expansion made it possible to work up the data in a wide range of temperatures. Hydration analysis showed different behaviour of the systems.

## UNIVERZÁLNÍ ELEKTROANALYTICKÝ SYSTÉM

MICHAL DŘEVÍNEK<sup>a</sup> a FRANTIŠEK TROJÁNEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>UNESCO Satelitní centrum pro stopové prvky, Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, e-mail: Michal.Drevinek@hornet.cz, <sup>b</sup>Katedra chemické fyziky a optiky, Matematicko-fyzikální fakulta, Univerzita Karlova, Ke Karlovu 3, 120 00 Praha 2, e-mail: trojjanek@karlov.mff.cuni.cz

Došlo dne 18.XII.1999

Klíčová slova: voltametrie, polarografie, elektrochemický analyzátor

## Úvod

Vývoj instrumentace pro polarografii a voltametrii má v českých zemích dlouholetou tradici, počínající sestrojením prvního polarografu Heyrovským a Shikatou<sup>1</sup> v roce 1925. Od té doby byla vyvinuta celá řada typů přístrojů, od mechanických s hodinovým strojem coby „řídící jednotkou“ přes elektronkové z 50.–60. let až po systémy s operačními zesilovači<sup>2</sup>, které posunuly možnosti elektroanalytické chemie do oblastí stopové a ultrastopové analýzy<sup>3</sup>. Se zavedením operačních zesilovačů a s tím souvisejícím obnovením zájmu o voltametrické techniky v 70. letech se vývoji voltametrické instrumentace začala věnovat celá řada zahraničních firem. Bohužel, počátkem 90. let, kdy začalo prudké pronikání výpočetní techniky do mnoha oborů lidské činnosti, došlo u nás zároveň v souvislosti s rozpadem podniku Laboratorní přístroje k ukončení vývoje voltametrické instrumentace a implementace výpočetní techniky se v tomto směru většinou omezila pouze na nahrazení analogových záznamových zařízení počítačem<sup>4,5</sup>.

Jediným dostupným systémem, který alespoň částečně využil možností výpočetní techniky nejen pro akvizici dat, ale i pro řízení experimentu, byl voltametrický analyzátor Eko-Tribo Polarograf<sup>6</sup> firmy Polaro-Sensors (Praha). Použití tohoto analyzátoru je však značně limitováno – jak malým počtem využitelných voltametrických technik, tak nemožností připojení a řízení různých periferních zařízení. Proto byl na základě tohoto přístroje vytvořen zcela nový elektroanalytický systém, vyznačující se maximální univerzálností a vysokým stupněm automatizace.

## Experimentální část

## Požadavky na systém

Vzhledem k široké škále používaných elektrochemických technik, typů elektrod, uspořádání měření a možnostem jejich kombinací bylo nutno definovat určité základní požadavky, které musí moderní elektroanalytický systém splňovat.

Voltametrie je nejčastěji používána pro stanovení kovů

(v analýze životního prostředí, klinické analýze, chemickém průmyslu). Oproti spektrálními metodám (atomové absorpční spektrometrii s plamenovou nebo elektrotermickou atomizací, atomové emisní spektrometrii) vykazuje celou řadu výhod – nižší detekční limity, možnost stanovení různých oxidačních stavů, nízké provozní náklady. Nevýhodou je však delší doba analýzy, která komplikuje použitelnost voltametrických technik v laboratořích s větším počtem zpracovávaných vzorků. Proto je nutné, aby systém umožňoval plnou automatizaci měření a s ní úzce související možnost měření v průtokovém uspořádání. To zároveň vyžaduje ovládání periferních zařízení (ventilů, čerpadla, dávkovače vzorků apod.). Další možností, jak zkrátit dobu analýzy, je implementace rozpouštěcí chronopotenciometrie (PSA), která nevyžaduje časově náročné odstranění rozpuštěného kyslíku; navíc je tato technika málo citlivá k rušivým vlivům povrchově aktivních látek přítomných ve většině reálných matric, což zjednodušuje předúpravu vzorku.

Pro studium mechanismů elektrochemické redukce organických sloučenin je nezbytná možnost práce se rtuťovou kapající elektrodou (RKE), kdy je signál oproti práci s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE) mnohem méně ovlivněn adsorpčními jevy. Při stanovení organických látek je často nutné použít některé separační metody (např. HPLC) k oddělení analytu od ostatních komponent vzorku – systém proto musí umožňovat měření s časovou základnou, aby ho bylo možné použít jako elektrochemický detektor.

Trendem v konstrukci laboratorních přístrojů spojených s počítačem je minimalizace ovládacích prvků a komunikační rozhraní je realizováno virtuálním přístrojovým panelem<sup>6</sup>. Vzhledem k velkému množství možných variant potenciálových programů a celých měřících sekvencí musí být nezbytnou součástí přístroje možnost vytvoření libovolného uživatelského profilu, který řídí průběh měření. Pro návrh těchto profilů je třeba vytvořit uživatelsky příjemné grafické rozhraní, které nebude po obsluze vyžadovat znalost množství příkazů a jejich syntaxe. Zároveň je zcela zřejmé, že systém musí podporovat multitasking (paralelní zpracování procesů) a zachovat tak během měření využitelnost počítače i k jiným účelům (vyhodnocování dříve naměřených dat, zpracování textových a databázových souborů apod.).

## Úprava hardware

Jako základ přístroje byl použit Eko-Tribo polarograf firmy Polaro-Sensors, na kterém bylo provedeno několik zásadních změn a řada drobných úprav.

Stávající karta pro ISA sběrnici s AD/DA převodníky byla nahrazena rychlou multifunkční kartou pro akvizici dat PCI-9111HR (ADLink Technology Inc., Tchajwan). Tato 16-bitová karta pro PCI sběrnici vybavená FIFO pamětí umožňuje vzorkování dat s frekvencí až 110 kHz (doba konverze 8 μs); analogový výstup je použit pro řízení potenciostatu/galvanostatu a 16 digitálních výstupů pro ovládání periférií.

Analogová část systému byla rozšířena o galvanostat a zapojení proudového sledovače je upraveno tak, aby podle použité techniky mohl pracovat buď jako převodník proud–napětí, nebo jako napěťový sledovač. Zároveň byly přidány obvody pro úpravu TTL signálů řídících některá periferní zařízení.

Pro měření v průtokovém uspořádání byl systém doplněn

o 20-místný karuselový zásobník vzorků a peristaltické čerpadlo PCD-22 s externím ovládáním, sloužící k transportu vzorku ze zásobníku do elektrochemické cely. Ventil pro ovládání přívodu inertního plynu byl nahrazen elektricky řízeným trojcestným ventilem v teflonovém provedení (Cole-Parmer, USA), kterého je možno použít i pro kontrolu průtoku kapalin.

Z důvodu zachování maximální jednoduchosti systému jsou výstupní digitální signály ovládající míchátko a ventil

přívodu inertního plynu použity v průtokovém uspořádání pro řízení jiných periférií. Míchátko, které zajišťuje v klasickém uspořádání stripping analýzy transport analytu k pracovní elektrodě, je v průtokovém měření nahrazeno činností čerpadla; proto i ovládací signály pro míchátko mohou být použity pro řízení čerpadla. Odstranění kyslíku z roztoku, které je v případě stacionární elektrochemické cely realizováno probubláním inertním plynem, je v průtokovém uspořádání založeno na průchodu kyslíku semipermeabilní membránou do

Obr. 1. Okno Návrh metody s následujícím výběrem metody pro stanovení Cd a Pb v pitné vodě technikou DPASV na HMDE

Obr. 2. Okno Měření s nastavením parametrů pro stanovení Cd a Pb v pitné vodě technikou DPASV na HMDE



prostoru s nulovým parciálním tlakem  $O_2$  během transportu vzorku k elektrodě<sup>7</sup>. Proto lze ventil a jeho řídicí signál použít např. pro promývání systému mezi jednotlivými vzorky nebo k výměně elektrolytu po akumulaci analytu na pracovní elektrodě.

#### Řídicí software

Pro řízení systému bylo vytvořeno ve vývojovém prostředí Delphi 4.0 (Borland) zcela nové programové vybavení, pracující jako 32-bitová aplikace pod operačními systémy Microsoft Windows 95/98. Celý program je kvůli přehlednosti koncipován do několika základních oken:

Hlavní okno slouží k zadání identifikace a popisu vzorku a vstupu některých základních hodnot použitých pro výpočet při hodnocení (měřený objem, alikvotní objem, koeficient ředění, navážka apod.). Zároveň lze v tomto okně vybrat metodu měření nebo provést návrh nové metody. Programování systému je řešeno zcela originálním způsobem – návrh metody je realizován jako sekvence jednotlivých akcí, které jsou v postupném pořadí skládány ve formě ikon vybíraných z nástrojové lišty (obr. 1). Akcím potenciálu, času a proudu lze přiřadit reálné hodnoty a jejich kombinací tak vytvářet libovolné metody. Stejným způsobem je umožněna tvorba libovolného potenciálového programu, takže lze pracovat nejenom klasickými technikami na RKE s řízenou dobou kapky (tast, diferenční pulsní a normální pulsní polarografie) nebo stacionárních elektrodách (DC, cyklická, normální pulsní, diferenční pulsní a square-wave voltametrie, stripping techniky), ale provádět i méně běžná elektrochemická měření (pseudoderivativní pulsní polarografii, potenciometrickou stripping analýzu, pulsní amperometrickou detekci, studium elektrokapilárních křivek, coulometrii za konstantního potenciálu a pod.).

Okno Měření je kombinací virtuálního přístrojového panelu a displeje, na kterém jsou v reálném čase zobrazována měřená data. Z tohoto okna lze zároveň manuálně ovládat některé prvky systému. Okna Křivky, Série a Parametry obsahují funkce pro editaci a zpracování naměřených dat, definování a editaci sérií měření a nastavení některých parametrů (potenciálové a časové rozlišení, testovací podmínky měření, nastavení pracovních adresářů apod.). Výsledky měření, zpracovávané v okně Hodnocení, mohou být uváděny včetně intervalu spolehlivosti, což urychluje zpracování dat a zároveň eliminuje případné chyby v systému analýz. Pro vyhodnocování křivek, majících charakter vlny, byla vytvořena funkce „2 základních linií“ k odečtení výšky vlny při hodnotě půlvl-

nového potenciálu. Součástí systému je i integrovaná kontextová nápověda, usnadňující obsluhu práci s přístrojem.

#### Závěr

Byl navržen a zkonstruován generačně nový typ elektroanalytického systému. Na rozdíl od dosud dostupné instrumentace, koncipované jako kompaktní systémy s několika předdefinovanými technikami, se popsaný přístroj vyznačuje maximální otevřeností a univerzálností. Vysoký stupeň automatizace a snadný princip jeho programování umožňují jeho široké využití jak v provozních laboratořích, tak v oblasti výzkumu a výuky.

#### LITERATURA

1. Heyrovský J., Shikata M.: *Rec. Trav. Chim.* 44, 496 (1925).
2. Kalvoda R.: *Operational Amplifiers in Chemical Instrumentation*. E. Horwood, Chichester 1975.
3. Vydra F., Štulík K., Juláková E.: *Rozpouštěcí polarografie a voltametrie*. SNTL, Praha 1977; *Electrochemical Stripping Analysis*. E. Horwood, Chichester 1976.
4. DataApex: *Program Polar* – firemní materiál, Praha 1990.
5. Metelka R., Švancara I., Strelec M., Dušek F., Vytřas K.: *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A* (1999), v tisku.
6. Polaro-Sensors: *Eko-Tribo Polarograf* – firemní materiál, Praha 1991.
7. Opekar F.: *Chem. Listy* 89, 590 (1995).
8. Trojánek A., Holub K.: *Anal. Chim. Acta* 121, 23 (1980).

**M. Dřevínek<sup>a</sup> and F. Trojánek<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*UNESCO Trace Element Satellite Center, J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, <sup>b</sup>*Department of Chemical Physics and Optics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Prague*): **A Universal Electroanalytical System**

A new computer-controlled electroanalytical system suitable for the training requirements at schools as well as for performing routine analyses in laboratories is described. Programming of the system, based on graphically oriented interface, allows to simply create user-defined profiles and to use a wide range of electroanalytical techniques, including polarography on DME, various stripping techniques on HMDE and solid electrodes, chronopotentiometric and chronoamperometric measurements, etc.

## VÝUKA CHEMIE

### POMOCNÉ PROSTŘEDKY PŘI VÝUCE ORGANICKÉ CHEMIE I

FRANTIŠEK LIŠKA

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: Frantisek.Liska@vscht.cz

„Co učit a jak to učit?“, to je otázka, kterou řeší učitelé všech disciplin. Učitelé chemie nejsou výjimkou. Jedním z prvních, který definoval smysl a cíl výuky organické chemie je Friedrich August Kekulé (1883), který říká: „...*Strukturální vzorce jsou konkrétním vyjádřením velmi přesných představ. Nevyžadují komentáře a jsou pro toho, kdo je seznámen s principy řeči vzorců, snadno srozumitelné ve všech detailech, takže je naprosto nepotřebné zopakovat ještě jednou slovy myšlenky, které jsou jimi vyjádřeny. Vyhovují všem požadavkům, které lze mít na řeč chemických vzorců; je totiž účelem řeči vzorců uvést nás do stavu, v němž můžeme na malém prostoru přivést k vyjádření velký počet myšlenek, a to jednoznačným způsobem...*“

Za zmínku stojí rovněž vzpomínka absolventa naší školy a našeho ústavu Vlada Preloga<sup>1</sup>, který se stal v roce 1975 nositelem Nobelovy ceny za chemii, na svého učitele Rudolfa Lukeše: „...*Předtím, než jsem poznal Lukeše, připadala mi organická chemie jako sbírka nesčíslných sloučenin a reakcí, které se musím naučit zpaměti, aby bylo možné v této oblasti pracovat. Lukeš mi zpřístupnil cennou systematiku organické chemie a organizaci její literatury, která umožňuje nejenom seřazení a zapamatování známého, ale i překročení hranic a proniknutí do neznámého...*“

Vlastní výuka organické chemie spočívá stále na přednáškách, na seminářích a na laboratorních cvičeních. Pronikají však do ní stále důmyslnější a efektivnější (ne vždy efektivnější) didaktické pomůcky. Ty plní svůj význam tehdy, jsou-li využívány smysluplně a pro dokreslení vysvětlovaného problému, který by měl učitel prezentovat křídou (fixem) na tabuli tak, aby student mohl vzorce tvořit současně s ním. „*Porozumět řeči vzorců*“ totiž znamená, dostat je „do ruky i do hlavy“. Zásada učíme se psaním (writing-to-learn) platí zejména při výuce chemie, jak o tom svědčí i konference nazvaná Writing as a Tool for Teaching Chemistry<sup>2</sup>.

Jednou z metod, které se využívá při výuce snad všech disciplin<sup>3</sup>, je mnemotechnika. Jestliže mnemonika (řec.  $\mu\upsilon\epsilon\mu\omicron\upsilon\tau\kappa\omicron\sigma$ ) je naukou o paměti, potom mnemotechnika je „souborem způsobů a postupů usnadňujících zapamatování vytvářením umělých asociací, umělých spojení představ. Používá se čísel, veršů, rýmů, spojení se známým pořadím předmětů a pod.“<sup>4</sup>

Má však význam uvádět často nesmyslné větné konstrukce do tak logické disciplíny jako je chemie, zvláště, když už v definici mnemotechniky je zahrnuto varování před tím, že „nezdokonaluje paměť, pouze usnadňuje zapamatování a často může být škodlivá, poněvadž nahrazuje logické zapamatování mechanickým“<sup>4?</sup>

Ano, má to smysl, je-li mnemotechnika používána účelně a přiměřeně a zvláště jestliže oživuje danou disciplínu a když pomáhá učitelům i studentům zvýšit jejich výkon, obratnost a profesionální odbornost. Potom má své místo ve všech disciplínách<sup>3</sup>, tedy i v chemii, protože k tomu, „*aby si student zapamatoval nějakou informaci, musí být tato informace spojena s něčím, co už zná, nebo co si už pamatuje, a to způsobem třeba komickým a legračním. ...Vždyť paměť je mostem mezi podržením myšlenky a mezi její následnou aplikací*“<sup>5</sup>.

Koneckonců i studenti, potenciální chemici, dříve než začnou pronikat do logických souvislostí své disciplíny, si musí zapamatovat řadu výrazů a pojmů, mezi nimiž lze jen stěží hledat nějaké logické souvislosti. Jsou to např. názvy prvků v Mendělejevově tabulce, triviálních názvů karboxylových kyselin, aminokyselin, monosacharidů atd.

Mnemotechnické pomůcky jsou v chemické pedagogické literatuře publikovány v podobě krátkých sdělení či poznámek a některé z nich pronikají i do učebnic. Souhrnný přehled o mnemotechnikách v různých oblastech chemie publikoval De Loach<sup>6</sup>. Týkají se např. značek lanthanoidů, termodynamických funkcí, monosacharidů, triviálních názvů mono- a dikarboxylových kyselin, plynových zákonů, energie orbitalů, barev indikátorů, názvů esenciálních aminokyselin atd. Zároveň však upozorňuje, že mnoho mnemotechnik vůbec publikováno není a že se předávají z generace na generaci ústním podáním. Některé z nich jsou dokonce nepublikovatelné.

Z nedávno publikovaných mnemotechnik si zaslouží citaci ty, které se týkají jednotek SI<sup>7</sup>, metrického systému<sup>8</sup>, definic molárního množství<sup>9</sup> a mnemotechniky navržené pro elektronové konfigurace atomů<sup>10,11</sup>, pro odhad elektronegativit atomů<sup>12,13</sup> a mnemotechnické diagramy pro termodynamické vztahy<sup>14–17</sup>.

Snad nejznámější jsou říkánky určené k zapamatování si značek prvků Mendělejevovy tabulky („snadno a rychle, křížem krážem“). Např. pro prvky 5. skupiny

N, P, As, Sb, Bi  
Va, Nb, Ta,

se traduje *naš pan vážený asistent nebojácně sbaštil talíř bifteků*. Česká lidová tvořivost na toto téma byla souborně zpracována několika autory<sup>18</sup> a říkánky se objevily i v některé ze středoškolských učebnic<sup>19</sup>. Zajímavý je postřeh jednoho<sup>18b</sup> z autorů: „*Čím nesmyslnější je prűpovídka, tím spíš utkví v řídkém mozgovém sítu studentů. ... téměř vždy si žáci zapamatovali variantu méně logickou.*“

Mezi poměrně obtížné partie při výuce chemie patří redox reakce<sup>20</sup> a tak se k zapamatování definičního vztahu redox dějů uvádí často akronym **LEO the lion says GER** – *Loss of Electrons is Oxidation, Gain the Electrons is Reduction*<sup>6</sup>.

K rozpoznání kladné elektrody – anody od elektrody záporné – katody může začátečníkům pomoci mnemotechnika „česky **ano**, rusky **da**“<sup>21</sup>.

Snad největší počet pomocných výukových prostředků

spadá do oblasti organické chemie. Lze je rozdělit na encyklopedické a technické.

Do skupiny **encyklopedických** prostředků se řadí ty, které se zaměřují na triviální názvosloví a na definiční vztahy.

Studenti se vedle systematického názvosloví učí také řadu triviálních názvů, které jsou mnohem zajímavější, příjemnější pro vzájemnou komunikaci a pro výuku o konkrétních sloučeninách. Nejvíce takovýchto názvů je z oblasti karboxylových kyselin, aminokyselin a aromatických sloučenin. Etymologie jejich názvů, které se často odvozují z řečtiny či z latiny, obráží jejich původ, barvu, chuť, vůni a jiné charakteristiky<sup>22,23</sup>. K zapamatování si takovýchto triviálních názvů se s oblibou používají různé říkanky a akronymy.

Pro pořadí triviálních názvů mastných kyselin o sudém počtu uhlíkových atomů lze využít toho, že počáteční písmena jejich anglických názvů sledují abecedu: **a**cetic (C<sub>2</sub>), **b**utyric (C<sub>4</sub>), **c**aproic (C<sub>6</sub>), **c**aprylic (C<sub>8</sub>), **c**apric (C<sub>10</sub>), **l**auric (C<sub>12</sub>), **m**yristic (C<sub>14</sub>), **p**almitic (C<sub>16</sub>) a **s**tearic (C<sub>20</sub>). Další homologické kyseliny abecedou zase začínají – **a**rachidic (C<sub>22</sub>) a **b**ehenic (C<sub>24</sub>)<sup>24</sup>.

Správné pořadí alkanových kyselin začínajících stejným písmenem – kyseliny **k**apronová (C<sub>6</sub>), **k**aprylová (C<sub>8</sub>) a **k**aprinová (C<sub>10</sub>), jejichž slovní základ je odvozen od kozy<sup>25</sup> (lat. *capra* = koza) zajišťuje mnemotechnika „**O**h **m**y **e**ye“<sup>26</sup> nebo **ON-YL-IN**<sup>27</sup>.

Pro anglické názvy dikarboxylových kyselin existuje mnemotechnika „**O**h **m**y **s**uch **g**ood **a**pple **p**ie **s**erve **a** slice“, v níž každé slovo začíná prvním písmenem triviálních názvů kyselin **O**xalic, **M**alonic, **S**uccinic, **G**lutaric, **A**dipic, **P**imelic, **S**uberic, **A**zelaic, **S**ebacic<sup>28</sup>.

Pořadí anglických názvů esenciálních aminokyselin – (**A**rginine, **H**istidine), **I**soleucine, **L**eucine, **T**hreonine, **L**ysine, **M**ethionine, **P**henylalanine, **T**ryptophan a **V**aline – zpřístupňuje věta *Any help in learning these little molecules proves trully valuable*<sup>28</sup>.

K pojmenování homologické sloučeniny odvozené od sloučeniny základní s triviálním názvem se používají předpony **homo** a **nor**. Předpona **homo** slouží k vytvoření názvu sloučeniny bohatší o skupinu CH<sub>2</sub>, např. homoserin/serin, homocystein/cystein, schéma 1.

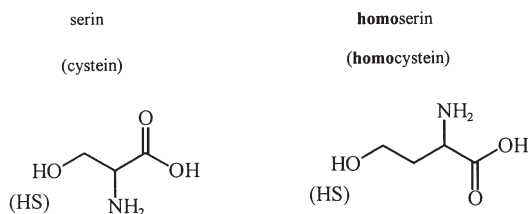


Schéma 1

naproti tomu předpona **nor** vyjadřuje úbytek skupiny CH<sub>2</sub> z molekuly sloučeniny

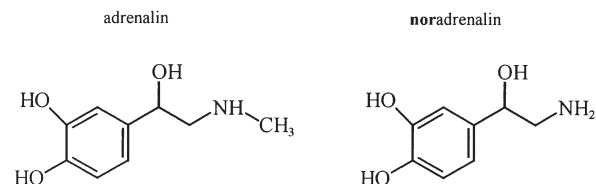


Schéma 2

základní a lze ji „číst“ také jako „**N** ohne **R**“, jak je patrné z příkladu adrenalinu a noradrenalinu, schéma 2. Zajímavá je aplikace obou dvou předpon při odvození názvu **9-homonoradamantu**<sup>28</sup>, konstitučního isomeru adamantanu, která, vyjádřena matematicky a konstitučními vzorci by mohla vést k mylnému závěru, že 1 + (-1) ≠ 0, schéma 3.

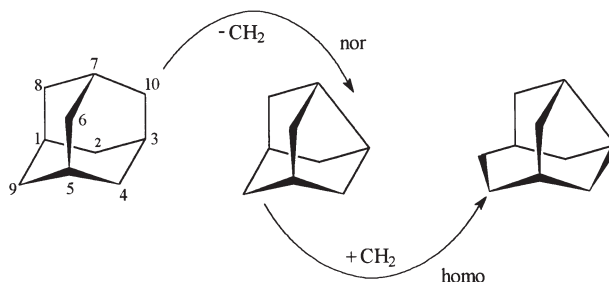


Schéma 3

Zkratka **Organizace spojených národů – OSN** – pomáhá určit směr číslování a tím i posloupnost číselných hodnot lokantů v heterocyklických sloučeninách s několika různými heteroatomy v molekule<sup>30</sup>, jak je patrné z příkladu isoxazolu (1,2-oxazolu), thiazolu (1,3-thiazolu) a morfolinu, schéma 4.

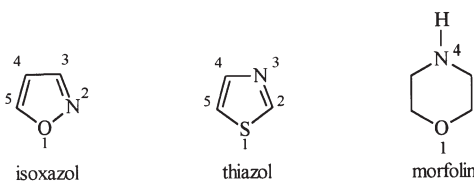


Schéma 4

V základním kursu organické chemie<sup>31</sup> se při výkladu regioselectivity reakcí uvádějí mj. dvě základní empirická pravidla; pro adiční reakce to je pravidlo Markovnikovo, které říká, že „*při adici nesymetrických molekul na olefiny se aduje těžší částice na uhlík s menším počtem vodíkových atomů, tj. tam, kde má více místa*“, a pro eliminační reakce je to zase pravidlo Zajcevovo, podle kterého „*při dehydrataci sekundárních nebo terciárních alkoholů se odštěpuje hydroxylová skupina spolu s vodíkem z toho sousedního uhlíku, který má menší počet vodíkových atomů, takže se získává nejvíce alkylovaný olefin*“. Pro obě pravidla existuje mnemotechnika. Zatímco pro Markovnikovo pravidlo ji lze publikovat snad jenom při přednáškách konaných na Silvestra a to ještě po 22. hodině, bývá Zajcevovo pravidlo uváděno také jako pravidlo sv. Matouše: „*Kdo má málo, tomu bude ještě vzato*“ („...wer aber nicht hat, dem wird auch, was er hat, genommen werden“)<sup>32</sup>, nepochybně proto, že v evangeliu sv. Matouše lze v 25. kapitole v podobenství o hřivnách, odst. 29 číst: „*Nebo každému majícímu bude dáno, a bude více mít, od nemajícího pak i to, což má, bude odjato*“<sup>33</sup>.

Jako konkrétní příklady pravotočivých sloučenin si lze zapamatovat **alanin**, **pinen** a **kafr** podle mnemotechniky **AL-PIN-KA**<sup>27</sup>.

Pro zapamatování vitaminů rozpustných v tucích A, D, E, K slouží mnemotechnika **RADEK**; někteří dávají přednost malému začátečnímu písmenu z<sup>34</sup>.

Při určování struktur organických sloučenin je, kromě fyzikálně-chemických metod, stále významná elementární analýza, z níž lze vypočítat souhrnný vzorec  $C_xH_yN_zO_n$  a z něho pak i celkový počet dvojných vazeb a kruhů (tzv. ekvivalent dvojných vazeb a kruhů), nebo tzv. stupeň nenasyčenosti DU (Degree of Unsaturation) pomocí vzorce<sup>35,36</sup>.

$$DU = x - y/2 + z/2 + 1$$

Jsou-li v molekule přítomny atomy křemíku, přičítají se k atomům uhlíku, atomy halogenů se přičítají k atomům vodíku, atomy fosforu k atomům dusíku a pod. Tak např. stupeň nenasyčenosti DU pro molekulu 2-nitronaftalenu je 8 (pět dvojných vazeb, dva šestičlenné cykly a jedna vazba N=O), schéma 5.

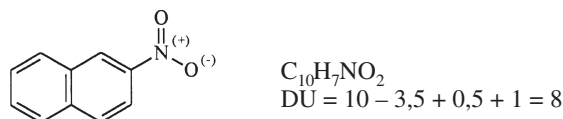


Schéma 5

Pro rychlé vytvoření správného systematického názvu polycyklických organických sloučenin s můstky lze předcházející obecný vzorec upravit na vzorec<sup>37</sup>

$$r = 1 + 1/2t + q$$

kde  $r$  je počet kruhů (ve skutečnosti DU),  $t$  je počet terciárních atomů (CH) a  $q$  je počet kvarterních atomů přítomných v základní sloučenině bez substituentů a funkčních skupin. V polycyklických systémech s heteroatomy se počítá s O a s NH skupinami jako se sekundárními methylenovými skupinami ( $CH_2$ ), s N a  $O^+$  jako s terciárními (CH) a s  $N^+$  jako s kvarterními uhlíkovými atomy. Jako příklad lze uvést příklady ve schématu 6.

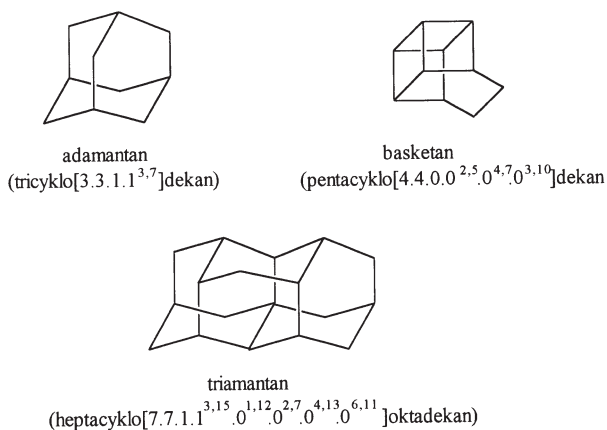


Schéma 6

Při výuce lze rovněž využít skupinové trivální názvy sloučenin vycházející z podobnosti jejich struktury s různými objekty či předměty<sup>29</sup>. Pro příklad lze uvést **rotaxany**<sup>38</sup>, molekuly, v jejichž struktuře se pohybuje „kolo“ (lat. *rota*) jedné

molekuly na „hřídeli“ (axel), který tvoří jiná lineární molekula, schéma 7.

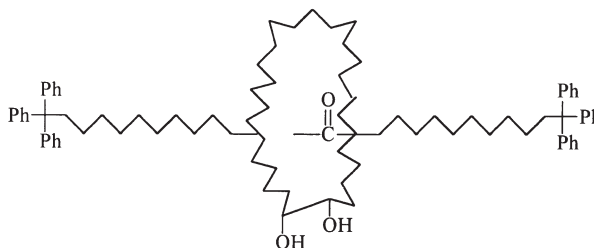


Schéma 7

Dalším příkladem jsou **kalixareny**<sup>29,39</sup>, cyklické oligomery derivátů fenolu s formaldehydem, jejichž konformace připomíná kalich (řecky *calix*, anglicky *chalice* a arene, aromatica složka), schéma 8. Systematický název calix[4]arenu je podle Chemical Abstracts pentacyklo[19.3.1.1<sup>3,7</sup>.1<sup>9,13</sup>.1<sup>15,9</sup>]octacosan-1(25),3,5,7(28),9,11,13(27),15,17,19(26),21,23-dodecane-25,26,27,28-tetraol – a je tedy pro běžnou komunikaci mezi chemiky zcela nepoužitelný.

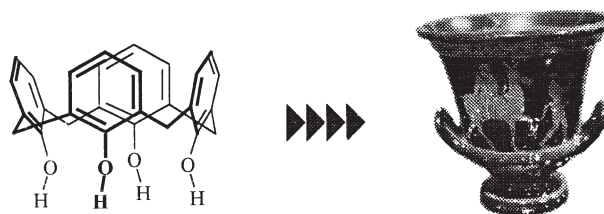


Schéma 8

Jedna z teorií stereoelektronického řízení průběhu chemických reakcí se nazývá **Antiperiplanar Lone – Pair Hypothesis**<sup>40</sup>. Vzniklý akronym **ALPH**<sup>29</sup> má stejný slovní tvar jako je název posvátné řeky, která se objevuje ve verši básně Kubla Khan jednoho z tzv. jezerních básníků, Samuela Taylora Coleridgeho (1772–1834):

*Where Alph, the sacred river, run  
Through caverns measureless to man,*

kteřou do češtiny přebásnil Zdeněk Hron<sup>41</sup> pod názvem Kublajchán aneb Vidění ve snu:

V Xanadu Kublajchán si dal  
postavit palác vznešený:  
*posvátný Alph tam protékal  
labyrint skrytý v nitru skal*  
do moře věčné tmy.

Do skupiny **technických** pomocných výukových prostředků lze zařadit takové, které jsou spojeny se stereochemií organických sloučenin, jako např. s převody perspektivních (prostorových) konfiguračních vzorců na konfigurační vzorce projekční (dále Fischerova projekce, Fischerovy vzorce).

Problémy s nimi mívají zejména studenti s horší prostorovou představivostí. Postup takového převodu lze ukázat na

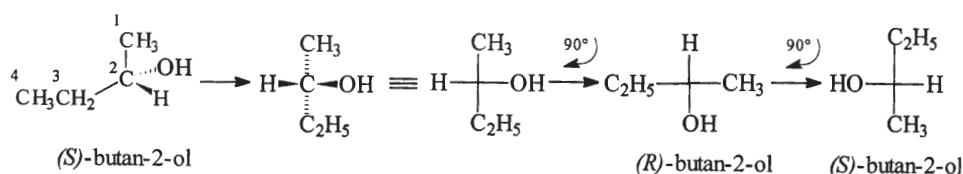


Schéma 9

příkladu enantiomeru butan-2-olu, schéma 9. Při něm se molekula v perspektivním konfiguračním vzorci orientuje rovinou, v níž leží dvě vazby (zpravidla tvořící uhlíkatý skelet) a jež vycházejí ze stereogenního centra, kolmo a svisle k rovině nánkresny tak, aby vazby směřovaly od pozorovatele a aby na horní vertikální vazbě byly atomy s nejnižším lokantem. Tyto vazby se pak promítají do vertikály a na jejich horním a spodním konci jsou pozorované atomy (substituenty, ligandy). Zbývající dvě vazby ležící v rovině kolmé k rovině vertikálních vazeb a směřující k pozorovateli se promítají do horizontály; substituent viděný vpravo se zapisuje na pravou, substituent viděný vlevo se píše na levou horizontální vazbu. Umístí-li se stereogenní centrum do roviny nánkresny, potom vertikální vazby směřují za nánkresnu, horizontální vazby před ní a v jejich průsečíku se nachází stereogenní centrum. Tato skutečnost se ve Fischerově projekci zpravidla nevyjadřuje. Z uvedené konvence potom plyne, že otočením molekuly ve Fischerově projekci o  $90^\circ$  v rovině nánkresny se získá Fischerova projekce stereoisomeru s opačnou konfigurací<sup>42</sup>, otočením o  $180^\circ$  se konfigurace stereogenního centra nezmění.

Popsaný převod trojrozměrné struktury do Fischerovy projekce je jednodušší nežli navrhovaná mnemotechnika<sup>43</sup>, podle níž se zvolí kterákoliv z dvou vazeb ležících v rovině a sleduje se pohyb substituentu (ligandu) ve valenčním úhlu  $<180^\circ$  směrem k druhému. Substituent (např. b), s nímž se zahajuje pohyb, se umísťuje ve Fischerově kříži na horní vertikální vazbu a substituent cílový na spodní vertikální vazbu. Na horizontální vazby Fischerova kříže se umísťují zbývající dva substituenty v závislosti na směru předchozího pohybu vazby ve zvolené rovině. Udál-li se pohyb ve směru chodu hodinových ručiček, umísťuje se na pravou horizontální vazbu ten,

kteří směřuje před zvolenou rovinu a na levou horizontální vazbu ten, který směřuje za tuto rovinu. Udál-li se pohyb proti směru chodu hodinových ručiček (a→b), je tomu naopak, schéma 10.

Studenti, kteří nemají dostatek kázně, aby kreslili vzorce molekul, zejména konfigurační a konformační perspektivní vzorce, mohou mít problémy se správným převodem produktů získaných v těchto vzorcích na konfigurační projekční vzorce (Fischerovy vzorce) nebo na konformační projekční vzorce (Newmanova projekce) a s vyjádřením správné relativní konfigurace produktů vzniklých při stereospecifických adicích na stereoisomerní alkeny (morfémy *erythro* a *threo*). Matematický součin znamének (+) a (–) jim umožní psát přímo Fischerovy vzorce se správnou relativní konfigurací na vicinálních uhlících. Označí-li si *trans*-alken, *trans* adici i *threo*-konfiguraci znaménkem např. (–) a *cis*-alken, *cis* adici a *erythro*- resp. *meso*-konfiguraci znaménkem (+), potom mohou psát produkty adice přímo ve Fischerových vzorcích. Tak např. při *trans*-adici bromu, (–), na *trans*-but-2-en, (–), se získává *erythro*- resp. *meso*-2,3-dibrombutan { (–) • (–) = (+) }, zatímco při *cis*-hydroxylaci, (+), téhož alkenu, (–), vzniká racemát konfigurace *threo*, (–), { (+) • (–) = (–) }, schéma 11.

I studenti, kteří prostorové vzorce kreslí pečlivě, mívají problémy s jejich převodem na Fischerovy projekční vzorce. Nedokáží se zrakem „pohybovat“ po uhlíkatém skeletu v jednom směru a pohlížet na valenční úhly zásadně z hlediska úhlu většího než  $180^\circ$  a tím orientovat uhlíkatý skelet do jedné roviny kolmé k nánkresně. Jakmile si upraví konformaci molekuly tak, aby uhlíkatý skelet byl v komplanním syn-periplanním uspořádání, potom se už bez problémů orientují ve vlastním nánkresu Fischerovy projekce, schéma 12.

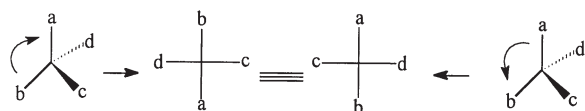


Schéma 10

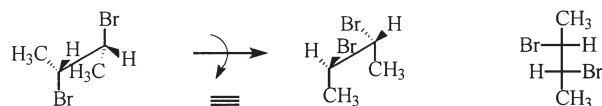


Schéma 12

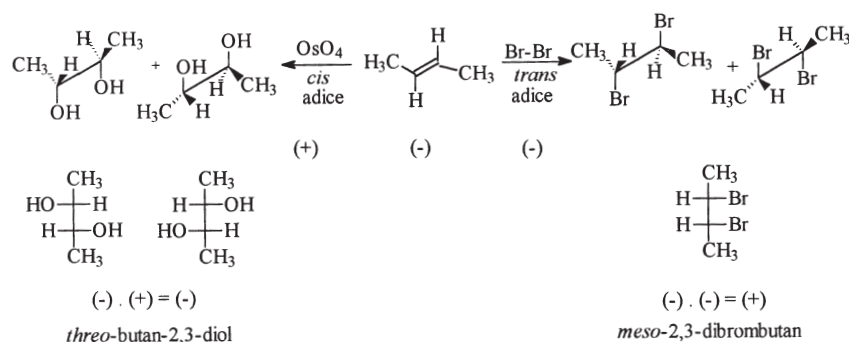


Schéma 11

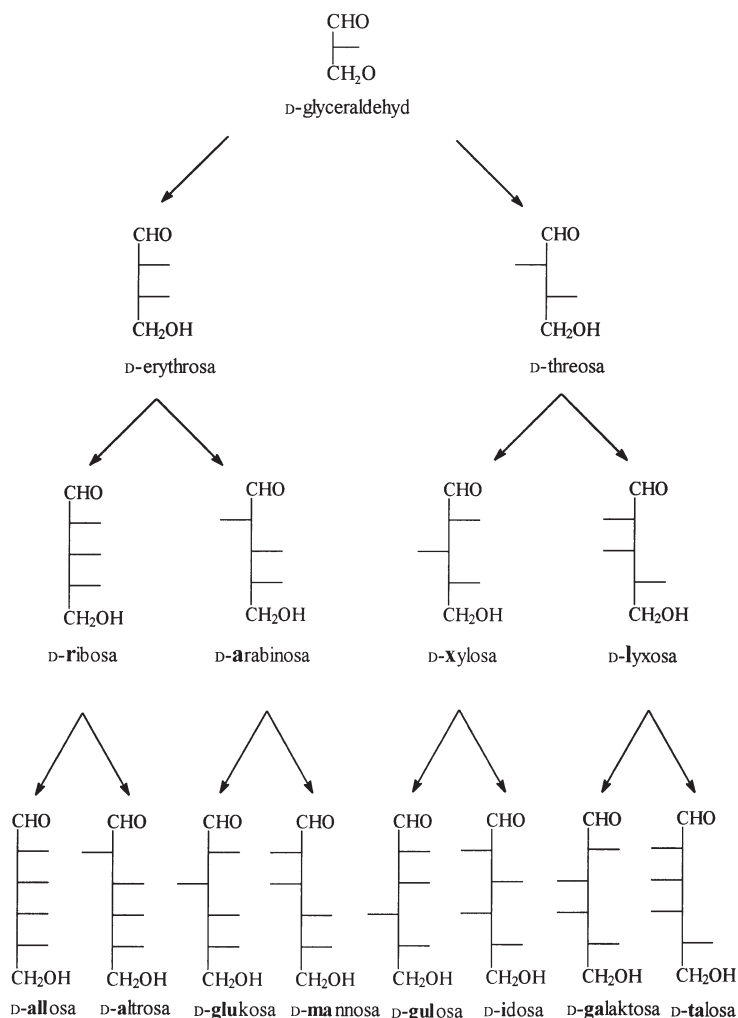


Schéma 13

Ve Fischerově projekci, nebo v Haworthových vzorcích se nejčastěji zobrazují molekuly monosacharidů. Jejich názvy se vytvářejí přidáním přípony -osa k morfemům, které vyjadřují relativní konfiguraci na dvou (*erythro, threo*), třech (*ribo, arabino, xylo* a *lyxo*) a čtyřech (*allo, altro, gluko, manno, gulo, ido, galakto, talo*) sousedních uhlíků, jak je patrné ze schématu 13, které vyjadřuje konfigurační souvislosti D-aldos.

Názvy tetros uvádí akronym **R•A•X•L**<sup>44</sup> (*ribo*, *arabino*, *xylo* a *lyxo*), pro aldohexosy zase akronym **ALL•A•-GLU•MA•GUL•I•GA•TA**<sup>45</sup>, reprezentující *allosu*, *altrosu*, *glukosu*, *mannosu*, *gulosu*, *idosu*, *galaktosu* a *talosu*, který se předává z generace na generaci. V obou případech jsou názvy řazeny po dvojicích epimerů tak, jak postupně vznikají myšlenkovou výstavbou z D-glyceraldehydu. Pro aldohexosy existují také mnemotechnické říkánky v angličtině (*All Altruists Gladly Make Gum in Gallon Tanks*)<sup>58</sup>, v němčině (*Alle alten Gänse möchten gern im Garten tanzen*)<sup>32</sup> ale i v češtině (*Alenka Altem Kluky Mámi, Kukadla Ideální Kádr Tají*)<sup>46</sup>.

„Fischerův“ konfigurační projekční vzorec D-glukosy se uvádí i v učebnicích na nižších stupních škol, ale bez patřičného stereochemického výkladu, a tak může být pro studenty užitečná mnemotechnická pomůcka vyjadřující *gluko* kon-

figuraci „zvukovou“ znělkou „*tá-ty-tá-tá*“<sup>47</sup> na uhlících ve směru lokantů 2, 3, 4 a 5; „signál“ **SOS**<sup>48</sup> zase vyjadřuje stejnou konfiguraci na uhlících ve směru lokantů 4, 3 a 2 ve vztahu ke konfiguraci na uhlíku 5 (*same, oposite, same nebo stejná, opačná a stejná*), schéma 14.

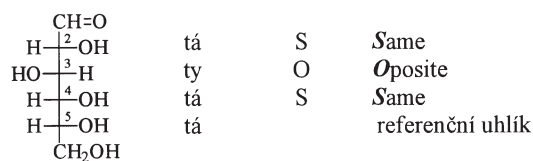


Schéma 14

Také při převodu Fischerových vzorců aldohexos či ketohexos na vzorce Haworthovy se uplatňuje mnemotechnika<sup>49,50</sup>. Snad nejrozšířenější je postup<sup>49</sup>, při němž se změnila poloha substituentů na stereogenním centru, jehož hydroxyl se účastní tvorby poloacetalové vazby tak, aby se nezměnila jeho absolutní konfigurace. To znamená, že se musí na stereogenním centru provést dvojnásobná vzájemná záměna substituentů. Jak je patrné z příkladu D-glukosy, provádí se na uhlíku

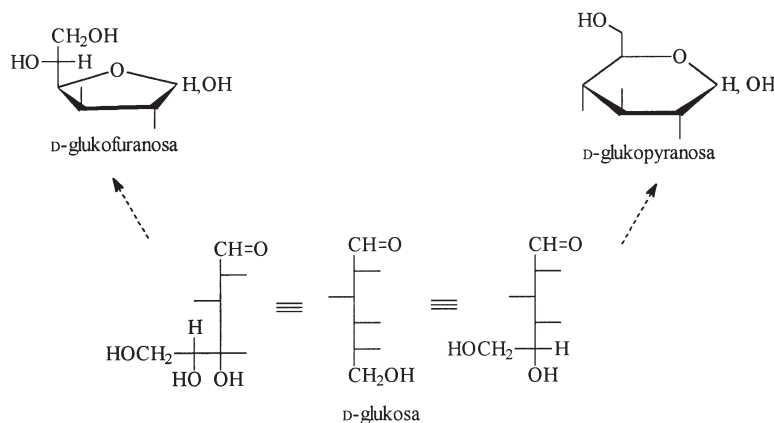


Schéma 15

5 při převodu na pyranosy a na uhlíku 4 při transformaci na furanosy.

Substituenty nebo atomy, které jsou u takto transformovaných vzorců **nalevo** se píšou do pyranosového či furanosového kruhu **nahoru**, substituenty směřující od uhlíkatého řetězce **doprava**, se píšou **dolů**, schéma 15.

Jiný návrh<sup>51</sup> neřadí aldohexosy po dvojicích enantiomerů (viz schéma 13), ale podle počtu substituentů směřujících nad pyranosový kruh a pod něj (viz schéma 16). Pořadí aldosa se vyjadřuje mnemotechnikou „*All guests gladly alter table manners into gaiety*“ (**al**losa, **g**ulosa, **g**lukosa, **al**troša, **t**alosa, **m**annosa, **i**doska, **g**alaktosa). Relativní konfigurace na uhlících 4, 3 a 2 pyranosového kruhu se poté vytvářejí tak, že u D-allosy směřují všechny hydroxylové skupiny dolů a postupně, v pořadí uhlíků 4→3→2 směřuje vždy jeden hydroxyl nad pyranosový kruh. Naproti tomu u druhé čtveřice směřují u D-talosa všechny hydroxylové skupiny nahoru a postupně v pořadí 4→3→2 na pyranosovém kruhu směřuje vždy jeden hydroxyl dolů. S pomocí uvedené mnemotechniky lze psát Haworthovy vzorce aldohexos přímo a je možno je přepsat na Fischerovy vzorce takovým způsobem, že se všechny hydroxylové skupiny, které v nich směřují nahoru, nakreslí ve Fischerově projekci nalevo uhlíkatého řetězce.

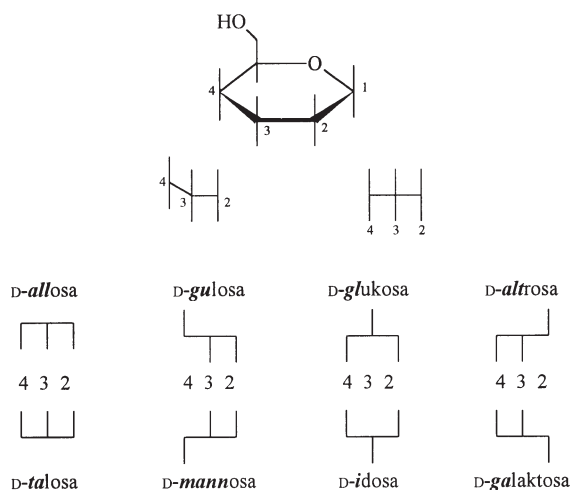


Schéma 16

Grafický náčrt hexopyranosových jednotek je poměrně složitý, zejména při kreslení struktur oligo- a polysacharidů. Proto je zajímavý návrh<sup>52</sup>, který takový náčrt značně zjednodušuje. Podle něj je pyranosový kruh reprezentován kroužkem, z něhož vychází pět vazeb; jedna váže hydroxymethylovou skupinu, ostatní čtyři váží skupiny hydroxylové. Vazby směřující nad rovinu hexopyranosového kruhu vystupují z vnitřní plochy kroužku, vazby směřující pod tuto rovinu se kreslí z obvodu kroužku, jak je patrné z příkladů  $\alpha$ -D-glukopyranosy (A),  $\beta$ -D-glukopyranosy (B),  $\alpha$ -maltosy<sup>53</sup> ( $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1→4)- $\alpha$ -D-glukopyranosy, ve zkrácené formě [ $\alpha$ -D-Glcp-(1→4)- $\alpha$ -D-Glcp]) (C) a  $\beta$ -cellobiosy ( $\beta$ -D-glukopyranosyl-(1→4)- $\beta$ -D-glukopyranosy, ve zkrácené formě [ $\beta$ -D-Glcp-(1→4)- $\beta$ -D-Glcp]) (D), schéma 17.

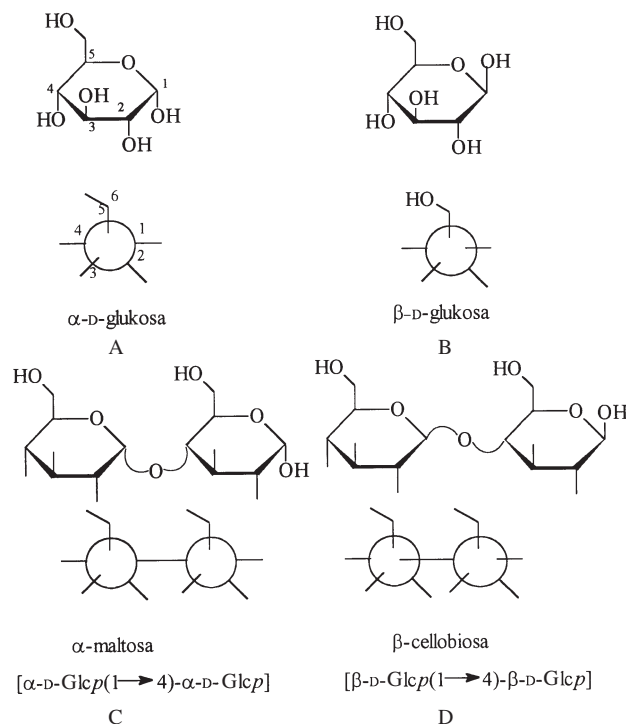


Schéma 17

## LITERATURA

1. Prelog V.: *Naturwissenschaftliche Rundschau* 38, 259 (1985).
2. Beall H., Trimbur J.: *J. Chem. Educ.* 70, 478 (1993).
3. Quigley M. N.: *J. Chem. Educ.* 69, 138 (1992).
4. *Příruční slovník naučný*. Academia, Praha 1966.
5. Lorayne H.: *Good Memory – Successful Student*. Stein and Day, Briarcliff Manor, New York 1973.
6. DeLoach W. S.: *J. Chem. Educ.* 37, 367 (1960).
7. Quigley M. N.: *J. Chem. Educ.* 68, 815 (1991).
8. Campbell M. L.: *J. Chem. Educ.* 68, 1043 (1991).
9. Brown B. S.: *J. Chem. Educ.* 68, 1039 (1991).
10. Parsons R. W.: *J. Chem. Educ.* 66, 319 (1989).
11. Iza N., Gil M.: *J. Chem. Educ.* 72, 1025 (1995).
12. Becker B.: *J. Chem. Educ.* 38, 42 (1961).
13. Cole G. M., Jr.: *J. Chem. Educ.* 62, 230 (1985).
14. Cohen I.: *J. Chem. Educ.* 40, 261 (1963).
15. Speyer D. M., Blank Z., Brenner W.: *J. Chem. Educ.* 46, 535 (1969).
16. Phillips J. M.: *J. Chem. Educ.* 64, 674 (1987).
17. Rodríguez J., Brainhard A. J.: *J. Chem. Educ.* 66, 495 (1989).
18. a) Matoušek J.: *Chem. Listy* 72, 398 (1978); b) Kamýček Z.: *Chem. Listy* 77, 424 (1983); c) Košťtř J.: *Věda a technika mládeži* 11, 18 (1986).
19. Kotlík B., Růžičková K.: *Chemie I v kostce* (pro střední školy). Fragment, Havlíčkův Brod 1966.
20. Liška F.: *Chem. Listy* 79, 485 (1985); *Biologie, Chemie, Zeměpis* 5, 24 a 71 (1996).
21. David V.: nepublikované sdělení.
22. Leung S. H.: *J. Chem. Educ.* 77, 48 (2000).
23. Duchoň J.: *Skalpel* (časopis spolku mediků českých) 2, 33 (1991).
24. Sumerford W. T.: *J. Chem. Educ.* 18, 346 (1941).
25. Jenšovský L.: *Chem. Listy* 73, 1273 (1979).
26. Hatt H. H.: *J. Chem. Educ.* 18, 196 (1941).
27. Ferles M.: soukromé sdělení
28. Hunter G. W.: *J. Chem. Educ.* 32, 584 (1955).
29. Nickon A., Silversmith E. F., knize: *Organic Chemistry: The Name Game*. Pergamon Press, New York 1987.
30. Hadáček J.: Přednášky z organické chemie na MU Brno.
31. Červinka O., Dědek V., Ferles M.: *Organická chemie*. SNTL, Praha 1969.
32. Fieser L., Fieser M.: *Organische Chemie*. Verlag Chemie, Weinheim 1965.
33. Bible svatá, podle posledního vydání Kralického z roku 1613, CEPF 7019 – 15M – 043X.
34. Káš S.: *Pilulky smíchu*. Melantrich, Praha 1982.
35. Pellegri V.: *J. Chem. Educ.* 60, 626 (1983).
36. Klemm Le Roy H.: *J. Chem. Educ.* 72, 425 (1995).
37. Srikrishna A.: *J. Chem. Educ.* 73, 428 (1996).
38. Bělohorský M., Raymo F. M., Stoddart J. F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 1 (1996).
39. Lhoták P.: *Chem. Listy* 92, 512 (1998).
40. Deslongchamps P.: *Tetrahedron* 31, 2463 (1975).
41. Jezerní básníci. Mladá fronta, Praha 1999.
42. Aronson J. N.: *J. Chem. Educ.* 61, 90 (1984).
43. Mandal D. K.: *J. Chem. Educ.* 77, 866 (2000).
44. Carey F. A.: *Organic Chemistry*. McGraw-Hill, New York 1996.
45. Lukeš R.: Přednášky z organické chemie na VŠCHT Praha.
46. Dědek V.: Přednášky z organické chemie na VŠCHT Praha.
47. Wittig G.: *Angew. Chem.* 72, 202 (1960).
48. Starkey R.: *J. Chem. Educ.* 77, 734 (2000).
49. Wheeler D. M. S., Wheeler M. M., Wheeler T. S.: *J. Chem. Educ.* 59, 969 (1982).
50. Argilés J. M.: *J. Chem. Educ.* 63, 927 (1986).
51. Hollenberg W. C. J.: *J. Chem. Educ.* 33, 622 (1956).
52. Robyt J. F.: *J. Chem. Educ.* 63, 560 (1986).
53. *Nomenclature of Carbohydrates (Recommendations 1996)*, *Pure Appl. Chem.* 82, 1919 (1996).



---

**OBSAH**

<b>ÚVODNÍK</b>	193
<b>REFERÁTY</b>	
<b>Chemie a alchymie v počítačové simulaci chování molekul</b> K. Huml a M. Kratochvíl	194
<b>Povrchová modifikácia súborov mikroelektród s interagujúcimi difúznymi vrstvami</b> P. Tomčík, D. Bustin a I. Novotný	198
<b>Sacharosa jako průmyslová surovina</b> J. Moravcová	202
<b>Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí</b> L. Chromá, M. Macková, T. Macek, V. Martínek a M. Stiborová	212
<b>LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY</b>	
<b>Extrakce olejů ze vzorků krystalického polystyrenu metodou zrychlené extrakce rozpouštědlem</b> K. Ventura, M. Adam a P. Válková	223
<b>Fázové rovnováhy síranu amonno-hlinitého v roztocích při sanaci chemické těžby uranu</b> J. Nývlt, J. Hostomský, V. Hostomská a V. Pavelka	227
<b>Univerzální elektroanalytický systém</b> M. Dřevínek a F. Trojánek	231
<b>VÝUKA CHEMIE</b>	234

---

**CONTENTS**

<b>EDITORIAL</b>	193
<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Chemistry and Alchemy of Computer Simulations of Molecular Behaviour</b> K. Huml and M. Kratochvíl	194
<b>Microelectrode Arrays with Interacting Diffusion Layers: Surface Modification</b> P. Tomčík, D. Bustin, and I. Novotný	198
<b>Sucrose as Raw Material</b> J. Moravcová	202
<b>Plant Cytochromes P450 and Peroxidases and Their Role in Degradation of Environment Contaminants</b> L. Chromá, M. Macková, T. Macek, V. Martínek, and M. Stiborová	212
<b>LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS</b>	
<b>Extraction of Oil from Samples of Crystalline Polystyrene by Accelerated Solvent Extraction</b> K. Ventura, M. Adam, and P. Válková	223
<b>Phase Equilibria in Aluminium Ammonium Sulfate Solutions in Decontamination of Chemical Extraction of Uranium</b> J. Nývlt, J. Hostomský, V. Hostomská, and V. Pavelka	227
<b>A Universal Electroanalytical System</b> M. Dřevínek and F. Trojánek	231
<b>EDUCATION IN CHEMISTRY</b>	234

**BULLETIN ČESKÝCH CHEMICKÝCH  
SPOLEČNOSTÍ**

**BULLETIN OF THE CZECH CHEMICAL  
SOCIETIES**

Průmyslová vážicí technika pro chemický průmysl	243	Industrial Weighing Technology for Chemical Industry	243
Odborná skupina pro výuku chemie České společnosti chemické	245	Working Group for Chemistry Teaching of Czech Chemical Society	245
Ze života chemických společností	247	From the Chemical Societies	247
Členská oznámení a služby	249	Member Services and Announcements	249
Z vědeckých, odborných a zahraničních společností	249	From the Learned, Professional and Foreign Societies	249
Evropský koutek	250	European Column	250
Výuka chemie	251	Chemistry Teaching	251
Osobní zprávy	251	Personal News	251
Střípky a klípky o světových chemících	253	Biographical Sketches of World Chemists	253
Technické zajímavosti a služby	253	Technical Information, Tips and Services	253
Zákony, které ovlivní život chemiků	256	Laws that Could Influence Life of Chemists	256
Knihy a literatura	257	Books and Literature	257
Poezie	258	Poetry	258
Zajímavosti ze světa vědy a techniky	258	News from Science and Technology	258
Aprílový klub	259	Club of Jokes	259
Odborná setkání	260	Meetings and Conferences	260
Akce v ČR a v zahraničí	261	Meetings Calendar	261
Zprávy z redakce a dopisy redakci	264	News from Editorial Office	264
Bulletín představuje	264	Bulletin Presents	264
Oznámení	264	Announcements	264
Volná místa	265	Jobs	265
Noví členové ČSCH	265	New Members of CCS	265
Výročí a jubilea	265	Anniversaries and Jubilees	265

**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 95 (2001), čís./no. 4 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 125, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 111 • ČASOPIS ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ • Bulletin roč./vol. 32 • Vydává Česká společnost chemická ve spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze, s Českou společností průmyslové chemie a Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR, za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt PG 97142), Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Gut, J. Hetflejš, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke, M. Bláhová (Bulletin), M. Ferles (Bulletin), B. Valter (Bulletin), I. Valterová (Bulletin), R. Liboska (webové stránky), P. Zámstný (webové stránky) • ZAHRAIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), J. Soušek (Olomouc), J. Šibor (Brno) • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: C. Jirátořová • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, M. Drdák, J. Hanika, J. Churáček, Č. Jech, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ, INZERCI, INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY A PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420(2) 2108 2370, fax +420(2) 2222 0184, e-mail: jiratova@csvts.cz, IČO 444715 • SOUHRNY NA INTERNETU/PREPUBLISHED ABSTRACTS ON URL: [http://staff.vscht.cz/chem\\_listy/index.html](http://staff.vscht.cz/chem_listy/index.html) • TISK: PORS 052, Školní náměstí 11, 537 33 Chrudim; SAZBA: SF SOFT, Jinonická 329, 158 00 Praha 5 • Copyright © 2001 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 100 Kč, roční předplatné 2001 (12 čísel) 1034 Kč. Předplatné ve Slovenské republice 2310 Kč. Pro členy ČSCH je sleva 50 %, pro studenty 70 % • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2001 (12 issues) DEM 440 • Podávání novinových zásilek povoleno ČP s.p. OZ VČ, č.j. PP/I 5333/95 • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use. • Pokyny pro autory najdete v čísle 7/97 na straně 492, nebo budou zaslány na požádání, zkratky odb. časopisů viz 10/97 str. 911 • Instructions for authors will be sent on request. • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zaslány 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. SAZBA BULLETINU: B. Valter, SEKRETARIÁT ČSCH: Novotného lávka 5, tel., fax +420(2) 2222 0184, e-mail: mblahova@csvts.cz**