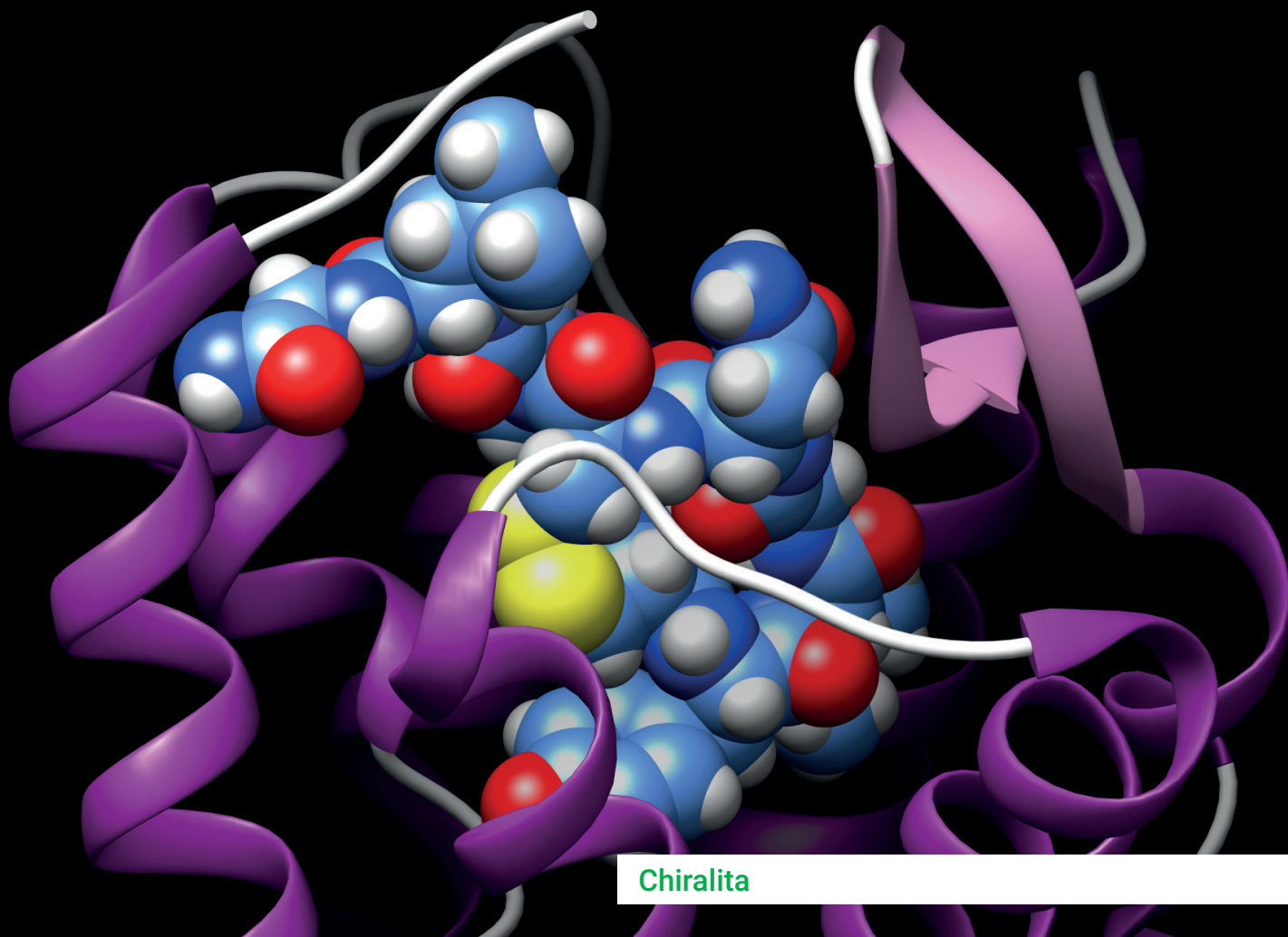


Chemické Listy

11

ročník • 117



Chiralita

Vitamin E

MS násobných vazeb v lipidech

Online kurz radiochemie





75. sjezd chemických společností

Vážení čtenáři,

úvodník Chemický listů, který se vám právě dostává do rukou, nebude věnován článkům otištěným v tomto čísle našeho časopisu, nýbrž vrcholné společné akci České společnosti chemické (ČSCH) a Slovenskej chemickej spoločnosti (SCHS), tj. 75. sjezdu chemiků. Úvodem si dovoluji vyslovit troufalý předpoklad, že snad i většina umělců, kteří se v televizních diskusích rádi chlubí svými neuvěřitelnými nedostatky v matematice, by dokázala odpovědět na jednoduchou otázku (téměř patřící do pořadu TV Prima „Nikdo není dokonalý“), zda poslední číslice v letošním letopočtu je sudá nebo lichá. Ano správně, máme lichý rok. A snad každý člen ČSCH, stejně jako SCHS ví, že v lichém roce je nejvýznamnější akce obou společností pořádána na Slovensku. Slovenští pořadatelé se drželi tradice a stejně jako ve čtyřech předchozích případech vybrali pro sjezd luxusní Bellevue Grand Hotel ve Starém Smokovci na úpatí Vysokých Tater.

Naštěstí nezasáhl negativně ani Covid-19, ani jiná nakažlivá choroba, ba ani se neprojevil jiný negativní vnější zásah, v jehož důsledku by se účastníci museli setkávat jen zprostředkovaně prostřednictvím kamer a monitorů počítačů. Tedy díky všem uvedeným i neuvedeným okolnostem jsme se mohli vidět přímo „tváří v tvář“ a k naší velké radosti nebyly naše obličejové masky ani roušky a respirátory. Můžeme tedy shrnout, že po intenzivních přípravách se v prvním zářijovém týdnu roku 2023 sjelo do konferenčních prostor cca 250 účastníků sjezdu, z nichž přibližně 80 participantů přicestovalo z České republiky.

Roli plenárního řečníka přijal fyzikální chemik slovenského původu působící jako profesor chemie na Oxfordské univerzitě, prof. Philipp Kukura, Ph.D., který na slavnostním otevření sjezdu vystoupil s plenární přednáškou „Mass Photometry: Weighing Molecules with Light“. V rámci zahajovacího ceremoniálu bylo umožněno předsedovi ČSCH prof. Tomáši Navrátilovi pozdravit přítomné členy ČSCH a popřát jim mnoho úspěchů.

Samotné jednání sjezdu bylo rozčleněno do odborných sekcí: Analytická chemie (garant: prof. Ing. Lubomír Švorc, DrSc.); Fyzikální chemie (garant: prof. Ing. Peter Šimon, DrSc.); Anorganická a materiálová chemie (garant: doc. Ing. Ivan Šalitraš, Ph.D.); Organická chemie (garant: doc. RNDr. Martin Putala, Ph.D.); Vyučování a historie chemie (garant: doc. PaedDr. Katarína Kotuláková, Ph.D.); Aplikovaná chemie, životní prostředí a polymery (garant: doc. Ing. Radko Tiňo, Ph.D.) a Chemoprogres – chemické technologie (garant: prof. Ing. Ján Hivěš, Ph.D.). Čas vymezený konání sjezdu byl poměrně krátký, a proto část účastníků musela své výsledky prezentovat v rámci dvoudenní posterové sekce, jejíž garantkou byla doc. Ing. Zuzana Cibulková, PhD.

Snad proto, aby jejich účastníci nezískali dojem, že existuje jen jejich obor bádání, byla jednání sekcí prokládána velmi zajímavými a poučnými plenárními přednáškami (doc. Ing. Milena Reháková, Ph.D.: „Úloha chemie a materiálových analýz v procesoch ochrany kultúrneho dedičstva“; doc. RNDr. Zuzana Vargová, Ph.D.: „Biologický potenciál koordinačných zlúčenín zinku a striebra“; prof. Ing. Dušan Galusek, DrSc.: „Může nám sklo pomôcť v boji proti baktériám rezistentným na antibiotiká?“; Ing. Mária Mastihubová: „Prínos enzymatickej acylácie ku syntéze prírodných glykofenolík“ a ČSCH zďařile zastoupila doc. RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.: „Borem dopovaný diamant: Perspektivy „netradičného“ elektrodového materiálu po tricití letech výzkumu“).

Snad každému, kdo někdy organizoval nějakou větší konferenci, je jasné, že bez podpory sponzorů se lze obejít jen stěží. V případě naší akce byly hlavními sponzory firmy MultiplexDX a Metrohm Slovensko. Sjezd dále podpořili i Chemistry Europe – European Chemical Societies Publishing (organizace 16 chemických společností z 15 evropských zemí, které zastupují přes 75 000 chemiků), Evropská chemická společnost EuChemS – European Chemical Society, vydavatelství Elsevier, společnosti Shimadzu a Merck. Úlohy mediálního sponzora se ujal časopis ChemZi.

Touto cestou bychom rádi poděkovali organizátorům 75. sjezdu, především paní předsedkyni Monice Jerigové, vědeckému tajemníkovi Lubomíru Švorcovi, dále pak hospodářce Michaela Halinkovičové, výkonnému tajemníkovi Miroslavu Michalkovi a technickému tajemníkovi Michalu Procházkovi a dalším jejich spolupracovníkům, za jejich vynaloženou námahu a úsilí, které bylo bezesporu korunováno velice úspěšnou realizací významného československého kongresu. Nastavili tím i poměrně vysokou laťku organizátorům nadcházejícího sjezdu chemiků, jehož organizace bude spočívat na bedrech České společnosti chemické a který byl krátce letošním účastníkům sjezdu představen Mgr. Martinem Muchou, Ph.D.

Každý, kdo se někdy zúčastnil jakékoli vědecké konference, jistě potvrdí, že poznatky získané v rámci přednášek a z posterů jsou velice cenné. Avšak neméně významná je výměna zkušeností, navazování kontaktů, diskuse apod. v průběhu přestávek na kávu, snídani, obědů, večeří, pivního či vínného večera a jiných oficiálních i neoficiálních akcí sjezdu. Obdobně by mohli argumentovat i Ti, kteří místo do přednáškových místností zaměřili na vycházku či podnikli horolezecké výstupy na vrcholky nejvyšších slovenských velehor.

Mezi schůzky konané mimo sekce patřilo večerní setkání zástupců ČSCH a SCHS. Určitě jej lze považovat za vysoce užitečné a přínosné nejen z hlediska prohloubení československých vztahů, vzájemné výměny zkušeností, názorů, ale i prodiskutování společně organizovaných

akcí, ať už se jednalo o budoucí sjezdy chemiků v následujících letech, nebo o přípravu IUPAC World Chemistry Congress 2029, jenž bude pořádán ve spolupráci obou našich společností v Praze za šest let.

Dovolte nám zmínit i některé další události spojené s konáním sjezdu. Již během zahajovacího ceremoniálu předali zástupci SCHS několik ocenění. Pozadu nezůstali ani předseda ČSCH společně s dalším členem Předsednictva ČSCH Dr. Peterem Barathem, kteří předali nejvyšší vyznamenání udělované Českou společností chemickou za vědecké dílo prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. Ještě dodatečně bychom chtěli i touto cestou jménem Předsednictva i Hlavního výboru ČSCH laureátovi, který má nesporné a neodiskutovatelné zásluhy o rozvoj chemie, především elektrochemie a elektroanalytické chemie, pokračovat. Jsme přesvědčeni, že si toto ocenění plně zaslouží. Nebylo to však jediné ocenění ČSCH, které bylo v rámci sjezdu předáno. Dalším oceněným se stal vynikající slovenský elektrochemik prof. Ing. Ján Labuda, DrSc. Hlavní výbor ČSCH se rozhodl mu udělit vysoké vyznamenání Společnosti, a to Čestné členství ČSCH. Toto ocenění se uděluje od roku 1880 těm, kdož se významně zasloužili o Společnost s přihlédnutím k jejich zásluhám o rozvoj oboru. Ani zde není nejmenších pochyb o zásluhách prof. Labudy jak odborných, tak o vzájemnou česko-slovenskou spolupráci. Tež ještě jednou gratulujeme. Oběma laureátům přejeme hodně sil a energie do dalších let.

V rámci sjezdu byla pořádána též soutěž o Cenu Marty Sališovej spojená se soutěží o Cenu Metrohm, obě určené doktorandům a mladým vědeckým pracovníkům do 30 let, kteří jsou členy SCHS nebo ČSCH. Celkem porota posuzovala 13 přednášek. Je třeba zdůraznit, že všechny měly vynikající úroveň, takže rozhodování poroty složené ze zástupců obou pořádajících Společností nebylo vůbec jednoduché. Nakonec dospěla k závěru, že 1. cena byla udělena Ph.D. studentovi Mgr. Michalu Fulínovi z PřF Univerzity Komenského v Bratislavě za práci: „Analýza mastných kyselin s krátkým a středně dlouhým uhlíkovým reťazcom v syroch pomocou GC-MS“ a zvláštní cenu fir-

my Metrohm získal Ph.D. student PřF UK Mgr. Peter Čambal za práci „Elektrochemické vlastnosti monokrystalických borem dopovaných diamantových elektrod s různými krystalovými orientacemi a jejich aplikace v elektroanalýze“.

Rádi bychom připomněli i iniciativu Sekce mladých ČSCH, kteří se připojili ke komisi pro hodnocení posterů mladých vědeckých pracovníků do 35 let a společně se svými slovenskými mladými kolegy vybrali dva české a dva slovenské autory posterů pro ocenění Cenou ČSCH, resp. SCHS. Z české strany byli oceněni Mgr. Lucie Kořená z Ostravské univerzity a Mgr. Oleksandr Matvieiev z Univerzity Pardubice.

Některé další informace o sjezdu lze nalézt na sjezdových stránkách SCHS (<https://75zjazd.schems.sk/>) nebo v časopise ChemZi 1/2023 (<https://schems.sk/wp-content/uploads/ChemZi-1-2023.pdf>).

Letošní, 75. sjezd chemiků skončil. Nicméně už nyní se můžeme těšit na 76. sjezd chemiků, který se již v těchto dnech intenzivně připravuje. A kde? Zkusme si matematicko-logický znalostní kvíz: Když nám příslušná stránka Wikipedie (https://cs.wikipedia.org/wiki/Chemick%C3%A9_A9_sjezdy) prozradí, že 64. sjezd chemiků se konal v centru regionu Haná a v sídelním městě moravských markrabat a biskupů v roce 2012. Do stejného města se vrátil o 10 let později díky organizátorům 74. sjezdu chemiků. A pokud víme, že 56. sjezd chemiků se konal v roce 2004 v metropoli Moravskoslezského kraje stejně jako 66. sjezd o 10 let později, tak již snad není nutné explicitně uvádět, kde se bude 76. sjezd chemiků konat (i když si po nedávném zážitku nejsem jist už téměř ničím, neboť nejméně 2 studenti (z posluchárny obsazené dalšími 92 kolegy) 1. ročníku 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy nebyli schopni zodpovědět otázku: „Která řeka protéká Ústím nad Labem?“). Zbývá tedy jen doplnit trochu neobvyklé datum konání: 26. – 29. 8. 2024. Těšíme se na bohatou účast.

Tomáš Navrátil
Česká společnost chemická



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

O ODDĚLENÍ A POSÍLENÍ OBRAZU ZA ZRCADLEM (DERACEMIZACE A AMPLIFIKACE CHIRALITY)

MICHAL JURÁŠEK^a, BOHUMIL KRATOCHVÍL^b, MICHAL KOHOUT^c, FRANTIŠEK ŠVEC^d
a PAVEL DRAŠAR^a

^a Ústav chemie přírodních látek, ^b Ústav chemie pevných látek, ^c Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice; ^d Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, 500 05 Hradec Králové, Česká republika
jurasekm@vscht.cz, kratochb@vscht.cz, svecfr@faf.cuni.cz, kohouti@vscht.cz, drasarp@vscht.cz

Došlo 5.8.23, přijato 12.9.23.

Článek popisuje základní aspekty chiraloty, zamýšlí se nad původem chiraloty chemických sloučenin a přináší pohled na základní děje při deracemizaci. Článek naznačuje bezbřehost tematiky chiraloty, chirální koordinace, asociace a interakce a nečiní si nikterak nárok na to, aby přinesl vyčerpávající přehled.

Klíčová slova: chiralita, symetrie, enantiomery, diastereomery, deracemizace, homochiralita

Vzápětí byla Alenka za zrcadlem a lehce seskočila do pokoje za ním.... Rozhlížela se kolem sebe a zjistila, že co je vidět z tamtoho pokoje je obyčejné a nezajímavé, zato ostatek je docela jináči.... Jakkap by se ti, Katko, líbilo v domě za zrcadlem! Jestlipak by ti tam dávali mlíčko! Třeba se to mlíčko v domě za zrcadlem nedá ani pít... (cit.¹).

Začneme nejdříve, tak jako diskutující v době antiky, definicí slova chiralita. Termín pochází z řečtiny, kde χεῖρ/χέρι (cheir/chéri) značí ruku. Chiralita² je geometrická vlastnost (asymetrie prostorového rozložení) tuhého objektu (nebo prostorového uspořádání objektu, bodů nebo atomů) spočívající v nemožnosti překrytí (ztotožnění) se svým vlastním zrcadlovým obrazem³; takový objekt nemá žádné prvky symetrie druhého druhu (zrcadlovou rovinu, $\sigma = S_1$, střed symetrie, $i = S_2$, rotačně-reflexní osu, S_{2n}).

Může však mít rotační osu symetrie C_n . Zcela novým fenoménem stereoisomerie je tzv. akamptisomerie, kde oba isomery jsou jeden ke druhému propojeny inverzí vazebného úhlu³. Pro jednoduchost v tomto příspěvku použijeme představu o chemii, jakou mají obyčejní chemici, kteří vědí, že oba enantiomery chirální sloučeniny mají všechny fyzikálně-chemické vlastnosti stejné s výjimkou, pokud se na ně „díváme či saháme“ čímkoli, co je samo o sobě chirální. Chirální objekt a jeho zrcadlový obraz se označují jako enantiomorfy, v případě molekul se hovoří o enantiomerech.

Pro úplnost malinko odbočíme. Trochu složitější je problém chiraloty v krystalické fázi, tzn. třídídimenzionální chiralita (jakkoliv je všechna chiralita trojrozměrná). Ačkoliv počet možných krystalových struktur se zdá být neomezený, tak jejich symetrické uspořádání popisuje pouze 230 prostorových grup⁴. Zjednodušeně řečeno: pro-



Obr. 1. Chiralita objektů

[§] K popisu symetrických objektů jsou v textu použity dva zápisy. Hermannův-Mauguinův zápis je preferován v krystalografii, zatímco spektroskopie preferuje Schoenfliesův zápis. Tak např. střed symetrie je i (v S), nebo -1 (v H-M), zrcadlová rovina je σ (v S) a m (v H-M) atd.



Obr. 2. Chiralita v přírodě

storová grupa je množinou všech operací symetrie, které lze s danou krystalovou strukturou provést. Pokud chirální látka krystaluje ve formě čistého enantiomeru, potom její krystalovou strukturu nazýváme absolutní. Absolutní struktura enantiomeru patří do jedné z chirálních (neboli Sohnckeho) grup, kterých je pouze 65 (tab. I). Chirální grupy jsou podmnožinou 230 grup při respektování symetrických omezení pro chiralitu, viz výše.

Příroda si však „libuje“ v určitých symetriích, mimo jiné v lidské populaci je více praváků než leváků. Proto všech zmíněných 230, resp. 65 grup není rovnoměrně zastoupeno. Velmi často se setkáváme s grupami monoklinickými, triklinickými a ortorombickými: $P2_1/c$ (nejčastější ze všech 230), $P-1$ nebo $P2_12_12_1$, z nichž pouze $P2_12_12_1$ je chirální, protože neobsahuje střed symetrie. Naproti tomu některé prostorové grupy vyšších symetrií (kubické, hexagonální) jsou zastoupeny jen ojediněle. Distribuce grup kubických a hexagonálních tvoří v přírodě pouze 1 % (cit.⁵). Důvody pro nerovnoměrné zastoupení symetrických vzorů v přírodě (asymetrie v symetrii) jsou zřejmě v energetických preferencích.

Stanovení absolutní struktury enantiomerů, tedy jejich přesného uspořádání v 3D prostoru, umožňuje především monokrystalová RTG difrakční analýza, která po-

skytne hodnotu tzv. Flackova parametru $x <0,1>$. Pokud je hodnota x blízká 0, potom je nalezená absolutní struktura určena správně, pokud je x blízké 1, potom je absolutní struktura určena nesprávně a je nutné koordináty všech atomů vynásobit -1 , tzn. strukturu invertovat přes střed symetrie na správnou absolutní konfiguraci. Pokud se hodnota x pohybuje okolo 0,5, potom se pravděpodobně jedná o racemát nebo krystalové dvojče.

Pokud je objekt superponovatelný (zcela překrytelný, identický, E) na svůj zrcadlový obraz, je popsán jako achirální. Objekty, které se vyskytují pouze v řadách jedné chirální formy, se označují jako homochirální (např. většina přírodních aminokyselin, sacharidů či steroidů).

Chiralita, jako fenomén, nabyla na mimořádné důležitosti zejména po conterganové (thalidomidové) aféře, kdy byl v 50. letech ženám podáván racemický⁶ 2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-dion, jako nebarbiturátové hypnotikum, k potlačení ranních těhotenských nevolností. Postupem času bylo zjištěno, že zatímco *R*-enantiomer je účinné sedativum a antiemetikum, *S*-enantiomer je teratogenní^{7,8}. Problém byl v tom, že teratogenita byla dlouho tajena, a proto se narodily (pravděpodobně) desítky tisíc znetvořených dětí. Později bylo prokázáno, že *R*-enantiomer v organismu racemizuje, a tedy ani podávání čistého *R*-enantiomeru (a tím i racemátu) těhotným matkám, ale ani ženám a mužům nepoužívajícím antikoncepci není možné⁶ (používá se však i nadále za přísných podmínek⁹ např. proti některým zhoubným nádorům, zánětům, artritidě, lepre čili malomocenství¹⁰).

Pokud není vzat v potaz vliv asymetrického vnějšího prostředí, mají mít oba enantiomery, ze kterých se skládá racemická směs, stejnou energii, a tudíž vznik obou, libovolným způsobem, bude mít pravděpodobnost 50:50. Jak je potom možné, že v přírodě nalézáme jednotlivé enantiomery, a dokonce homochirální řady sloučenin, ba dokonce

Tabulka I
65 chirálních (Sohnckeho) grup

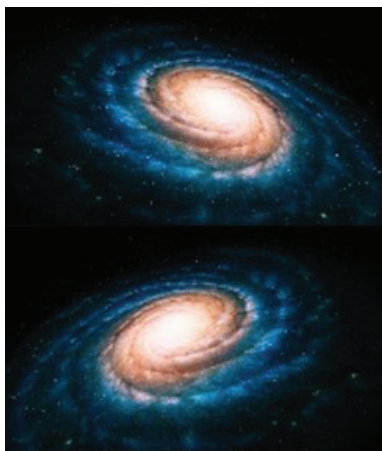
Krystalografická soustava	Hermann-Mauguinův symbol
Triklinická	$P 1$
Monoklinická	$P 121, P 12_11, C 121$
Ortorombická	$P 222, P 222_1, P 2_12_12, P 2_12_12_1, C 222_1, C 222, F 222, I 222, I 2_12_12_1$
Tetragonální	$P 4, P 4_1, P 4_2, P 4_3, I 4, I 4_1, P 422, P 42_12, P 4_122, P 4_12_12, P 4_222, P 4_22_12, P 4_322, P 4_32_12, I 422, I 4_122$
Romboedrická	$P 3, P 3_1, P 3_2, R 3, P 312, P 321, P 3_112, P 3_121, P 3_212, P 3_221, R 32$
Hexagonální	$P 6, P 6_1, P 6_5, P 6_2, P 6_4, P 6_3, P 622, P 6_122, P 6_522, P 6_222, P 6_422, P 6_322$
Kubická	$P 23, F 23, I 23, P 2_13, I 2_13, P 4_32, P 4_232, F 432, F 4_132, I 432, P 4_332, P 4_132, I 4_132$

chirální uskupení, jako např. krystaly, vzniklé z achirálních sloučenin? Takové případy se zdají být porušením principu symetrie formulovaném Neumanem, Mi- nigerodem a Curie¹¹.

Úvahy o tom, kde se vzala na Zemi chiralita, jsou kdesi mezi vysokou fyzikou a filozofií. Protože k prvotnímu výskytu chiralit podle všeho nepotřebujeme nic menšího než ji samou. Chiralita a její původ jsou i zajímavým zdrojem poetických filozoficko-naturalistických pŕetek mezi evolucionisty a kreacionisty¹². Pro začátek je nutno poznamenat, že fyzika vidí možné zdroje pravé i nepravé chiralit v gravitačních potenciálech narušujících paritu¹³, výklad čehož ovšem poněkud přesahuje rozměry tohoto příspěvku¹⁴ tak, jak tato vlastnost může být připsána jakýmkoliv objektům od elementárních částic po galaxie¹⁵. Pokud je porušená parita ve vesmíru, prapůvod toho, že nakonec v reálném prostředí enantiomery nemají zcela identickou energii, může být počátek homochiralit některých řad sloučenin na Zemi i v jejich extraterestriálním původu¹⁶. V této souvislosti můžeme vidět i Millsovo tvrzení, že poměr enantiomerů v racemátu nikdy není přesně 50:50 a že jeden enantiomer vždy mírně převažuje¹⁷.

Obecně je přijímaný názor, že oba enantiomery mají stejnou energii, který však platí pouze pro izolované objekty (molekuly). U krystalických fází a podobně i u solvovaných molekul (mnohočásticových systémů) je otázka energetické rovnosti přinejmenším diskutabilní, protože „enantiomery“ mohou projevovat rozdílnou reaktivitu při interakcích s chirálním prostředím, to ale již odcházíme od vlastností pouhých enantiomerů a musíme vzít v potaz vznik nekovalentních diastereomerních supramolekul (klastrů). Existují však i speciální systémy – polární smektické fáze lomených kapalných krystalů, které se vyznačují spontánní deracemizací a tvorbou makroskopicky chirálních domén v systému, jenž je tvořen výhradně z achirálních molekul¹⁸, jak diskutujeme dále.

Porušení (prostorové) parity představuje základní vlastnost částicové a atomové chiralit používané k vypořádání se s komplexním fenoménem asymetrie ve vesmíru. Na molekulární úrovni však četné experimenty naznačují,



Obr. 3. Chirální galaxie¹⁹

že energetické rozdíly související s porušením parity samy o sobě nezpůsobily zesílení a šíření homochiralit²⁰. Parita (a P-symetrie) je však narušována slabými interakcemi. Asymetrické transformace prováděné za podmínek vzdálených od rovnováhy odhalují existenci nelineární autokatalýzy, která má stochastickou povahu. V každém případě a z globálního hlediska se chiralita jeví jako sjednocující charakteristika našeho pozorovatelného prostředí s evolučními implikacemi²¹.

„Spontánní“ deracemizace (porušení zrcadlové symetrie) je v současném výzkumu chiralit náročným multidisciplinárním předmětem. V nepřítomnosti jakýchkoli chirálních induktorů může být achirální látka nebo racemická směs transformována do enantiomerně obohaceného nebo dokonce homochirálního stavu prostřednictvím selektivního vstupu energie, např. chemického potenciálu, ozařování, mechanického mletí, ultrazvukových vln, tepelných gradientů atd.²² Podívejme se blíže na některé možnosti takové „deracemizace“, tj. přeměnu stabilního racemického stavu na asymetrický neracemický. Přeměnu, která po léta přitahuje pozornost přírodovědců i filozofů, protože bytostně souvisí s životem na Zemi²³ a je významným procesem pro oblast farmakologie, supramolekulární chemie, nanověd a dalších oborů. Je logické, že procesy deracemizace musíme vidět i v souvislosti s epimerací, kdy je jeden epimer přeměněn na druhý, neboť i zde se mj. uplatní polarizované záření, keto-enol tautomerie, chirální katalýza a enzymy (epimerasy). Je nabíledni, že s popsávanými jevy souvisí naopak i spontánní racemizace²⁴.

Chiralita a helicity látek, nekovalentních supramolekul či krystalů, může být ovlivněna či dokonce zesílena řadou způsobů, jako např. ozařováním různými vlnovými délkami elektromagnetického záření nebo zářením kruhově polarizovaným^{25,26}, přičemž vznik polarizovaného světla můžeme vidět mj. selektivní absorpcí a rozptylem (světlo přicházející z oblohy je částečně polarizováno), odrazem pod tzv. „Brewsterovým“ úhlem, dvojlomem, někdy kombinovaným s odrazem, kdy dvojlom může být přirozený, nebo navozený silným elektrickým polem. Jako historickou reminiscenci na úrovni iluminace si připomeňme praxi Vikingů, kteří, aniž tehdy věděli proč, hledali pod zamračenou oblohou pro navigaci polohu slunce (zdroj polarizovaného záření) používající „sólsteinn“, sluneční kámen, krystal islandského dvojlomného vápence (polarizační analyzátor)²⁷. V kosmickém scénáři se má, podle některých, za to, že působení polarizovaného kvantového záření ve vesmíru, jako jsou kruhově polarizované fotony nebo spinově polarizované částice, mohlo vyvolat asymetrické podmínky v primitivních mezihvězdných médiích, což mělo za následek pozemskou bioorganickou homochiralitu²⁸. Podobné efekty při vzniku chirálních komplexů může mít i aplikace ultrazvuku²⁹.

Slabé elektrické interakce se liší od ostatních tím, že jsou schopné rozlišit chiralitu zúčastněných částic^{30,31}. Podle všeho však tyto síly k deracemizaci samy opět nestačí³². Je užitečné poznamenat, že tyto obecné rysy lze ilustrovat pohledem na vývoj chemického systému, který je zpočátku daleko od rovnováhy. Příklady jsou systémy

narušující chirální symetrii a oscilační systémy, kde stacionární stav lze vidět tehdy, když změna entropie je minimální. Výpočet rychlosti produkce entropie na jednotku objemu pak lze nejnázne provést pro homogenní chemické systémy, ve kterých jsou známy všechny elementární kroky reakcí³³. Polární interakce mohou mít za důsledek, že je chiralita ovlivněna i pH (cit.³⁴).

V autokatalytických reakčních systémech přítomnost malého množství (chirálního) reakčního produktu v enantiomerním přebytku může napomoci vytvoření mnohem většího enantiomerního přebytku výsledného produktu (Soai-ho reakce)³⁵. Tato reakce je unikátní laboratorní demonstrace absolutní kineticky kontrolované asymetrické syntézy, tj. spontánní tvorby (automultiplikace) enantiomerně obohaceného produktu, a to i v nepřítomnosti jakýchkoli dalších chirálních induktorů nebo fyzikálních sil²². Srovnatelnou možností je i „naočkování“ spontánní krystalizace achirální látky, která tvoří chirální krystaly, prvním chirálním krystalem (ze supramolekulárního pohledu prvním synthonem), často znásobená jednosměrným mícháním³⁶. Při takových dějích, jimiž je vlastně samoskladba, se uplatňují jevy jako filtrování (oprava) chyb, molekulární rozpoznání a kooperativita, protože pokud k takovému ději dochází, musí to být z hlediska energie (entropie) výsledného produktu výhodné. Mají zde místo všechny myslitelné nekovalentní interakce.

Tvorba chirálních krystalů achirální látky je možná tehdy, když sama achirální látka tvoří při krystalizaci chirální krystalovou buňku³⁷. Příkladem takových enantiomorfních krystalů je křemen, sádra, olivín, clinopyroxen, klinoamfibol³⁸ nebo chlorečnan sodný, a z organických sloučenin např. benzofenon, fenol a řada dalších. V přírodě pak může chirální krystal iniciovat jak enantioselektivní krystalizaci, tak chirální reakci, a to i v pevné fázi³⁹.

Podobným případem je i tvorba uniformních chirálních krystalů vycházející z téměř racemické směsi levotočivých a pravotočivých krystalů. Procesy rozpouštění a rekrystalizace založené na úvahách o rozpustnosti malých a větších krystalů podle Gibbsova-Thomsonova pravidla (Stefanův problém)⁴⁰, spojené s racemizací v míchaném roztoku, vedou tento téměř rovnovážný systém k uniformní chiralitě v pevné fázi⁴¹ (Ostwaldovo zrání^{42–44}), vysvětlované buď pohledem na aproximaci středního pole (teorie Lifshitze-Slyozovho-Wagnera, LSW) anebo mnohačasticovou teorií vycházející z řešení difuzní rovnice v kvazistatické aproximaci⁴⁵.

Pozoruhodný názor můžeme vidět u tzv. přirozené orbitální chiralitě Země vytvořené především pravotočivou rotací Země kolem její rotační osy (včetně precese) a pravotočivým kroužením Země kolem Slunce, které vytvářejí efektivní rytmické pravotočivé silové pole v prostoru a čase, které může vést např. k prvotní krystalizaci „očka“ jednoho z enantiomerů⁴⁶. Existují úvahy, že zmíněné pole ani není potřebné, pokud dojde k prosté statistické fluktuaci³², byť v miniaturním měřítku, např. podle modelu navrženého Frankem⁴⁷. Nicméně bylo prokázáno, že silné laminární rotační míchání postačí jako

jediný chirální diskriminační zdroj pro vznik homochirálních supramolekulárních gelů⁴⁸, ale i homochirálních krystalů, ať již z roztoku nebo z taveniny⁴⁹. Rovnovážné systémy se uplatňují jak při uniformním míchání krystalizující směsi⁵⁰, tak i při mletí (např. v kulovém mlýně), při procesu zvaném Viedmovo zrání⁵¹, kdy je produktem totální deracemizace. Nutnou podmínkou úspěšné deracemizace je schopnost dané látky existovat v racemickém stavu ve formě konglomerátu, tedy tvořit racemickou směs z enantiomerně čistých krystalů. Pouze asi 15 % všech známých chirálních sloučenin tuto schopnost má, mezi nimi i biologicky významné substance, jako je např. kyselina asparagová⁵². Proces, který může vypadat jako čarodějnickví, se tak používá např. ve výrobě farmaceutik⁴².

Jiná možnost rozdělení enantiomerů je převedení enantiomerů na diastereomery, které mají již rozdílné fyzikálně chemické vlastnosti. Tvorba diastereomerů nemusí být výhradně založena na kovalentní vazbě, může jít např. i jenom o solvataci chirálním rozpouštědlem, anebo prostředím (chirální chromatografie), či kokrystalizaci s jedním enantiomerem chirální látky, jak již bylo řečeno. Příbuzné je i dělení enantiomerů na chirálních membránách⁵³. Enantiomery lze rozdělit i pomocí enzymů nebo přímo buněčných kultur či organismů, které selektivně přemění jen jeden z enantiomerů⁵⁴, což je proces, kde dynamický vznik diastereomerů z enantiomerů je zcela oprávněně představitelný.

Snaha porozumět původu chiralitě v biologických systémech vyvolala intenzivní hledání nelineárních efektů v katalýze a drahách pro zesílení mírných enantiomerních přebytků v racemátech za vzniku opticky čistých molekul. Amplifikace chiralitě v polymerních systémech jako výsledek kooperativních procesů byla a je intenzivně zkoumána⁵⁵. Ukázalo se, že jemná souhra nekovalentních interakcí, jako je vodíková vazba, π - π vrstvení a hydrofobní interakce, je také dostatečná k pozorování zesílení chiralitě v malých molekulách⁵⁶. Takzvané „matricí podporované zesílení chiralitě“ je jev, kdy např. pomocí výše zmíněného π - π vrstvení umocněného vhodnými vlastnostmi prostředí se na sebe skládají molekuly ať již chirální, nebo achirální⁵⁷, avšak s určitým omezením volné pohyblivosti tak, že vytvářejí chirální, například helikální útvary. V případě chirálních entit se dokonce uplatní princip „četař a vojáci“ (sergeant-and-soldiers)⁵⁸, kde několik seržantů může ovládat pohyby velkého počtu kooperativních vojáků⁵⁹, tak i těch několik chirálních nebo stericky nepoddajných supramolekulárních komponent např. může ovládnout supramolekulární helicitu výsledné supramolekuly, protože je pro komponenty dokonce energeticky výhodné podřídit se pouze jedné z helicit, která v případě nekoordinace „seržantů“ může ve výsledném agregátu i alternovat. Příkladem takového chování může být vrstvení porfyrinových jednotek majících chirální a strukturně nepoddajné substituenty, které v roztoku po určité době dosáhnou, při měření chiroptických vlastností, dále se neměnícího stavu, který vykazuje specifickou optickou rotací desítek tisíc jednotek⁶⁰. Později bylo zjištěno, že vrstvení jednotek v závislosti na chiralitě substituentu

může být typu J či H (cit.⁶¹). Chirální agregáty byly pozorovány elektronovým mikroskopem a výpočtem byla prokázána pro daný agregát výhodnost jedné z helicit^{62,63}.

Článek naznačuje složitost a šíří tématu chiralit⁶⁴, chirální koordinace, asociace a interakce a nečiní si nikterak nárok na to, aby přinesl vyčerpávající přehled. Existuje mnoho sofistikovanějších pokusů o iniciaci homochiralit jako uplatnění plasmy, polarizovaných částic, spinů... (cit.^{28,65}). Nicméně, pokusili jsme se naznačit zásadní otázky a badatelské výsledky, jejichž důležitost zřejmě ocení až děti našich dětí⁶⁶.

LITERATURA

- Carroll L.: *Alice's Adventures in Wonderland – Through the Looking-Glass and what Alice found there*. Český titul: *Alenka v kraji divů a za zrcadlem*, překlad Skoumal A., Skoumalová H. Albatros, Praha 1988.
- IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, (the "Gold Book") 2. vyd. (Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson), Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997. Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>, staženo 27. 4. 2023.
- Canfield P. J., Blake I. M., Cai Z.-L., Luck I. J., Krausz E., Kobayashi R., Reimers J. R., Crossley M. J.: *Nature Chem.* 10, 615 (2018).
- International Tables for Crystallography*, Volume A (Hahn T., ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1989.
- <http://pd.chem.ucl.ac.uk/pdnn/symm3/sgpfreq.htm>, staženo 27. 6. 2023.
- Cosy J. R., v knize: *Comprehensive Chirality*, str. 1. Elsevier, Amsterdam 2012.
- Newbronner E., Atkin K.: *Disability Health J.* 11, 184 (2018).
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/%28S%29-thalidomide>, staženo 10. 7. 2023.
- https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#;_heslo=thalidomide, staženo 10. 7. 2023.
- Dsouza N. N., Alampady V., Baby K., Maity S., Byregowda B. H., Nayak Y.: *Inflammopharmacology* 31, 1167 (2023).
- Brandmüller J.: *Comp. Math. Appl.* 12, 97 (1986).
- Sarfati J.: *J. Creation* 12, 263 (1998).
- Bargueño P.: *Chirality* 27, 375 (2015).
- Pavlov V. A., Shushenachev Y. V., Zlotin S. G.: *Symmetry* 11, 649 (2019).
- Takahashi J., Kobayashi K.: *Symmetry* 11, 919 (2019).
- Furukawa Y., Chikaraishi Y., Ohkouchi N., Ogawa N. O., Glavind D. P., Dworkin J. P., Abe C., Nakamura T.: *PNAS* 116, 24440 (2019).
- Mills W. H.: *J. Soc. Chem. Ind., London* 51, 750 (1932).
- Link D. R., Natale G., Shao R., MacLennan J. E., Clark N. A., Körblova E., Walba D. M.: *Science* 278, 1924 (1997).
- Devínsky F.: *Symmetry* 13, 2277 (2021).
- Gol'danskii V. I., Kuz'min V. V.: *Usp. Fiz. Nauk (YΦH)* 32, 1 (1989).
- Avalos M., Babiano R., Cintas P., Jiménez J. L., Palacios J. C.: *Tetrahedron: Asymmetry* 11, 2845 (2000).
- Buhse T., Cruz J.-M., Noble-Terán M. E., Hochberg D., Ribó J. M., Crusats J., Micheau J.-C.: *Chem. Rev.* 121, 2147 (2021).
- Avetisov V. V., Goldanskii V. I.: *Biosystems* 25, 141 (1991).
- Ikuma N., Tsue H., Tsue N., Shimono S., Uchida Y., Masaki K., Matsuoka N., Tamura R.: *Org. Lett.* 7, 1797 (2005).
- Meierhenrich U. J., Nahon L., Alcaraz C., Bredehft J. H., Hoffmann S. V., Barbier B., Brack A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 2 (2005).
- Pijper D., Jongejan M. G. M., Meetsma A., Feringa B. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 130, 4541 (2008).
- Ropars G., Lakshminarayanan V., Le Floch A.: *Contemp. Phys.* 55, 302 (2014).
- Sallembien Q., Bouteiller L., Crassous J., Raynal M.: *Chem. Soc. Rev.* 51, 3436 (2022).
- Komiya N., Muraoka T., Iida M., Miyanaga M., Takahashi K., Naota T.: *J. Am. Chem. Soc.* 133, 16054 (2011).
- Kieu T. D.: *Technical Report UM-P-94/74*; RCHep-94/22, Melbourne Univ., Parkville, VIC (Australia), https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/26/017/26017900.pdf, staženo 1. 6. 2023.
- Mason S. F., Tranter G. E.: *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 397, 45 (1985).
- Plasson R., Kondepudi D. K., Bersini H., Commeyras A., Asakura K.: *Chirality* 19, 589 (2007).
- Kondepudi D.: *Ecol. Psych.* 24, 33 (2012).
- Lin R., Zhang H., Li S., Chen L., Zhang W., Wen T. B., Zhang H., Xia H.: *Chem. Eur. J.* 17, 2420 (2011).
- Shibata T., Morioka H., Hayase T., Choji K., Soai K.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 471 (1996).
- Kondepudi D. K., Kaufman R. J., Singh N.: *Science* 250, 975 (1990).
- Matsuura T., Koshima H.: *J. Photochem. Photobiol., C* 6, 7 (2005).
- Lee C., Weber J. M., Rodriguez L. E., Sheppard R. Y., Barge L. M., Berger E. L., Burton A. S.: *Symmetry* 14, 460 (2022).
- Rodríguez B., Bruckmann A., Bolm C.: *Chem. Eur. J.* 13, 4710 (2007).
- Kraus C.: *Eur. J. Appl. Math.* 22, 393 (2011).
- Noorduyn W. L., Izumi T., Millemaggi A., Leeman M., Meekes H., Van Enkevort W. J. P., Kellogg R. M., Kaptein B., Vlieg E., Blackmond D. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 130, 1158 (2008).
- Ostwald W.: *Z. Phys. Chem.* 22, 289 (1897).

43. Holaň J., Štěpánek F., Ridvan L.: *Chem. Listy* 108, 46 (2014).
44. Giurg A., Paidar M., Kodým R.: *Chem. Listy* 112, 372 (2018).
45. Čechal T.: *Ostwaldovo zrání – teoretický popis a simulace. Bakalářská práce.* FSI VUT, Brno 2008.
46. He Y. J., Qi F., Qi S. C.: *Med. Hypotheses* 56, 493 (2001).
47. Frank F. C.: *Biochem. Biophys. Acta* 11, 459 (1953).
48. Sun J. a 11 spoluautorů: *Nat. Commun.* 9, 2599 (2018).
49. Kondepudi D. K., Bullock K. L., Digits J. A., Hall J. K., Miller J. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 115, 10211 (1993).
50. Sögütoglu L.-C., Steendam R. R. E., Meekes H., Vlieg E., Rutjes F. P. J. T.: *Chem. Soc. Rev.* 44, 6723 (2015).
51. Viedma C.: *Phys. Rev. Lett.* 94, 065504 (2005).
52. Viedma C., Ortiz J. E., de Torres T., Izumi T., Blackmond D. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 130, 15274 (2008).
53. Randová A. a 12 spoluautorů: *Sep. Purif. Technol.* 141, 232 (2015).
54. van Ooyen J., Noack S., Bott M., Reth A., Eggeling L.: *Biotechnol. Bioeng.* 109, 2070 (2012).
55. Soai K. (ed.): *Amplification of Chirality* (Series: Topics in Current Chemistry, Vol. 284). Springer, Heidelberg 2008.
56. Palmans A. R. A., Meijer E. W.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 8948 (2007).
57. Miyagawa T., Yamamoto M., Muraki R., Onouchi H., Yashima E.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 3676 (2007).
58. Green M. M., Reidy M. P., Johnson R. D., Darling G., O'Leary D. J., Willson G.: *J. Am. Chem. Soc.* 111, 6452 (1989).
59. Eelkema R., Feringa B. L.: *Org. Biomol. Chem.* 4, 3729 (2006).
60. Štěpánek P., Dukh M., Šaman D., Moravcová J., Kniežo L., Monti D., Venanzi M., Mancini G., Drašar P.: *Org. Biomol. Chem.* 5, 960 (2007).
61. Monti D., Venanzi M., Gatto E., Mancini G., Sorrenti A., Štěpánek P., Drašar P.: *New. J. Chem.* 32, 2127 (2008).
62. Zelenka K. a 14 spoluautorů: *Chem. Eur. J.* 17, 13743 (2011).
63. Lettieri R., Cardová L., Gatto E., Mazzuca C., Monti D., Palleschi A., Placidi E., Drašar P., Venanzi M.: *New J. Chem.* 41, 639 (2017).
64. Liu M., Zhang L., Wang T.: *Chem. Rev.* 115, 7304 (2015).
65. Naaman R., Paltiel Y., Waldeck D. H.: *Nat. Rev. Chem.* 3, 250 (2019).
66. Nepil F.: *O Joklovi, Tomášovi a Evě*, v knize: *Kde jsi chodil satane?* Československý spisovatel, Praha 1966.

M. Jurášek^a, B. Kratochvíl^b, M. Kohout^c, F. Švec^d, and P. Drašar^a (^a Department of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology, Prague, ^b Department of Solid State Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, ^c Department of Organic Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, ^d Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic): **On the Separation and Strengthening of the Image Behind the Mirror (Deracemization and Chirality Amplification)**

The article describes the basic aspects of chirality, reflects on the origin of the chirality of chemical compounds and brings a view of the basic processes during deracemization. The article indicates the boundlessness of the topic of chirality, chiral coordination, association, and interaction, without making any entitlement to bring an exhaustive overview.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: chirality, symmetry, enantiomers, diastereomers, deracemization, homochirality



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

VITAMIN E – DOPORUČENÝ A SKUTEČNÝ PŘÍJEM

MONIKA SABOLOVÁ^a, JAKUB FIŠNAR^b a ZUZANA RÉBLOVÁ^b

^a Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6,

^b Ústav analýzy potravin a výživy, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, Česká republika
sabolova@af.czu.cz

Došlo 2.8.22, přijato 14.9.23.

Vitamin E má u člověka jen relativně mírné projevy hypovitaminózy, které navíc nejsou, ve většině případů, způsobeny nedostatečným obsahem tokoferolů ve stravě. Pozornosti výživové politiky tak pravděpodobně uniká fakt, že skutečný příjem vitamínu E je u většiny populace (celosvětově) nedostatečný. Tento přehled shrnuje aktuální informace o doporučeném a reálném příjmu vitamínu E a o rizicích a případných benefitech spojených s jeho nedostatečným či zvýšeným příjmem.

Klíčová slova: tokochromanoly, α -tokoferol, antioxidanty, doporučená denní dávka, doplňky stravy

Obsah

1. Úvod
2. Doporučený příjem vitamínu E
3. Projevy nedostatku vitamínu E
4. Rizika spojená s nadměrným příjmem vitamínu E
5. Možný pozitivní efekt zvýšeného příjmu vitamínu E
6. Skutečný příjem vitamínu E
7. Závěr

1. Úvod

V základní literatuře z oblasti chemie potravin je často uváděno, že příjem vitamínu E (běžnou stravou) je (zcela) dostatečný, resp. že deficit příjmu tohoto vitamínu je vzácný¹⁻³. To je však v rozporu s poměrně větším počtem studií⁴⁻¹¹ zabývajících se dietárním příjmem tokoferolů (vitamínu E), podle kterých je příjem tohoto vitamínu u většiny populace nižší než jeho doporučená denní dávka. Cílem tohoto přehledu je proto porovnat aktuální doporučený příjem vitamínu E s jeho příjmem skutečným a dále shrnout informace týkající se rizik (a případně benefitů) spojených s nedostatečným, resp. zvýšeným příjmem tohoto vitamínu.

2. Doporučený příjem vitamínu E

Příjem tokochromanolů (neboli vitamínu E, který je tvořen čtyřmi tokoferoly a čtyřmi tokotrienoly¹²) lze vyjadřovat v jednotkách USP (United States Pharmacopeia),

v jednotkách IU (International Unit) nebo v mg ekvivalentu α -tokoferolu (α -TE). Jak jednotka USP, tak jednotka IU jsou přitom definovány jako 1 mg *all-rac- α* -tokoferol acetátu, což odpovídá 0,67 mg *RRR- α* -tokoferolu nebo 0,74 mg *RRR- α* -tokoferol acetátu. Jeden miligram α -TE pak představuje 1 mg *RRR- α* -tokoferolu a celkový obsah vitamínu E vyjádřený v α -TE je dán součtem miligramů jednotlivých tokoferolů a tokotrienolů, které jsou vynásobeny příslušnými koeficienty vyjadřujícími jejich relativní biologickou aktivitu ve vztahu k *RRR- α* -tokoferolu; tj. $\text{mg } \alpha\text{-TE} = \text{mg } \alpha\text{-tokoferolu} \times 1 + \text{mg } \beta\text{-tokoferolu} \times 0,5 + \text{mg } \gamma\text{-tokoferolu} \times 0,1 + \text{mg } \delta\text{-tokoferolu} \times 0,03 + \text{mg } \alpha\text{-tokotrienolu} \times 0,3 + \text{mg } \beta\text{-tokotrienolu} \times 0,05$ (cit.²). V novější literatuře a doporučeních týkajících se příjmu vitamínu E, jako je např. doporučení platné v USA (cit.¹³) nebo také doporučení EFSA (Evropská agentura pro bezpečnost potravin)¹⁴, se však lze setkat s definicí, která za vitamin E považuje pouze α -tokoferol, protože ten byl (jako jediný ze všech tokoferolů) testován z hlediska jeho schopnosti inhibovat projevy avitaminózy vitamínu E u člověka¹⁵.

Jak vyplývá z kap. 3, dostatečný příjem vitamínu E je nezbytný zejména pro zamezení vzniku některých neurologických onemocnění plynoucích z jeho nedostatku a částečně pravděpodobně také pro prevenci chorob souvisejících s oxidačním stresem. V současné době však neexistuje jednotné celosvětové doporučení pro příjem vitamínu E (cit.^{5,16}). V různých zemích světa se tak doporučený příjem vitamínu E pro dospělého člověka pohybuje od 7,5 do 15 mg na den (cit.^{13,14,17-19}), přičemž nejnižší hodnoty uvádí Světová zdravotnická organizace (WHO; 10 mg α -TE pro muže a 7,5 mg α -TE pro ženy)¹⁸. Naproti

tomu nejvyšší hodnoty lze nalézt v USA, kde je doporučená denní dávka vitamínu E (definovaného jako 2*R* izomery α -tokoferolu) pro muže i ženy 15 mg (cit.¹³). Tato hodnota by přitom měla být dostatečná (u 97 až 98 % populace) k tomu, aby zabránila peroxidem vodíku indukované hemolýze červených krvinek, která se projevuje při koncentraci α -tokoferolu v krevním séru nižší než 12 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.^{13,20}).

Také EFSA (cit.¹⁴) definuje v doporučeních z roku 2017 vitamín E jako α -tokoferol (na rozdíl např. od doporučení platných v německy mluvících zemích a České republice, kde je příjem vitamínu E stále doporučován v α -TE (cit.^{17,19})). EFSA však vyhodnotila, že v současnosti není dostatek dat o markerech příjmu, stavu a funkce α -tokoferolu, pomocí kterých by se daly odvodit hodnoty doporučeného příjmu vitamínu E pro člověka¹⁴. EFSA proto místo doporučené denní dávky (RDA – Recommended Dietary Allowance, tj. odhadované hodnoty denního přívodu nutrientu, která je dostatečná pro pokrytí potřeb téměř všech, resp. 97–98 % zdravých jedinců příslušné věkové skupiny a pohlaví²¹) uvádí hodnoty tzv. adekvátního příjmu (AI – Adequate Intake), což je doporučený denní přívod nutrientu, který je založen na pozorovaném nebo experimentálně určeném odhadu přívodu nutrientu u skupiny nebo skupin zjevně zdravých osob, jejichž výživový stav je pokládán za uspokojivý²¹. Tyto hodnoty jsou přitom pro muže 13 mg na den a ženy 11 mg na den, a byly odvozeny z výsledků 13 dietárních průzkumů provedených v 9 evropských zemích¹⁴.

Některé odborné publikace^{1,22} pak uvádějí, že potřeba vitamínu E (α -tokoferolu) závisí i na konzumovaném množství nenasycených mastných kyselin, což vychází z předpokladu, že vitamín E ochraňuje *in vivo* nenasycené mastné kyseliny před nežádoucí oxidací. Výsledky studií s lidskými dobrovolníky přitom ukazují, že u diet s průměrným obsahem PUFA (polyenové mastné kyseliny) a hlavním zastoupením linolové kyseliny by měl být k základnímu příjmu vitamínu E, který splňuje nároky bazálního metabolismu (tj. 4 mg α -tokoferolu na den), přičten dodatečný příjem mezi 0,4 a 0,6 mg *RRR*- α -tokoferolu na g PUFA. Ve vztahu k příjmu PUFA pak bylo odhadnuto, že celková denní dávka vitamínu E leží v rozmezí od 12 do 20 mg (cit.²²).

3. Projevy nedostatku vitamínu E

Klasifikace vitamínu E jako esenciální živiny je založena na studiích se zvířaty a na pozorovaných projevech nedostatku α -tokoferolu u lidí. U zvířat je přitom vitamín E nezbytný především pro proběhnutí reprodukčního cyklu. Avšak u člověka se potřeba vitamínu E (α -tokoferolu) pro tuto funkci neprokázala. Hlavními příznaky deficitu vitamínu E u člověka jsou tak neurologické poruchy, především pak ataxie AVED (Ataxia with Vitamin E Deficiency), jejíž nejčastější příčinou je geneticky podmíněná mutace α -TTP (α -tokoferol transportního proteinu)¹⁴. Pacienti s AVED trpí neurologickými poruchami charakterizo-

vanými progresivní periferní neuropatií, neobratností rukou, ztrátou schopnosti koordinovat tělo v prostoru a vymizením některých reflexů^{15,20}.

Nedostatek vitamínu E může však mít u člověka (i zvířat) za následek také hemolytickou anémii (charakterizovanou zvýšeným rozpadem červených krvinek), abnormalitu svalů, mozku, jater a/nebo kostní dřevě, defekty embryogeneze, svalovou slabost, hyporeflexii, zúžení zorného pole, tmavé skvrny v oku, pozitivní Babinskiho a/nebo Rombergův test a další projevy^{3,13,20}. Neléčení výrazného nedostatku vitamínu E pak může vést ke slepotě, některým srdečním onemocněním, permanentnímu poškození nervů a poruchám myšlení²³.

Důležitým znakem charakterizujícím zásobování organismu vitamínem E je koncentrace α -tokoferolu v krevním séru, přičemž normální hodnota se pohybuje kolem 23 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.^{24,25}) a doporučovaná je hodnota 30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ popř. vyšší^{4,13,14}. U pacientů s AVED může být tato koncentrace i nižší než 2,3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.¹⁴). Koncentrace α -tokoferolu v séru nižší než 12 $\mu\text{mol l}^{-1}$ je pak spojována se zvýšeným rozpadem červených krvinek, anémií, větší náchylností k infekcím, opožděným vývojem a s negativními dopady na matku a dítě během těhotenství^{13,25}. Koncentrace α -tokoferolu v krevním séru nižší než 12 $\mu\text{mol l}^{-1}$ je přitom běžně pozorována u lidí trpících nemocemi, které ovlivňují vstřebávání a distribuci vitamínu E (jako jsou např. cystická fibróza nebo abetalipoproteinemie). Objevuje se ale také u lidí majících nízký příjem vitamínu E (α -tokoferolu) ze stravy²⁴.

Je však zajímavé, že u zdravých lidí konzumujících pestrou stravu se příznaky nízkého příjmu vitamínu E obvykle neprojevují ani při koncentraci α -tokoferolu v krevním séru nižší než 12 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.¹³). Avšak i tito lidé jsou potenciálně ohroženi, a lze předpokládat, že nízký příjem vitamínu E může snižovat obranyschopnost jejich organismu vůči nadměrnému oxidačnímu stresu^{3,25}. Zpočátku může pravděpodobně docházet zejména k anémii z důvodu relativně krátké životnosti červených krvinek. Poté může následovat poškození buněk resp. celých tkání s krátkým životním cyklem (jako jsou např. neutrofilů²⁶, dendritické buňky²⁷, buňky endotelu nebo jaterní buňky²⁸), a s postupujícím úbytkem vitamínu E v organismu budou pravděpodobně v ohrožení také periferní nervy (zvláště smyslové neurony), které mají relativně vysoký obsah PUFA. To může vést až k poškození mozku a zvláště u starších lidí k poruchám chování. Naopak buňky trávicího traktu budou pravděpodobně méně poškozovány, jelikož mohou být ochraňovány i jinými antioxidanty přítomnými v dietě²⁵.

Obecně však platí, že deficit vitamínu E se u člověka vyskytuje jen zřídka a prakticky není způsobován nedostatečným obsahem tokoferolů ve stravě. Příčinou deficitu jsou nejčastěji genetické poruchy ovlivňující α -TTP nebo syndromy související s malabsorpcí tuku a/nebo vitamínu E, popřípadě stavy související s energeticko-proteinovou malnutricí. Malabsorpce vitamínu E může být přitom způsobena především poruchami slinivky a jater snižujícími absorpci tuku nebo poruchami buněk střevního traktu.

Avšak také poruchy metabolismu lipoproteinů způsobující nízké až nedetegovatelné koncentrace chylomikronů a VLDL (lipoproteiny s velmi nízkou hustotou) a LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou) částic negativně ovlivňují absorpci a transport vitamínu E (cit. ^{3,20}).

4. Rizika spojená s nadměrným příjmem vitamínu E

Vitamin E je jeden z nejméně toxických vitaminů a nejsou známy žádné vedlejší efekty plynoucí z jeho příjmu prostřednictvím potravin. Studie na zvířatech pak ukázaly, že vitamin E není mutagenní, karcinogenní ani teratogenní². Ani předávkování vitamínem E (hypervitaminóza) z běžných doplňků stravy nehrozí, neboť zdravý lidský organismus má v játrech účinný regulační systém, který při nadměrném příjmu vitamínu E zvýší intenzitu jeho metabolismu a vylučování močí. Ve studiích zabývajících se nadměrným příjmem vitamínu E prostřednictvím doplňků stravy bylo přitom zjištěno, že 100násobné překročení běžného příjmu ze stravy mělo za následek pouze 2 až 4násobné zvýšení koncentrace vitamínu E v krevním séru²⁵. Bylo však zjištěno, že u některých osob, které během dne přijaly 1600 až 3000 mg α -tokoferolu, což je asi 100 až 200násobek doporučené denní dávky (cit. ¹), se objevila svalová slabost, dvojitě vidění, nadýmání, nevolnost, únava, průjem, bolest na hrudníku, emoční poruchy a další nežádoucí jevy. Při ještě vyšších dávkách bylo pak u některých zvířat pozorováno, že vysoké dávky α -tokoferolu mohou způsobit krvácení (hemoragii), prodloužit protrombinový čas a inhibovat srážení krve. Hemoragický účinek nadměrného příjmu vitamínu E byl pozorován i u člověka, avšak v rozsáhlých klinických studiích nebyl jednoznačně potvrzen. I přesto byla na základě těchto studií stanovena maximální tolerovatelná dávka (UL – upper limit) α -tokoferolu pro člověka, a to na 14 mg na kg tělesné hmotnosti a den (cit. ²).

5. Možný pozitivní efekt zvýšeného příjmu vitamínu E

V patogenezi některých chorob, jako jsou kardiovaskulární onemocnění (KVO), nádorová onemocnění, šedý zákal (katarakta), makulární degenerace a některá neurodegenerativní onemocnění, se předpokládá, že zvýšená (neřízená) oxidace lipidů, DNA a bílkovin hraje významnou roli v jejich vzniku a rozvoji. Například oxidace LDL částic je považována za klíčový iniciační krok v procesu rozvoje aterosklerózy¹⁵. Některé studie^{3,29–36} ukázaly, že dostatečný příjem antioxidantů dietou má preventivní účinek vůči vzniku a rozvoji nádorových a kardiovaskulárních onemocnění, šedého zákalu a dalších onemocnění.

V souvislosti s těmito skutečnostmi a s ohledem na prokázanou antioxidační aktivitu tokoferolů *in vitro* (a jejich předpokládanou antioxidační aktivitu *in vivo*)²³

byla (a je) velká část výzkumu vitamínu E zaměřena na potvrzení hypotézy, že suplementace tímto vitamínem (nad jeho doporučenou denní dávku) může být významným faktorem v prevenci vzniku a dalšího rozvoje některých chronických onemocnění^{2,24,37–47}. Souhrně lze přitom konstatovat, že zatímco studie na modelových systémech a zvířatech (zabývajících se pozitivním efektem suplementace vitamínem E na nemoci, jako je ateroskleróza, nádorová a neurodegenerativní onemocnění nebo zánět) se ukázaly být úspěšné, u lidí skončila většina epidemiologických i klinických studií neutrálně anebo dokonce dopadly v neprospěch suplementace vitamínem E (cit. ²⁴).

Při detailnějším pohledu nalezneme několik observačních studií^{48–50}, ve kterých byla pozorována spojitost mezi nižším výskytem srdečních onemocnění a vysokým příjmem vitamínu E (i když větší počet studií dospěl k jiným závěrům – viz dále). Například ve studii s přibližně 90 000 zdravotními sestrami bylo zjištěno, že výskyt srdečních onemocnění byl o 30 až 40 % nižší u osob s vyšším příjmem vitamínu E (z doplňků stravy)⁴⁹. Podobně byly u 5133 finských mužů a žen, kteří byli sledováni průměrně po dobu 14 let, vyšší dietární příjmy vitamínu E spojeny se sníženou úmrtností na ischemickou chorobu srdeční⁵⁰. Tyto předpoklady byly poté potvrzeny v klinické studii⁵¹, ve které byly po dobu 10 let pozorovány původně zdravé ženy. Zde bylo zjištěno, že příjem 600 IU *RRR*- α -tokoferolu snížil úmrtnost na KVO o 24 % a u žen nad 65 let dokonce o 49 %.

Naproti tomu v klinické studii HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) bylo 4,5 roku pozorováno téměř 10 000 pacientů, kteří byli vysoce ohroženi srdeční nebo mozkovou mrtvicí a kteří denně přijímali 400 IU přírodního vitamínu E. Výsledky ukázaly, že u těchto pacientů nebyl pozorován nižší výskyt kardiovaskulárních příhod, srdečního selhání a bolesti na hrudi ve srovnání s kontrolní skupinou, která konzumovala placebo⁵². V navazující studii HOPE-TOO (Heart Outcomes Prevention Evaluation – The Ongoing Outcomes) pak téměř 4000 pacientů z původní HOPE studie užívalo dalšího 2,5 roku vitamin E nebo placebo. Bylo přitom zjištěno, že po celkových 7 letech sledování vitamin E významně neochráňoval pacienty před srdeční a mozkovou mrtvicí, nestabilní anginou pectoris a úmrtím na KVO nebo z jiných příčin. Navíc, účastníci, kteří přijímali vitamin E, byli více ohroženi výskytem srdečního selhání a hospitalizací z tohoto důvodu⁵³. Klinické studie HOPE a HOPE-TOO tak poskytly přesvědčivý důkaz, že poměrně vysoké dávky vitamínu E nesnižují riziko výskytu vážných kardiovaskulárních příhod u žen a mužů (nad 50 let) s již zjištěnou srdeční nemocí a/nebo diabetem⁵⁴. Tento závěr byl potvrzen také dalšími studiemi⁵⁵ a ani další klinické studie^{48,51,56} a významné souhrnné studie^{57,58} neprokázaly pozitivní efekt suplementace stravy přirozeným nebo syntetickým vitamínem E na výskyt kardiovaskulárních onemocnění a celkovou úmrtnost. V některých případech bylo naopak pozorováno, že suplementace vitamínem E významně zvýšila riziko hemoragické mozkové cévní příhody⁴⁸.

Podobně jako u kardiovaskulárních chorob lze rozporné výsledky nalézt také u vlivu suplementace vitamínu E u nádorových chorob. Například Americká společnost pro rakovinu provedla epidemiologickou studii, ve které studovala spojitost mezi suplementací stravy vitamínu E a C a úmrtností na rakovinu močového měchýře. Výsledky ukázaly, že z celkového počtu jednoho milionu dospělých účastníků (kteří byli sledováni mezi roky 1982 a 1992), bylo prokázáno snížené riziko úmrtí na rakovinu močového měchýře u těch, kteří užívali doplňky stravy s vitamínem E po dobu 10 let a déle⁵⁹. Další studie pak prokázaly pozitivní efekt zvýšeného příjmu vitamínu E (suplementací nebo z potravy) rovněž na výskyt rakoviny prostaty^{48,60}. Například muži kuřáci a bývalí kuřáci, kteří denně brali 400 IU a více vitamínu E, měli významně snížené riziko (až o 71 %) pokročilé rakoviny prostaty⁴⁸.

Na základě těchto slibných výsledků byla provedena klinická studie SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) s přibližně 35 000 zdravými muži ve věku 50 let a staršími, kteří užívali po dobu několika let denně 400 IU syntetického vitamínu E (s nebo bez selenu). Výsledky ukázaly, že pouze příjem syntetického vitamínu E nevedl ke snížení výskytu rakoviny prostaty⁶¹, a z navazujících studie dokonce vyplynulo, že muži, kteří užívali vitamín E, měli o 17 % zvýšené riziko rakoviny prostaty (v porovnání s těmi, kteří užívali placebo)⁶². Další studie s přibližně 89 000 ženami a s asi 47 000 muži pak nepotvrdila spojitost mezi suplementací vitamínem E a sníženým rizikem vzniku rakoviny tlustého střeva⁶³ a nebyl prokázán ani pozitivní efekt příjmu vitamínu E na snížení výskytu rakoviny prsu ve studii s 18 000 ženami po menopauze⁶⁴. A především, studie HOPE-TOO (viz dříve) a studie Women's Health Study, ve které byly pozorovány po dobu 10 let zdravé ženy ve věku 45 let a starší, neprokázaly, že by suplementace vitamínem E (400 IU na den, resp. 600 IU každý druhý den) snížila riziko vzniku rakoviny nebo úmrtí v důsledku rakoviny^{51,53}.

V případě vlivu vitamínu E na zrak některé studie ukázaly^{48,65,66}, že přípravky s vitamínem E, jinými antioxidanty, zinkem a mědí zpomalují rozvoj věkem podmíněné makulární degenerace u lidí s pokročilým stupněm této nemoci. Naopak jiné studie^{15,67–69} nepotvrdily, že by suplementace vitamínem E chránila před vznikem tohoto onemocnění. A podobně, v některých pracích bylo zjištěno, že vitamín E nebyl účinný v prevenci a léčbě Alzheimerovy choroby a mírných poruch kognitivních funkcí^{15,70}, a ani v prevenci výskytu demence u asymptomatických mužů^{15,71}. Existují však i studie, ve kterých byla pozorována spojitost mezi suplementací vitamínem E a nižším výskytem kognitivních poruch^{48,72,73} včetně Parkinsonovy choroby⁷⁴.

V současné době proto řada výzkumníků a institucí nedoporučuje příjem vitamínu E nad jeho doporučenou denní dávku^{13,14}, neboť, jak vyplývá z předchozího textu, klinické studie doposud dostatečně neprokázaly, že by suplementace vitamínem E (nad jeho doporučené denní dávky) chránila před vznikem a rozvojem KVO, rakoviny,

šedého zákalu, věkem podmíněné makulární degenerace nebo poruchy kognitivních funkcí⁴⁸.

Naproti tomu v některých jiných případech může být suplementace vitamínem E přínosem. V literatuře je dobře popsán pozitivní efekt suplementace vitamínem E u pacientů s ataxií AVED (viz kap. 3). V některých případech zvýšený příjem vitamínu E dokonce zvrátil průběh tohoto onemocnění^{5,15,24,75}.

Pozitivní vliv suplementace vitamínem E (800 IU na den) byl pozorován také v klinických studiích s nediabetskými pacienty, u kterých se vyskytuje nealkoholové ztučnění jater^{5,76,77}. Některé hepatologické a gastroenterologické asociace proto doporučují u těchto pacientů zařadit do léčby vitamín E v dávce 800 IU na den (cit. ^{5,78–80}).

Kromě studia možného pozitivního efektu zvýšeného příjmu vitamínu E samotného byla pozornost věnována také studiu možného pozitivního efektu zvýšeného příjmu vitamínu E v kombinaci se zvýšeným příjmem dalšího (nebo dalších) mikronutrientů (mikronutrientů). Velmi obsáhlým způsobem je tato problematika zpracována v souhrnném článku⁸¹, ze kterého vyplývá, že ačkoli je k dispozici pouze omezený počet studií, existují jasné důkazy o interakcích vitamínu E s jinými živinami, včetně vitamínů a minerálních látek. Jedná se zejména o interakce vitamínu E s vitamínem C, karoteny, selenem a zinkem. Tyto interakce pravděpodobně ovlivňují endogenní tvorbu metabolitů vitamínu E a mohou působit synergicky při regulaci redoxní homeostázy v lidském těle⁸¹.

I přes rozsáhlé intervenční studie však doposud není zcela pochopeno synergické působení vitamínu E a vitamínu C v prevenci metabolických onemocnění. Zároveň nebylo v intervenčních studiích potvrzeno, že by měla souběžná suplementace vitamínem E a selenem, zinkem a/nebo karoteny rušivé účinky. Kohortové studie a randomizované klinické studie však přinesly kontroverzní výsledky a naznačily možné škodlivé účinky souběžné suplementace těmito mikronutrienty ve vysokých dávkách⁸¹.

6. Skutečný příjem vitamínu E

Při zjišťování reálného příjmu vitamínu E se nejčastěji využívá dietárních průzkumů⁴. Při nich respondent udává (pomocí různých dotazníkových metod), jaké potraviny a pokrmy, a v jakém množství, zkonsumoval v určitém časovém období, a poté se příjem vitamínu E určí výpočtem za pomoci tabulek typického složení potravin. Pro zjištění příjmu vitamínu E lze však použít i analytické metody, během kterých je stanovován obsah tokoferolů v běžné porci kulinárně připravených pokrmů nebo v paralelní celodenní dietě. Může se také použít kombinace dotazníkové a analytické metody. Ve studiích porovnávajících analyticky zjištěný příjem některých živin s příjmem vypočteným bylo přitom zjištěno, že výsledky obou metod se mohou výrazně lišit^{82–85}. Odlišnosti byly

nalezeny hlavně u některých mikronutrientů, včetně jednotlivých tokoferolů. Například pro α -tokoferol může být v některých případech příjem získaný výpočtem až dvojnásobný oproti příjmu zjištěnému analyticky⁸².

Dalšími možnostmi, jak lze získat představu o reálném příjmu vitamínu E (resp. o tom, že je tento příjem dostatečný), je stanovení tokoferolů v krvi, tukové tkáni nebo jejich metabolitů v moči²⁵. V USA je od roku 2000 Institutem medicíny doporučováno, že koncentrace vitamínu E (α -tokoferolu) v krevním séru by neměla klesnout pod hodnotu $12 \mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.^{13,14}). U zdravých lidí konzumujících různorodou stravu včetně ořechů a celozrnných produktů je přitom průměrná koncentrace α -tokoferolu v krevním séru přibližně $20 \mu\text{mol l}^{-1}$, zatímco lidé konzumující suplementy nebo obohacené potraviny mají tuto koncentraci typicky $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ a více. Také metabolit α -tokoferolu, 2,5,7,8-tetramethyl-2-(2'-karboxyethyl)-6-hydroxychroman (α -CEHC), může být vhodným biomarkerem obsahu vitamínu E (α -tokoferolu) v organismu. V této souvislosti platí, že pokud organismus během dne vyloučí močí více než $1,39 \mu\text{mol } \alpha\text{-CEHC}$ na g kreatininu, je množství vitamínu E v těle dostačující²⁵.

Studie zabývající se reálným příjmem vitamínu E ukazují (bez ohledu na použitou metodiku), že příjem tohoto vitamínu je všeobecně nízký^{4,5}. V relativně nedávno publikovaných pracích bylo zjištěno, že nedostatečný příjem vitamínu E je u obyvatel Německa a Holandska, kde 25 až 50 % sledovaných osob nespňuje doporučenou hodnotu příjmu vitamínu E (cit.⁷). Rovněž v Řecku minimálně 75 % populace přijímá vitamin E v množství pod 12 mg na den⁸. I dospívající z Velké Británie ve věku 10 až 19 let, u kterých se sbírala data v průzkumu mezi roky 2008 a 2012, měli průměrný dietární příjem vitamínu E jen 8,8 mg na den⁹. V americkém průzkumu NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), který proběhl v letech 2009–2010, byli sledováni muži a ženy starší dvaceti let. Přitom bylo zjištěno, že muži přijímali stravou denně průměrně 8,9 mg vitamínu E (přepočteno na α -tokoferol) a ženy jen 7,1 mg (cit.¹¹). O nízkém příjmu vitamínu E vypovídá i nízká koncentrace α -tokoferolu v krevním séru (nižší než $12 \mu\text{mol l}^{-1}$) u téměř čtvrtiny dospělých Jihokorejců⁶ a také nedostatečná hladina α -tokoferolu v krvi, která se vyskytuje u 14 až 19 % evropské dospívající mládeže¹⁰.

Nejvýrazněji však asi všeobecně nedostatečný dietární příjem vitamínu E (α -tokoferolu) potvrzuje nedávno publikovaná souhrnná studie⁴. V tomto systematickém souhrnu bylo analyzováno 176 studií, které byly publikovány v letech 2000 až 2012. V těchto původních pracích byl sledován příjem vitamínu E prostřednictvím různých výpočtových metod a/nebo byla sledována koncentrace vitamínu E v krvi. Hodnoty dietárního příjmu α -tokoferolu zjištěné v jednotlivých studiích byly jednotně vyjádřeny v mg α -tokoferolu přijatého za den a byly srovnávány s referenční hodnotou podle amerického Institutu medicíny (tj. RDA = 15 mg na den). Hodnoty pro koncentraci α -tokoferolu v krvi pak byly jednotně vyjádřeny v mikromolech α -tokoferolu v jednom litru krevního séra a srovná-

návány s referenční hodnotou $12 \mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.^{4,13}). Výsledky této studie ukázaly, že příjem vitamínu E (α -tokoferolu) je celosvětově u 82 % populace nižší než doporučená denní dávka 15 mg na den. Příjem α -tokoferolu nižší než 15 mg na den má až 91 % populace v Americe, zatímco v Evropě je tomu tak u 80 % populace a v Austrálii a jižní a východní Asii u 60 % populace. V případě koncentrace vitamínu E (α -tokoferolu) v krevním séru má celosvětově 13 % populace hodnotu nižší než $12 \mu\text{mol l}^{-1}$, přičemž se jedná převážně o novorozence a děti do věku 12 let. Nízká koncentrace vitamínu E v séru byla zjištěna u 8 % populace v Evropě, 11 % populace v Americe, 16 % populace v Austrálii a jižní a východní Asii a na Středním východě a v Africe byly nízké koncentrace vitamínu E zaznamenány dokonce u 27 % populace⁴.

7. Závěr

Z informací shromážděných v tomto článku lze vyvodit, že příjem vitamínu E běžnou dietou je u většiny populace (celosvětově) nižší než příjem doporučený. Ačkoliv tato skutečnost nemá významnější přímé projevy (zejména při konzumaci pestré stravy bohaté na ostatní antioxidanty), bylo by užitečné se tímto problémem zabývat (a to především s ohledem na to, že kardiovaskulární a nádorová onemocnění, s jejichž rozvojem může příjem vitamínu E souviset, se u člověka vyvíjí do zjevných projevů i několik desítek let). Vhodnou cestou pro zvýšení příjmu vitamínu E by přitom měla být konzumace potravin bohatých na tento vitamin (tj. rostlinných olejů, ořechů či celozrnného pečiva) a/nebo kvalifikovaná fortifikace vhodných potravin (jako jsou například rafinované rostlinné oleje, margaríny nebo vejce). Tato cesta je výrazně vhodnější než masivní příjem vitamínu E formou doplňků stravy, neboť (jak bylo ukázáno v tomto článku) tento způsob zvyšování příjmu vitamínu E nemá (kromě přesně vymezených aplikací) obecně pozitivní efekt (a v některých případech měl i efekty negativní).

LITERATURA

1. Velíšek J.: *The Chemistry of Food*. John Wiley & Sons, Hoboken 2014.
2. Eitenmiller R., Lee J.: *Vitamin E: Food Chemistry, Composition, and Analysis*. Marcel Dekker Inc., New York 2004.
3. Eitenmiller R. R., Landen W. O., v knize: *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences* (Eitenmiller R. R., Landen W. O., Ye L., ed.), kap. 3, str. 119. CRC Press, Boca Raton 2008.
4. Péter S., Friedel A., Roos F. F., Wyss A., Eggersdorfer M., Hoffmann K., Weber P.: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 85, 261 (2015).
5. Galli F., Azzi A., Birringer M., Cook-Mills J. M., Eggersdorfer M., Frank J., Cruciani G., Lorkowski S., Özer N. K.: *Free Radical Biol. Med.* 102, 16 (2017).

6. Kim Y. N., Cho Y. O.: *Nutr. Res. Pract.* 9, 192 (2015).
7. Troesch B., Hoefl B., McBurney M., Eggersdorfer M., Weber P.: *Br. J. Nutr.* 108, 692 (2012).
8. Manios Y., Moschonis G., Mavrogianni C., Bos R., Singh-Povel C.: *Nutrients* 6, 4073 (2014).
9. Li Z., Evans C., Cade J.: *Proc. Nutr. Soc.* 75, E112 (2016).
10. Valtueña J., Breidenassel C., Folle J., González-Gross M.: *Nutr. Hosp.* 26, 280 (2011).
11. <https://www.ars.usda.gov>, staženo 9. 3. 2018.
12. Fišnar J., Rěblová Z.: *Chem. Listy* 116, 287 (2022).
13. Institute of Medicine: *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. The National Academies Press, Washington DC 2000.
14. EFSA (European Food Safety Authority): *EFSA J.* 14, e15121 (2017). doi:10.2903/sp.efsa.2017.e15121.
15. Azzi A.: *Mol. Aspects Med.* 61, 92 (2018).
16. Schmölz L., Birringer M., Lorkowski S., Wallert M.: *World J. Biol. Chem.* 7, 14 (2016).
17. Společnost pro výživu: *Referenční hodnoty pro příjem živin*. Výživaservis, Praha 2019.
18. WHO/FAO: *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. Sun Fung, Hong Kong 2004.
19. <http://www.sge-ssn.ch>, staženo 1. 7. 2022.
20. Traber M. G.: *Vitamin E*. CRC Press, Boca Raton 2014.
21. <http://www.szu.cz>, staženo 24. 4. 2018.
22. Raederstorff D., Wyss A., Calder P. C., Weber P., Eggersdorfer M.: *Br. J. Nutr.* 114, 1113 (2015).
23. Rizvi A., Raza S. T., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S., Mahdi F.: *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 14, 157 (2014).
24. Zingg J. M.: *Mol. Aspects Med.* 28, 400 (2007).
25. Traber M. G.: *Adv. Nutr.* 5, 503 (2014).
26. Ng L. G., Ostuni R., Hidalgo A.: *Nat. Rev. Immunol.* 19, 255 (2019).
27. Banerjee S.: *INDECS* 15, 190 (2017).
28. Knook D. L.: *Aktuelle Gerontol.* 7, 1 (1977).
29. Diplock A. T.: *Mol. Aspects Med.* 15, 293 (1994).
30. Block G., Patterson B., Subar A.: *Nutr. Cancer* 18, 1 (1992).
31. Fernandez-Pancho M. S., Villano D., Troncoso A. M., Garcia-Parrilla M. C.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 649 (2008).
32. Stoner G. D., Wang L. S., Casto B. C.: *Carcinogenesis* 29, 1665 (2008).
33. Willcox J. K., Ash S. L., Catignani G. L.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 275 (2004).
34. Serafini M.: *J. Sci. Food Agric.* 86, 1989 (2006).
35. Dagfinn A.: *Adv. Nutr.* 10, S404 (2019).
36. Parohan M., Sadeghi A., Khatibi S. R., Nasiri M., Milajerdi A., Khodadost M., Sadeghi O.: *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 138, 70 (2019).
37. Munteanu A., Zingg J. M.: *Mol. Aspects Med.* 28, 538 (2007).
38. Azzi A., Gysin R., Kempna P., Ricciarelli R., Villacorta L., Visarius T., Zingg J. M.: *Mol. Aspects Med.* 24, 325 (2003).
39. Hathcock J. N. a 13 spoluautorů: *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 736 (2005).
40. Coulter I. D., Hardy M. L., Morton S. C., Hilton L. G., Tu W., Valentine D., Shekelle P. G.: *J. Gen. Intern. Med.* 21, 735 (2006).
41. Neuzil J.: *Br. J. Cancer* 89, 1822 (2003).
42. Ricciarelli R., Argellati F., Pronzato M. A., Domenicotti C.: *Mol. Aspects Med.* 28, 591 (2007).
43. Morris M. C., Evans D. A., Tangney C. C., Bienias J. L., Wilson R. S., Aggarwal N. T., Scherr P. A.: *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 508 (2005).
44. Fariss M. W., Zhang J. G.: *Toxicology* 189, 129 (2003).
45. Mariotti C. a 15 spoluautorů: *Neurol. Sci.* 25, 130 (2004).
46. Yang C. S., Luo P., Zeng Z., Wang H., Malafa M., Suh N.: *Mol. Carcinog.* 59, 365 (2020).
47. Abraham A., Kattoor A. J., Saldeen T., Mehta J. L.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 2831 (2019).
48. <https://ods.od.nih.gov>, staženo 9. 3. 2018.
49. Stampfer M. J., Hennekens C. H., Manson J. E., Colditz G. A., Rosner B., Willett W. C.: *N. Engl. J. Med.* 328, 1444 (1993).
50. Knekt P., Reunanen A., Jarvinen R., Seppanen R., Heliövaara M., Aromaa A.: *Am. J. Epidemiol.* 139, 1180 (1994).
51. Lee I. M., Cook N. R., Gaziano T. A., Gordon D., Ridker P. M., Manson J. E., Hennekens C. H., Buring J. E.: *J. Am. Med. Assoc.* 294, 56 (2005).
52. Jialal I., Devaraj S.: *N. Engl. J. Med.* 342, 154 (2000).
53. Lonn E., Bosch J., Yusuf S., Sheridan P., Pogue J., Arnold J. M., Sleight P., Probstfield J., Dagenais G. R.: *J. Am. Med. Assoc.* 293, 1338 (2005).
54. Brown B. G., Crowley J.: *J. Am. Med. Assoc.* 293, 1387 (2005).
55. Waters D. D. a 15 spoluautorů: *J. Am. Med. Assoc.* 288, 2432 (2002).
56. Sesso H. D., Buring J. E., Christen W. G., Kurth T., Belanger C., MacFadyen J., Bubes V., Manson J. E., Glynn R. J., Gaziano J. M.: *J. Am. Med. Assoc.* 300, 2123 (2008).
57. Shah S., Shiekh Y., Lawrence J. A., Ezekwueme F., Alam M., Kunwar S., Gordon D. K.: *Cureus* 13, e15616 (2021).
58. Violi F., Nocella C., Loffredo L., Carnevale R., Pignatelli P.: *Free Radical Biol. Med.* 178, 26 (2022).
59. Jacobs E. J., Henion A. K., Briggs P. J., Connell C. J., McCullough M. L., Jonas C. R., Rodriguez C., Calle E. E., Thun M. J.: *Am. J. Epidemiol.* 156, 1002 (2002).
60. Heinonen O. P. a 14 spoluautorů: *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 440 (1998).
61. <https://www.cancer.gov>, staženo 9. 3. 2018.
62. Klein E. A. a 20 spoluautorů: *J. Am. Med. Assoc.* 306, 1549 (2011).
63. Wu K., Willett W. C., Chan J. M., Fuchs C. S., Colditz G. A., Rimm E. B., Giovannucci E. L.:

- Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev. 11, 1298 (2002).
64. Graham S., Sielezny M., Marshall J., Priore R., Freudenheim J., Brasure J., Haughey B., Nasca P., Zdeb M.: Am. J. Epidemiol. 136, 3127 (1992).
 65. Age-Related Eye Disease Study Research Group: Arch. Ophthalmol. 119, 1417 (2001).
 66. The Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group: J. Am. Med. Assoc. 309, 2005 (2013).
 67. Age-Related Eye Disease Study Research Group: Am. J. Ophthalmol. 132, 668 (2001).
 68. Taylor H. R., Tikellis G., Robman L. D., McCarty C. A., McNeil J. J.: Br. Med. J. 325, 11 (2002).
 69. Teikari J. M., Laatikainen L., Virtamo J., Haukka J., Rautalahti M., Liesto K., Albanes D., Taylor P., Heinonen O. P.: Acta Ophthalmol. Scand. 76, 224 (1998).
 70. Isaac M. G. E. K. N., Quinn R., Tabet N.: Cochrane Database Syst. Rev. 3, CD002854 (2008).
 71. Kryscio R. J., Abner E. L., Caban-Holt A., Lovell M., Goodman P., Darke A. K., Yee M., Crowley J., Schmitt F. A.: JAMA Neurol. 74, 567 (2017).
 72. Sano M. a 11 spoluautorů: N. Engl. J. Med. 336, 1216 (1997).
 73. Morris M. C., Evand D. A., Bienias J. L., Tangney C. C., Wilson R. S.: Arch. Neurol. 59, 1125 (2002).
 74. Schirinzi T. a 10 spoluautorů: Front. Neurol. 10, 148 (2019).
 75. Martinello F., Fardin P., Ottina M., Ricchieri G. L., Koenig M., Cavalier L., Trevisan C. P.: J. Neurol. Sci. 156, 177 (1998).
 76. Sanyal A. J. a 15 spoluautorů: N. Engl. J. Med. 362, 1675 (2010).
 77. Lavine J. E. a 16 spoluautorů: J. Am. Med. Assoc. 305, 1659 (2011).
 78. Chalasani N., Younossi Z., Lavine J. E., Diehl A. M., Brunt E. M., Cusi K., Charlton M., Sanyal A. J.: Gastroenterology 142, 1592 (2012).
 79. Arab J. P. a 13 spoluautorů: World J. Gastroenterol. 20, 12182 (2014).
 80. Watanabe S. a 19 spoluautorů: J. Gastroenterol. 50, 364 (2015).
 81. Liao S., Omega S. O., Börmel L., Kluge S., Schubert M., Wallert M., Lorkowski S.: Antioxidants 11, 1785 (2022).
 82. Rodríguez-Palmeroa M., Castellote-Bargalló A. I., López-Sabatera C., de la Torre-Boronata C., Rivero-Urgell M.: Food Chem. 61, 215 (1998).
 83. Heinonen M., Valsta L., Anttolainen M., Ovaskainen M. L., Hyvönen L., Mutanen M.: J. Food Compos. Anal. 10, 3 (1997).
 84. Sundla I., Murkovic M., Bandonienc D., Winklhofer-Roob B. M.: Clin. Nutr. 26, 145 (2007).
 85. Papadaki A., Valsta L. M., Lampi A. M., Peñalvo J., Adlercreutz H., Vardavas C., Kafatos A.: J. Food Compos. Anal. 24, 22 (2011).

M. Sabolová^a, J. Fišnar^b, and Z. Réblová^b (^a Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Czech University of Life Sciences Prague, ^b Department of Food Analysis and Nutrition, University of Chemistry and Technology Prague, Czech Republic): **Vitamin E – Recommended and Actual Intake**

Vitamin E has only relatively mild manifestations of hypovitaminosis in humans, which, moreover, are not, in most cases, caused by insufficient content of tocopherols in the diet. Thus, the fact that the actual intake of vitamin E is (worldwide) insufficient in the majority of the population is likely to escape the attention of nutrition policy. This review summarizes current information on the recommended and actual intake of vitamin E and on the risks and possible benefits associated with insufficient or increased intake.

Keywords: tocochromanols, α -tocopherol, antioxidants, recommended dietary allowance, food supplements



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

URČENÍ POLOH NÁSOBNÝCH VAZEB V LIPIDECH POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE. ČÁST I

ŠTĚPÁN STRNAD, VLADIMÍR VRKOSLAV a JOSEF CVAČKA

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Česká republika
josef.cvacka@uochb.cas.cz

Došlo 7.8.23, přijato 5.10.23.

Strukturální analýza lipidů je jedním z klasických témat organické hmotnostní spektrometrie. V posledních letech jsme svědky rychlého vývoje nových metod, které umožňují charakterizovat struktury lipidů přesněji, rychleji, a ze složitějších vzorků. Tyto metody jsou většinou založeny na derivatizačních reakcích nebo nově dostupných fragmentačních technikách. Základní hmotnostně-spektrometrická analýza lipidů, tj. určení třídy lipidů, délky acylového řetězce a stupně nenasycení bývá poměrně snadná, podrobnější popis struktury je však složitější. Ve dvoudílném přehledovém článku představujeme pokroky hmotnostní spektrometrie při charakterizaci dvojných a trojných vazeb v acylových řetězcích lipidů metodami LC-MS a přímou ionizací kapalných vzorků za atmosférického tlaku. V prvním článku se věnujeme derivatizacím doprovázeným změnou polaritý náboje, ozonolýze a Paternò-Büchiho reakci.

Klíčová slova: dvojná vazba, fragmentce, hmotnostní spektrometrie, lipidy, ozonolýza, Paternò-Büchi, strukturální analýza, trojná vazba

Obsah

1. Úvod
2. Fragmentační techniky
3. Poloha a izomerie násobných vazeb v alifatických řetězcích lipidů
4. Derivatizace mastných kyselin doprovázená změnou polaritý náboje
5. Disociace vyvolaná ozonem – ozonolýza
6. Paternò-Büchiho reakce
7. Závěr

1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie je důležitým nástrojem pro strukturální analýzu lipidů¹. Při ionizaci lipidů vznikají kladně či záporně nabitý ionty se sudým nebo lichým počtem elektronů, které lze využít pro strukturální charakterizaci. Charakter iontů závisí na druhu iontového zdroje, jeho nastavení a také na použitých rozpouštědlech a aditivech. Lipidy, které neposkytují strukturálně diagnostické ionty, lze chemicky modifikovat². V iontových zdrojích pracujících za atmosférického tlaku (elektrosprejová ionizace, ESI; chemická ionizace za atmosférického tlaku, APCI; fotoionizace za atmosférického tlaku, APPI) vznikají v kladném ionizačním módu nejčastěji protonované molekuly. Ne vždy vede fragmentace těchto iontů k požadované strukturální informaci, a proto se cíleně připravují a fragmentují

i další typy iontů, například adukty s alkalickými kovy, kovy alkalických zemin nebo přechodnými kovy. Někdy může být výhodné vytvořit a fragmentovat ionty s lichým počtem elektronů. Takové ionty vznikají typicky při elektronové ionizaci (EI), lze je však také vytvořit za specifických podmínek v iontových zdrojích pro APCI a APPI (cit.³). Některé deriváty lipidů umožňují získat radikálové ionty fragmentací neradikálových prekurzorových iontů. Příkladem mohou být deriváty obsahující jod na aromatickém jádře, které po elektrosprejové ionizaci a aktivaci UV zářením odštěpují jod za vzniku radikálového iontu⁴.

2. Fragmentační techniky

Pro získání fragmentů nesoucích informace o struktuře lze lipidové ionty aktivovat různými způsoby: interakcemi s neutrálními molekulami nebo atomy v plynném stavu, s povrchy, fotony nebo elektrony⁵. Fragmentace lze dosáhnout i použitím chemické reakce⁶.

Kolizně indukovaná disociace (CID) je nejběžnějším způsobem aktivace iontů v hmotnostní spektrometrii. K fragmentaci dochází při srážkách urychlených iontů s neutrálními atomy nebo molekulami v plynné fázi. Ve většině přístrojů pro tandemovou hmotnostní spektrometrii je k dispozici nízkoenergetická CID, která pracuje s relativně malými kinetickými energiemi prekurzorů (< 1 keV). Dochází při ní ke štěpení nejslabších chemických vazeb. Při vysokoenergetické CID (1–20 keV) se

zvyšuje pravděpodobnost přímého štěpení vazeb, což umožňuje podrobnější strukturní analýzu lipidů. Příkladem disociací pozorovaných při vysokých energiích jsou fragmentace s odlehlým nábojem (charge remote fragmentation; CRF). Vysokoenergetickou CID je možno realizovat pouze s méně běžnými přístroji, jako jsou sektorové hmotnostní spektrometry nebo tandemové analyzátoři doby letu (TOF/TOF). Další technika, povrchem indukovaná disociace (surface-induced dissociation, SID), je založena na srážkách prekurzorových iontů s povrchem pevného terče. SID je dnes využívána hlavně pro charakterizaci proteinových komplexů, včetně těch, které vážou lipidy^{7,8}. Přestože je tato aktivací technika známá více než 40 let, komerční přístroje s možností SID se objevily teprve nedávno a její využití pro strukturní analýzu lipidů není proto příliš prozkoumáno.

Ve fotodisociačních technikách se využívají interakce prekurzorových iontů s fotony⁹. K aktivaci dochází pohlcením jednoho fotonu nebo postupnou absorpcí několika fotonů. Zatímco v případě vysokoenergetických fotonů stačí k fragmentaci absorpce jediného kvanta, fotony s nízkou energií aktivují ion postupně, podobně jako v nízkooenergetické CID. Postupná aktivace nízkooenergetickými fotony se využívá při infračervené multifotonové disociaci (infrared multiple photon dissociation, IRMPD). Jak nízkooenergetická CID, tak IRMPD poskytují relativně jednoduchá spektra, která popisují základní strukturní rysy lipidů. Naproti tomu fotodisociace ultrafialovým zářením (ultraviolet photodissociation, UVPD) vede ke vzniku specifických fragmentů, například produktů štěpení vazeb uhlík–uhlík v acylových řetězcích. UV fotony mají dostatek energie k excitaci iontů do vyšších elektronových stavů, a tím k fragmentaci vazeb s vyšší vazebnou energií. UVPD spektra se liší v závislosti na vlnové délce laserového záření¹⁰.

Disociace iontů interakcemi s elektrony se využívá v několika metodách známých jako disociace záchytem elektronu (electron capture dissociation, ECD), disociace přenosem elektronu (electron transfer dissociation, ETD), disociace indukovaná elektrony (electron-induced dissociation, EID) a disociace odtržením elektronů (electron detachment dissociation, EDD). Tyto techniky se souhrnně označují jako ExD (cit.¹¹). Metody ECD a ETD se obvykle využívají pro peptidy a proteiny. Vícenásobně kladně nabitě prekurzorové ionty interagují s termálními elektrony (ECD) nebo reaktivními radikálovými anionty (ETD) a vznikající ionty s redukováným nábojem a lichým počtem elektronů dále fragmentují. Použití ECD a ETD pro lipidy je omezené, protože jejich molekuly většinou neposkytují vícenásobně nabitě ionty. Dvojnásobně nabitě ionty lipidů lze nicméně vytvořit adicí vícemocných iontů kovů¹² nebo několika jednomocných iontů¹³. Při EDD je využívána interakce vícenásobně záporně nabitých iontů s elektrony. Dochází ke ztrátě elektronu a vzniku excitovaných radikálových iontů s vyšším záporným nábojem, které se rozpadají na fragmenty. EDD nachází uplatnění například při strukturní analýze glykolipidů¹⁴. EID se používá k fragmentaci jednonásobně nabitých iontů, které se

při ionizaci lipidů obvykle tvoří. Vícenásobné interakce s elektrony vedou k elektronovým i vibračním excitacím a získaná EID spektra jsou proto informačně bohatá, s rozsáhlým štěpením vazeb v acylových řetězcích.

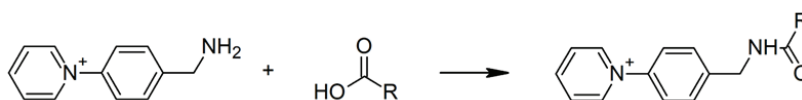
3. Poloha a izomerie násobných vazeb v alifatických řetězcích lipidů

Lipidy mohou tvořit polohové izomery dvojně nebo trojně vazby. Poloha a stereoizomerie násobné vazby ovlivňuje fyzikální a chemické vlastnosti lipidů a odráží se proto i v biologické aktivitě lipidů¹⁵. Lokalizace dvojných vazeb v nenasycených alifatických řetězcích lipidů je klasický analytický problém, který lze řešit hmotnostní spektrometrií. První metody určování polohy násobné vazby byly založeny na EI. Spektra EI většinou nedovolují určit polohu dvojně vazby přímo, a proto se využívaly chemické derivatizace lipidů v místě dvojně vazby¹⁶ nebo na jiné funkční skupině¹⁷. V prvním případě oslabují nově zavedené skupiny vazbu uhlík–uhlík v místě původní dvojně vazby, zatímco druhý přístup umožňuje fragmentaci, která probíhá vzdáleně od místa náboje. Derivatizační strategie využívající fragmentaci v místě náboje a fragmentaci s odlehlým nábojem (CRF) byly později vyvinuty také pro měkké ionizační techniky. Chromatografická separace stereoizomerů dvojných vazeb (*cis/trans* izomerů) je poměrně snadná^{18–21}, ale jejich identifikace z hmotnostních spekter bývá obtížná. Malé rozdíly ve spektrech stereoizomerů jsou většinou pouze v intenzitách fragmentů. Důkazy o geometrii dvojně vazby lze nalézt ve spektrech získaných vysokoenergetickou CID (cit.²²), EID (cit.²³) nebo ozonem indukovanou disociací (OzID)^{24,25}.

Doposud bylo vyvinuto jen několik metod pro určení polohy trojných vazeb. EI spektra 4,4-dimethyl-oxazolinových (DMOX) derivátů mastných kyselin s trojnými vazbami poskytují CRF ionty s rozdílem *m/z* 10 (cit.²⁶). Pravděpodobně jediná metoda ionizace za atmosférického tlaku pro určení polohy trojně vazby využívá chemickou reakci acetonitrilu v plynné fázi při APCI (cit.²⁷).

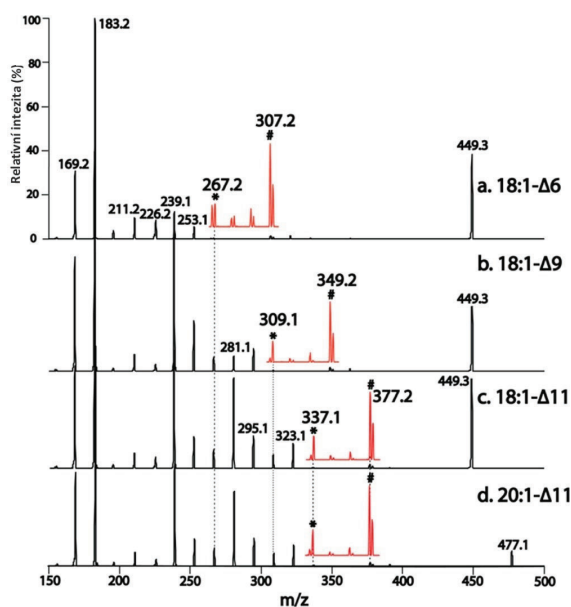
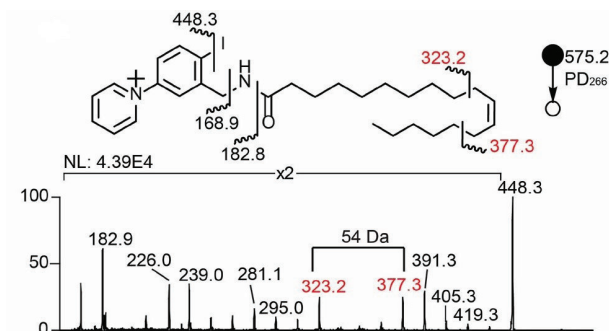
4. Derivatizace mastných kyselin doprovázená změnou polaritě náboje

Lipidy jsou často hydrolyzovány na mastné kyseliny nebo transesterifikovány. Identifikace mastných kyselin a jejich strukturní analýza se tradičně provádí pomocí (GC)/EI-MS (cit.^{2,28}). Nejvíce informací poskytují spektra derivátů s funkční skupinou, na které se po ionizaci lokalizuje kladný náboj, např. pyrrolidiny^{29,30}, pikolinyl (3-hydroxymethylpyridinyl)ové estery¹⁷ nebo dimethyl-oxazoliny (DMOX)^{17,31}. CRF přímých, nesubstituovaných alkylových řetězců poskytuje sérii fragmentů lišících se o 14 hmotnostních jednotek. Přítomnost dvojně vazby nebo jiné funkční skupiny tuto pravidelnou distribuci naruší, čehož lze využít k určení její pozice v řetězci^{32–35}.

Schéma 1. Derivatizace mastné kyseliny *N*-(4-aminomethylphenyl)pyridiniem (AMPP⁺)

Kromě kladně nabitých iontů lze pro strukturní analýzu pomocí CRF využít i záporně nabitě ionty. Volné mastné kyseliny poskytují při ionizaci ostřelováním urychlenými atomy (FAB) deprotonované molekuly se záporným nábojem lokalizovaným na karboxylové skupině. Tyto ionty lze následně fragmentovat pomocí vysokoenergetické CID (cit.³⁶).

Nástup ionizačních technik za atmosférického tlaku, zejména elektrospreje, umožnil analyzovat mastné kyseliny pomocí HPLC-MS nebo přímým nástřikem kapalného vzorku do hmotnostního spektrometru. Analýza nederivatizovaných mastných kyselin pomocí ESI-MS není příliš využívána, protože citlivost detekce je nízká a nízkoenergetická CID spektra neposkytují důležité informace o struktuře alifatických řetězců. Zvýšení signálu bylo dosaženo derivatizačními reakcemi, které zavádějí do molekuly permanentní kladný náboj^{25,37–40}. Protože deriváty s permanentním kladným nábojem pocházejí z molekul, které se před derivatizací snadno deprotonovaly na záporně nabitě ionty, označují se takovéto reakce jako „charge-switch“ derivatizace, tj. derivatizace se změnou polarity náboje. Pro strukturní analýzu mastných kyselin se osvědčila derivatizace *N*-(4-aminomethylphenyl)pyridiniem

Obr. 1. MS² spektra AMPP⁺ derivátů mononenasyčených mastných kyselin s různými polohami dvojných vazeb. Přepřacováno podle cit.³⁷Obr. 2. Fotodisociační hmotnostní spektrum 4-I-AMPP⁺ derivátu kyseliny *cis*-vackenové. Přepřacováno podle cit.⁴²

(AMPP⁺)⁴¹ (schéma 1). Činidlo bylo navrženo tak, aby minimalizovalo fragmentaci derivátů v blízkosti místa permanentního náboje a poskytovalo tak CRF ionty o vysoké intenzitě. CID spektra nasycených mastných kyselin derivatizovaných pomocí AMPP⁺ (cit.⁴¹) obsahují sérii fragmentů lišících se o 14 hmotnostních jednotek. Tyto ionty jsou produkty štěpení vazeb uhlík–uhlík, vznikající 1,4-eliminací vodíku. Přítomnost jedné nebo více dvojných vazeb snižuje intenzitu některých iontů a vytváří nové fragmenty, které jednoznačně identifikují polohu dvojných vazeb (obr. 1). Kromě dvojných vazeb pomáhají deriváty AMPP⁺ lokalizovat také místa methylového větvení^{42,43} nebo hydroxyskupiny^{44,45}. Pro zvýšení výtěžnosti fragmentových iontů byly vyvinuty deriváty schopné tvořit ionty s lichým počtem elektronů⁴⁶. Radikálové ionty vznikají fotodisociací prekurzorů se sudým počtem elektronů, které obsahují fotoštěpitelný jod. Derivatizace mastných kyselin 1-(3-(aminomethyl)-4-jodfenyl)pyridin-1-iem (4-I-AMPP⁺) a 1-(4-(aminomethyl)-3-jodfenyl)pyridin-1-iem (3-I-AMPP⁺) probíhá obdobně jako v případě AMPP⁺ (cit.⁴⁰). Fragmentací těchto derivátů laserovým UV zářením (266 nm) se získá radikál-kation [M – I]⁺ a sekundární fragmenty, které odpovídají štěpení acylového řetězce a eliminaci AMPP⁺ (obr. 2).

5. Disociace vyvolaná ozonem – ozonolýza

Reakci dvojných vazeb s ozonem popsal Christian F. Schönbein⁴⁷ v roce 1847 a její mechanismus vysvětlil o sto let později Rudolf Criegee⁴⁸. Reaktanty nejprve tvoří

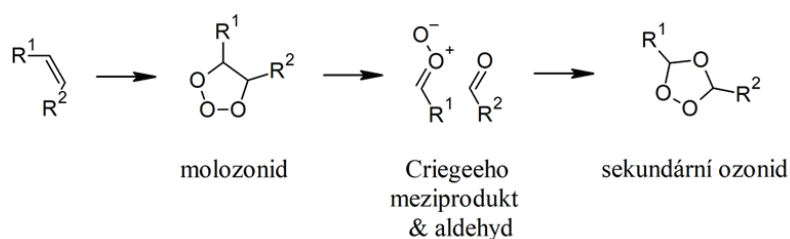
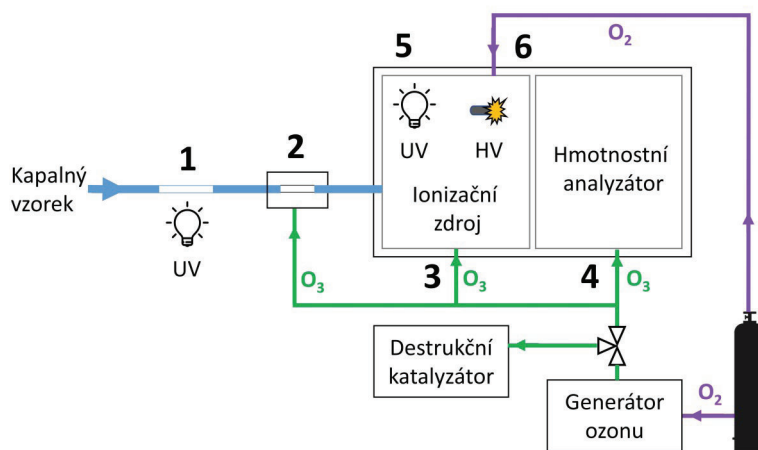


Schéma 2. Derivatizace dvojné vazby ozonem

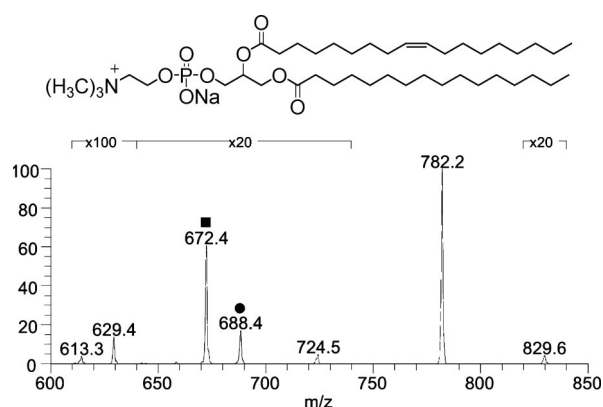
nestabilní molozonid (1,2,3-trioxolan), který se zpětně mění na odpovídající karbonyl oxid (Criegeeho meziprodukt) a aldehyd. Oxid a aldehyd opět reagují za vzniku sekundárního ozonidu se strukturou 1,2,4-trioxolanu (schéma 2).

Při rozkladu ozonidů vznikají aldehydy, které lze použít k určení polohy dvojné vazby. V 60. letech 20. století byla vyvinuta metoda určení polohy dvojné vazby založená na tepelném rozkladu ozonidů v injektoru plynového chromatografu a následné separaci produktů rozkladu⁴⁹. První hmotnostně spektrometrická analýza intaktních ozonidů byla provedena pomocí chemické ionizace (CI)⁵⁰. Později se ukázalo, že elektrosprejová ionizace a tandemová hmotnostní spektrometrie ozonidů fosfatidylcholinu poskytuje fragmenty určující polohu dvojné vazby^{51,52}. V následujících letech se ozonizace rozvinula v široce používaný přístup pro stanovení polohy dvojných vazeb. Reakce nenasyčených lipidů s ozonem může probíhat v různých fázích hmotnostně spektrometrické analýzy, jak je uvedeno na obr. 3.

K analytickému využití ozonolýzy významně přispěla především australská skupina prof. S. Blanksbyho^{24,55,56,58–77}, která vypracovala metody pro provádění reakcí s ozonem přímo v hmotnostním spektrometru. Zpočátku se ozonolýza prováděla v elektrosprejovém iontovém zdroji (OzESI-MS). První experimenty využívaly ke generování ozonu kyslík zaváděný do iontového zdroje. Při vysokém záporném potenciálu se na hrotu elektrosprejové jehly tvořila plazma, ve které vznikal ozon⁵⁸. Později byl ozon do iontového zdroje přiváděn z externího generátoru, což zlepšilo citlivost a umožnilo používat obě polarizace⁵⁵. OzESI-MS poskytuje pro každou dvojnou vazbu dvojici fragmentů, které lze využít pro určení její polohy: aldehydový ion a Criegeeho meziprodukt. Pro analýzu komplexních směsí však ozonolýza v iontovém zdroji není příliš výhodná. Proto byla zavedena metoda OzID (disociace vyvolaná ozonem), při níž jsou působení ozonu vystaveny ionty v hmotnostním analyzátoru^{24,56,59–61,63–69,71–80}. První OzID byla realizována v hmotnostním spektrometru s iontovou pastí, do jehož analyzátoru byl ozon zaváděn spolu s tl-

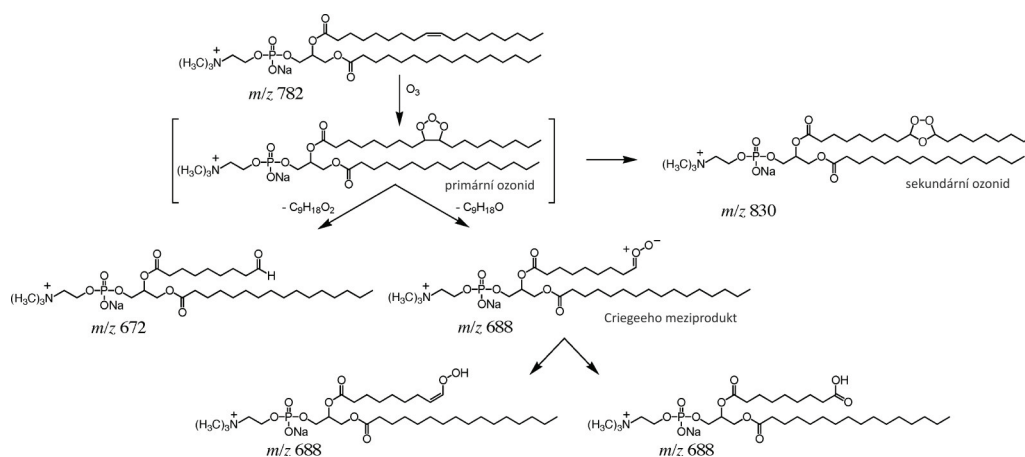


Obr. 3. **Různé způsoby ozonolýzy v LC-MS přístroji.** (1) Ozonolýza v kapalně fázi po ozáření vzorku v průtokové cele z taveného oxidu křemičitého UV světlem [49]; (2) ozonolýza v kapalně fázi ozonem pronikajícím přes polopropustné teflonové hadičky (O_3 -MS) [50]; (3) ozonolýza ve zdroji během ionizace elektrosprejem (OzESI)⁵¹; (4) ozonem indukovaná disociace (OzID) v hmotnostním analyzátoru⁵²; (5) ozonolýza ve zdroji pomocí ozonu generovaného ozářením kyslíku UV světlem⁵³; (6) ozonolýza ve zdroji pomocí ozonu generovaného z kyslíku korónovým výbojem⁵⁴



Obr. 4. OzID hmotnostní spektrum sodného aduktu fosfatidylcholinu PC (16:0/9Z-18:1). Přepracováno podle cit.⁵²

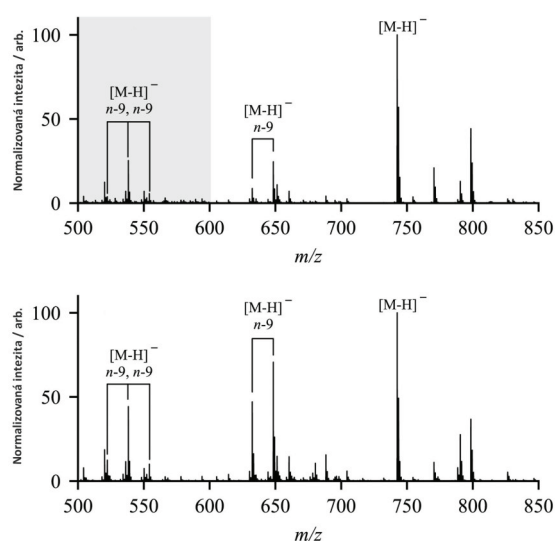
mícím plynem, tj. heliem⁵⁶. Pro každou dvojnou vazbu se tvoří dva diagnostické ionty charakterizující polohu dvojně vazby, viz obr. 4 a 5. K významnému zlepšení došlo při použití hybridního hmotnostního spektrometru Q-trap (AB SCIEX), kde jsou od sebe jednotlivé fáze procesu, tj. výběr iontů, reakce s ozonem a detekce produktů, fyzicky odděleny²⁴. Zlepšení citlivosti a rychlosti detekce bylo dosaženo díky vyšší koncentraci ozonu v tlumícím plynu. Spektra OzID lze zaznamenávat v krátkém časovém intervalu, proto je metoda vhodná i pro lipidomickou analýzu s rychlým sběrem dat, včetně metod založených na LC-MS (cit.^{65,66}). Technika OzID se stala užitečným nástrojem také pro zkoumání geometrie dvojných vazeb a polohy nenasyceného acylového řetězce na glycerolu²⁴. Experimenty ukázaly, že reaktivita *cis* a *trans* dvojných vazeb s ozonem se výrazně liší, což se projevuje různým poměrem intenzity charakteristických OzID iontů (obr. 6). U mnoha lipidových tříd je reaktivita *trans* izomeru vyšší^{72,77,78}.



Obr. 5. Předpokládaný mechanismus reakce $[\text{PC (16:0/9Z-18:1)} + \text{Na}]^+$ s ozonem při OzID. Přepracováno podle cit.⁵²

OzID lze kombinovat s CID a získat tak podrobnější informace o struktuře daného lipidu. Experimenty CID/OzID v lineární iontové pasti nebo přístroji Q-trap jsou užitečné pro jednoznačné přiřazení polohy dvojně vazby a *sn*-pozice acylových řetězců v glycerofosfolipidech⁶⁴. OzID lze také využít v hmotnostních spektrometrech s iontově mobilní celou s pohybující se vlnou (travelling wave ion mobility, TWIM). OzID v hmotnostním spektrometru Synapt (Waters) je možné uskutečnit dvěma způsoby^{68,78}. V jednom uspořádání je ozon přiváděn přívodem pro kolizní plyn do „trap“ a „transfer“ cely⁷⁸, zatímco ve druhém je ozon veden do iontově mobilní cely⁶⁸. Vysoká koncentrace ozonu zajišťuje vznik velkého množství produktových iontů během krátké doby a OzID na těchto přístrojích tak dosahuje vynikajících parametrů. OzID na přístrojích Synapt je kompatibilní s ultra účinnou kapalinovou chromatografií, což bylo ukázáno pro izomerní fosfatidylcholin⁶⁸. Při analýzách vzorků plazmy bylo demonstrováno, že OzID na přístroji s velmi vysokým rozlišením typu orbitální past může pomoci zvýšit počet identifikovaných lipidů⁷⁵. Vysoké rozlišení umožňuje rozlišit téměř izobarické lipidy, jako jsou plazmalogeny a plazmanyletherové lipidy. OzID v kombinaci s iontovou mobilitou otvírá další možnosti pro analýzu izomerů lipidů v biologických vzorcích. Rozlišení stereoizomerů dvojných vazeb bylo dosaženo na přístroji Agilent IMSQTOF v uspořádání LC-OzID-IMS-MS (cit.⁷²). Spektrometr byl upraven tak, aby mohl být ozon zaváděn do oblasti vysokotlaké iontové nálevky (ion trapping funnel), která je v tomto přístroji předřazená iontově mobilní cele. *Cis* a *trans* izomery tak bylo možné rozlišit na základě jejich driftových časů a poměrů OzID produktových iontů. Tento postup nezahrnuje žádný krok izolace iontů, a díky své rychlosti je proto vhodný pro lipidomiku⁷².

Reakční rychlost ozonolyzy závisí na druhu aduktu alkalickeho kovu a na uspořádání dvojných vazeb v alifatických řetězcích lipidů⁶³. V případě methylesterů oktadecadienových mastných kyselin s konjugovanými dvojnými



Obr. 6. OzID spektra fosfatidylethanolaminu PE 18:1 (*n*-9, *cis*)/18:1 (*n*-9, *cis*) (horní spektrum) a PE 18:1 (*n*-9, *trans*)/18:1 (*n*-9, *trans*) (dolní spektrum) ukazující vyšší intenzitu produktových iontů OzID pro *trans* izomer. Přepřacováno podle cit.⁶⁸

mi vazbami (konjugované kyseliny linolové, CLA) je reakce tak rychlá, že již není nutný krok zachycení v iontové pasti a pro ozonolýzu lze použít trojitý kvadrupól⁶³. Byl zkoumán vliv kationizace různými ionty kovů na iontové mobilní separaci OzID produktů fosfatidylcholinů a triacylglycerolů. Pro experimenty byla použita iontová mobilní spektrometrie s vysokonapěťovou asymetrickou vlnovou funkcí (FAIMS) spojená s přístrojem s iontovou pastí⁷⁷. Ačkoli kationizace ionty Ag^+ a Cu^+ separaci zlepšila, výtěžnost OzID reakce se snížila pravděpodobně v důsledku silných interakcí kovů s dvojnými vazbami.

Jak je uvedeno v předchozí kapitole, deriváty AMPP^+ zlepšují detekci mastných kyselin díky permanentnímu kladnému náboji. Účinnou ionizaci AMPP^+ derivátů lze využít také pro zvýšení citlivosti OzID (cit.⁷⁶), zejména při zavádění vzorku přímou infuzí. Metoda je založená na skenu prekurzorového iontu AMPP^+ , kdy v případě jeho detekce se automaticky spustí OzID. Tento postup byl použit pro strukturní analýzu mastných kyselin v novorozeneckém mázku (*vernix caseosa*)⁷⁶. Bylo prokázáno, že OzID poskytuje informace o dvojných vazbách v mnoha různých lipidech, včetně fosfolipidů^{24,56,59,64–69,72,75,77,79}, sfingolipidů^{56,71,72,79,81}, acylglycerolů^{24,56,72,75,77}, methylesterů mastných kyselin^{63,78}, (*O*-acyl) hydroxymastných kyselin⁷⁰, AMPP^+ derivátů

mastných kyselin⁷⁶, cholesterylesterů^{72,74,75} a rostlinných metabolitů^{73,80}.

OzID je výborným nástrojem pro studium struktury nenasyčených lipidů, ale vyžaduje úpravy hmotnostních spektrometrů. Pokud takové modifikace nejsou možné, lze ozonolýzu provést jednoduše pomocí in-line reaktoru před hmotnostním spektrometrem⁵⁴. Kapalným vzorkem protéká teflonovou hadičkou vloženou do láhve obsahující ozon. Nenasyčené lipidy reagují s ozonem, který proniká stěnou hadičky, a aldehydové produkty ozonolýzy jsou následně ionizovány v iontovém zdroji (O_3 -MS). Tento přístup byl použit při LC analýze methylesterů mastných kyselin⁵⁴, CLA⁸², a fosfolipidů^{83,84}. Další způsob ozonolýzy v roztoku je založen na ozařování křemenné kapiláry nízkotlakou rtuťovou UV lampou⁵³. Kyslík rozpuštěný v mobilní fázi se přemění na ozon, který následně reaguje s nenasyčenými lipidy. V jiném uspořádání je mikroreaktorem semipermeabilní teflonová hadička obtočená kolem UV lampy⁵⁷. Okolní ozon generovaný lampou difunduje do reaktoru a iniciuje ozonolýzu. UV lampa může být také umístěna v blízkosti sprejovacího emitoru v iontovém zdroji pro nanoESI (cit.⁵⁷).

6. Paternò-Büchiho reakce

Paternò-Büchiho (PB) reakce, známá od roku 1909, je fotochemická reakce mezi karbonylovou sloučeninou a alkenem, při níž vznikají oxetanové produkty (schéma 3). Reakce se řadí mezi [2+2] cykloadice⁸⁵. Užitečnost PB reakce pro lokalizaci dvojných vazeb v lipidech ukázali Ma a spol. v roce 2014 (cit.⁸⁶). Reakce probíhala během nanoelektrosprejové ionizace působení UV záření nízkotlaké rtuťové výbojky (254 nm) v přítomnosti acetonu. Oxetanové produkty byly podrobeny CID, při kterých vznikaly produktové ionty specifické pro pozici dvojných vazeb.

Metoda PB-MS/MS má řadu výhod: jednoduché experimentální provedení, vysokou rychlost, použitelnost pro více tříd lipidů a činidla, která jsou kompatibilní s ESI i LC (cit.^{87,88}). Od svého zavedení byla metoda použita k charakterizaci široké škály nenasyčených lipidů, včetně fosfolipidů^{89–97}, sfingolipidů⁹⁸, glycerolipidů^{94–101}, mastných kyselin^{102–106} a steroidů^{107–109} v různých maticích.

Aceton použitý v původním článku⁸⁶ je stále nejpoužívanějším PB činidlem. Je kompatibilní s ESI ionizací, dobře se mísí s vodou a organickými rozpouštědly a rozpouští lipidy v širokém rozsahu polarit^{86,87,110}. Nevýhodou je jeho sklon k bočním reakcím, které snižují výtěžek

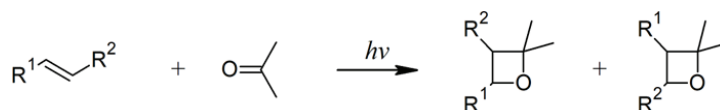


Schéma 3. Paternò-Büchiho derivatizace dvojných vazeb acetonem

a citlivost detekce. Mezi vedlejší reakce patří například oxidace lipidů a adice acetylových radikálů na lipidy (Norrishovy reakce)⁸⁶. Proto byla navržena činidla umožňující provádění PB reakcí při delších vlnových délkách, např. benzofenon^{93,106}, benzaldehyd¹¹¹, acetylpyridiny⁹⁷, 2-benzoylpyridin¹¹² nebo antrachinon¹¹³. Aktivace karbonylové skupiny fotony s nižší energií částečně eliminuje vedlejší reakce¹¹⁴ a světelné zdroje delších vlnových délek minimalizují zdravotní rizika^{105,113}. Jednou z možností zlepšení výtěžku PB reakce je zavedení elektronegativních skupin. Příkladem může být 2,4,6-trifluoracetofenon, který poskytuje dobrý výtěžek reakce a výrazně snižuje chemické interference¹¹⁵. V první práci o tvorbě oxetanů ve viditelném světle je popsáno použití benzofenonu a fluorescenční lampy (>400 nm) nebo OPO laseru (520 nm)¹¹⁶. Za těchto podmínek vede cykloadiční reakce ke vzniku oxetanů jiným mechanismem než PB reakce. Viditelné záření aktivuje protonově vázaný komplex vytvořený z činidla a nenasyceného lipidu, nikoliv samotnou karbonylovou skupinu, jako je tomu u PB reakce iniciované UV světlem.

PB derivatizace probíhající online nebo off-line se používají v řadě lipidomických experimentů, a to jak při analýze přímou infuzí vzorku („shotgun“)^{86,89,106,110}, tak při LC-MS analýze^{94,96,117,118}. V „shotgun“ analýze je nanoESI emitör ozáren UV nebo Vis lampou a derivatizované lipidy jsou charakterizovány pomocí MS² (cit.⁸⁶). V případě LC separace je do systému zapojen průtokový mikroreaktor, kde probíhá derivatizace⁹⁶. PB-MS/MS je rovněž použitelná pro analýzu jedné buňky. Derivatizační reakce probíhá v mikropipetě, která slouží k odběru buněk a buněčné lyzaci, a zároveň také jako PB mikroreaktor a nano-ESI emitör¹⁰¹. PB reakci lze také provádět v hmotnostních spektrometrech s iontovou mobilitou, což vede ke zlepšení separace a identifikace lipidů^{100,119}. Xie a spol. vyvinuli metodu pro kvantitativní analýzu konjugovaných mastných kyselin. Tato metoda kombinuje PB derivatizaci s iontově mobilní separací známou jako TIMS (Trapped Ion Mobility Spectrometry) před MS². Technika byla použita ke stanovení geometrie a polohy dvojných vazeb CLA (cit.¹¹⁹).

7. Závěr

V první dílu přehledového článku je shrnuta část nových moderních metod hmotnostní spektrometrie pro charakterizaci násobných vazeb v acylových řetězcích lipidů s využitím LC-MS a ionizace za atmosférického tlaku. V této oblasti došlo v posledních letech k rychlému vývoji. Byla publikována řada dalších zajímavých metod, které se do první části nevešly a budou popsány ve druhé části článku. Druhá část bude věnována určení polohy násobných vazeb s využitím epoxidace, tvorby aduktů vznikajících z acetonitrilu při chemické ionizaci za atmosférického tlaku, fotodisociačním reakcím a technikám disociace iontů po interakci s elektrony.

Podpořeno projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

LITERATURA

- Murphy R. C.: *Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2015.
- Zaikin V., Halket J. M.: *A Handbook of Derivatives for Mass Spectrometry*. IM Publications, Chichester, West Sussex 2009.
- Strmen T., Vrkoslav V., Bosakova Z., Cvačka J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 34, (2020).
- Pham H. T., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 805 (2013).
- Sleno L., Volmer D. A.: *J. Mass Spectrom.* 39, 1091 (2004).
- McLuckey S. A., Mentinova M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22, 3 (2011).
- Harvey S. R., Liu Y., Liu W., Wysocki V. H., Laganowsky A.: *Chem. Commun.* 53, 3106 (2017).
- Heidemann J., Kolbel K., Konijnenberg A., Van Dyck J., Garcia-Alai M., Meijers R., Sobott F., Utrecht C.: *Int. J. Mass Spectrom.* 447, 116240 (2020).
- Brodbeck J. S.: *Chem. Soc. Rev.* 43, 2757 (2014).
- Becher S., Spengler B., Heiles S.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 24, 54 (2018).
- Chen X. F., Wang Z., Wong Y. L. E., Wu R., Zhang F., Chan T. W. D.: *Mass Spectrom. Rev.* 37, 793 (2018).
- James P. F., Perugini M. A., O'Hair R. A. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 978 (2008).
- Liang X. L. R., Liu J., Leblanc Y., Covey T., Ptak A. C., Brenna J. T., McLuckey S. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 1783 (2007).
- McFarland M. A., Marshall A. G., Hendrickson C. L., Nilsson C. L., Fredman P., Mansson J. E.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 752 (2005).
- Natesan V., Kim S. J.: *Biomol. Ther. (Seoul)* 29, 596 (2021).
- Halket J. M., Zaikin V. G.: *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester)* 11, 127 (2005).
- Dobson G., Christie W. W.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 15, 130 (1996).
- Bird S. S., Marur V. R., Stavrovskaya I. G., Kristal B. S.: *Anal. Chem.* 84, 5509 (2012).
- Huang W., Hong B., Sun J., Tan R., Bai K., Yang T., Wu H., Yi R.: *Lipids Health Dis.* 18, 86 (2019).
- Vrkoslav V., Horká P., Jindřich J., Buděšínský M., Cvačka J.: *Molecules* 28, 3794 (2023).
- Vrkoslav V., Urbanová K., Háková M., Cvačka J.: *J. Chromatogr. A* 1302, 105 (2013).
- Jensen N., Lam K., Cody R. B., Tamura J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 4, 239 (1990).
- Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P.

- R. S.: *Anal. Chem.* 89, 7307 (2017).
24. Poad B. L. J., Pham H. T., Thomas M. C., Nealon J. R., Campbell J. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21, 1989 (2010).
 25. Young R. S. E., Flakelar C. L., Narreddula V. R., Jekimovs L. J., Menzel J. P., Poad B. L. J., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 94, 16180 (2022).
 26. Zhang J. Y., Yu X. J., Wang H. Y., Liu B. N., Yu Q. T., Huang Z. H.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66, 256 (1989).
 27. Horka P., Vrkoslav V., Kindl J., Schwarzova-Peckova K., Cvacka J.: *Molecules* 26, 6468 (2021).
 28. Christie W. W.: *Lipids* 33, 343 (1998).
 29. Andersson B. A., Holman R. T.: *Lipids* 9, 185 (1974).
 30. Andersson B. A., Christie W. W., Holman R. T.: *Lipids* 10, 215 (1975).
 31. Spitzer V.: *Prog. Lipid Res.* 35, 387 (1996).
 32. Harvey D. J.: *Biomed. Mass Spectrom.* 9, 33 (1982).
 33. Tulloch A. P.: *Lipids* 20, 652 (1985).
 34. Balazy M., Nies A. S.: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 18, 328 (1989).
 35. Harvey D. J.: *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 187 (1984).
 36. Tomer K. B., Crow F. W., Gross M. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 105, 5487 (1983).
 37. Barry S. J., Carr R. M., Lane S. J., Leavens W. J., Monte S., Waterhouse I.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 603 (2003).
 38. Lamos S. M., Shortreed M. R., Frey B. L., Belshaw P. J., Smith L. M.: *Anal. Chem.* 79, 5143 (2007).
 39. Bollinger J. G., Thompson W., Lai Y., Oslund R. C., Hallstrand T. S., Sadilek M., Turecek F., Gelb M. H.: *Anal. Chem.* 82, 6790 (2010).
 40. Bollinger J. G., Rohan G., Sadilek M., Gelb M. H.: *J. Lipid Res.* 54, 3523 (2013).
 41. Yang K., Diltney B. G., Gross R. W.: *Anal. Chem.* 85, 9742 (2013).
 42. Tatituri R. V. V., Wolf B. J., Brenner M. B., Turk J., Hsu F. F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 2519 (2015).
 43. Flentie K. N., Stallings C. L., Turk J., Minnaard A. J., Hsu F. F.: *J. Lipid Res.* 57, 142 (2016).
 44. Hsu F. F.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27, 622 (2016).
 45. Meckelmann S. W., Hellhake S., Steuck M., Krohn M., Schebb N. H.: *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 130, 8 (2017).
 46. Narreddula V. R., Boase N. R., Ailuri R., Marshall D. L., Poad B. L. J., Kelso M. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 91, 9901 (2019).
 47. Schönbein C. F.: *Bericht über die Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel.* 7, 7 (1847).
 48. Criegee R.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 14, 745 (1975).
 49. Davison V. L., Dutton H. J.: *Anal. Chem.* 38, 1302 (1966).
 50. Wu M., Church D. F., Mahier T. J., Barker S. A., Pryor W. A.: *Lipids* 27, 129 (1992).
 51. Harrison K. A., Murphy R. C.: *Anal. Chem.* 68, 3224 (1996).
 52. Harrison K. A., Davies S. S., Marathe G. K., McIntyre T., Prescott S., Reddy K. M., Falck J. R., Murphy R. C.: *J. Mass Spectrom.* 35, 224 (2000).
 53. Harris R. A., May J. C., Stinson C. A., Xia Y., McLean J. A.: *Anal. Chem.* 90, 1915 (2018).
 54. Sun C. X., Zhao Y. Y., Curtis J. M.: *Anal. Chim. Acta* 762, 68 (2013).
 55. Thomas M. C., Mitchell T. W., Harman D. G., Deeley J. M., Murphy R. C., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 79, 5013 (2007).
 56. Thomas M. C., Mitchell T. W., Harman D. G., Deeley J. M., Nealon J. R., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 80, 303 (2008).
 57. Stinson C. A., Zhang W. P., Xia Y.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 29, 481 (2018).
 58. Thomas M. C., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 58 (2006).
 59. Deeley J. M., Thomas M. C., Truscott R. J. W., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 81, 1920 (2009).
 60. Thomas M. C., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Methods Mol. Biol.* 579, 413 (2009).
 61. Brown S. H. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 807 (2011).
 62. Ellis S. R., Hughes J. R., Mitchell T. W., Panhuis M. I. H., Blanksby S. J.: *Analyst* 137, 1100 (2012).
 63. Pham H. T., Maccarone A. T., Campbell J. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24, 286 (2013).
 64. Pham H. T., Maccarone A. T., Thomas M. C., Campbell J. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Analyst* 139, 204 (2014).
 65. Kozłowski R. L., Campbell J. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 5053 (2015).
 66. Kozłowski R. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 21, 191 (2015).
 67. Kozłowski R. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Sci. Rep.* 5, 9243 (2015).
 68. Poad B. L. J., Green M. R., Kirk J. M., Tomczyk N., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 89, 4223 (2017).
 69. Batarseh A. M., Abbott S. K., Duchoslav E., Alqarni A., Blanksby S. J., Mitchell T. W.: *Int. J. Mass Spectrom.* 431, 27 (2018).
 70. Hancock S. E. a 12 spoluautorů: *J. Lipid Res.* 59, 1510 (2018).
 71. Poad B. L. J., Maccarone A. T., Yu H. B., Mitchell T. W., Saied E. M., Arenz C., Hornemann T., Bull J. N., Bieske E. J., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 90, 5343 (2018).
 72. Poad B. L. J., Zheng X. Y., Mitchell T. W., Smith R. D., Baker E. S., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 90, 1292 (2018).
 73. Auranwiwat C., Maccarone A. T., Carroll A. W.,

- Rattanajak R., Kamchonwongpaisan S., Blanksby S. J., Pyne S. G., Limtharakul T.: *Tetrahedron* 75, 2336 (2019).
74. Hancock S. E., Maccarone A. T., Poad B. L. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Chem. Phys. Lipids* 221, 198 (2019).
75. Marshall D. L., Criscuolo A., Young R. S. E., Poad B. L. J., Zeller M., Reid G. E., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 1621 (2019).
76. Poad B. L. J. a 11 spoluautorů: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 2135 (2019).
77. Berthias F., Poad B. L. J., Thurman H. A., Bowman A. P., Blanksby S. J., Shvartsburg A. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 32, 2827 (2021).
78. Vu N., Brown J., Giles K., Zhang Q. B.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 31, 1415 (2017).
79. Barrientos R. C., Zhang Q. B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 1609 (2019).
80. Knowles S. L., Vu N., Todd D. A., Raja H. A., Rokas A., Zhang Q. B., Oberlies N. H.: *J. Nat. Prod.* 82, 3421 (2019).
81. Barrientos R. C., Vu N., Zhang Q. B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 2330 (2017).
82. Sun C. X., Black B. A., Zhao Y. Y., Ganzle M. G., Curtis J. M.: *Anal. Chem.* 85, 7345 (2013).
83. Sun C. X., Zhao Y. Y., Curtis J. M.: *J. Chromatogr. A* 1351, 37 (2014).
84. Sun C. X., Zhao Y. Y., Curtis J. M.: *J. Agr. Food Chem.* 63, 1442 (2015).
85. Büchi G., Inman C. G., Lipinsky E. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 4327 (1954).
86. Ma X. X., Xia Y.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 53, 2592 (2014).
87. Ma X. X., Zhang W. P., Li Z. S., Xia Y., Ouyang Z.: *Acc. Chem. Res.* 54, 3873 (2021).
88. Hu Q. Y., Xia Y., Ma X. X.: *Methods Mol. Biol.* 2306, 53 (2021).
89. Stinson C. A., Xia Y.: *Analyst* 141, 3696 (2016).
90. Franklin E. T., Shields S. W. J., Manthorpe J. M., Smith J. C., Xia Y., McLuckey S. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 31, 938 (2020).
91. Ren H. L., Triebel A., Muralidharan S., Wenk M. R., Xia Y., Torta F.: *Analyst* 146, 3899 (2021).
92. Liu Z. Q., Rochfort S.: *Food Chem.* 373, 131515 (2022).
93. Waldchen F., Becher S., Esch P., Kompauer M., Heiles S.: *Analyst* 142, 4744 (2017).
94. Lin Q. H., Zhang D. H., Xia Y.: *Analyst* 145, 513 (2020).
95. Xia T., Ren H. L., Zhang W. P., Xia Y.: *Anal. Chim. Acta* 1128, 107 (2020).
96. Zhang W. P., Zhang D. H., Chen Q. H., Wu J. H., Ouyang Z., Xia Y.: *Nat. Commun.* 10, 79 (2019).
97. Cao W. B., Cheng S. M., Yang J., Feng J. X., Zhang W. P., Li Z. S., Chen Q. H., Xia Y., Ouyang Z., Ma X. X.: *Nat. Commun.* 11, 375 (2020).
98. Zhao X., Wu G., Zhang W., Dong M., Xia Y.: *Anal. Chem.* 92, 14775 (2020).
99. Franklin E. T., Xia Y.: *Analyst* 145, 6532 (2020).
100. Xia T., Yuan M., Xu Y. W., Zhou F., Yu K. T., Xia Y.: *Anal. Chem.* 93, 8345 (2021).
101. Zhu Y. L., Wang W. H., Yang Z. B.: *Anal. Chem.* 92, 11380 (2020).
102. Murphy R. C., Okuno T., Johnson C. A., Barkleyte R. M.: *Anal. Chem.* 89, 8545 (2017).
103. Chonglo L., Tian R., Shi R. Y., Ouyang Z., Xia Y.: *Front Chem.* 7, (2019), <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00807>.
104. Xu S. L., Wei F., Xie Y., Wu B. F., Lv X., Qin Z. J., Chen H.: *Int. J. Food Sci. Technol.* 55, 2883 (2020).
105. Han Y. H., Chen P. P., Li Z. C., Wang X., Sun C. L.: *J. Chromatogr. A* 1662, 462742 (2022).
106. Xu T. F., Pi Z. F., Song F. R., Liu S., Liu Z. Q.: *Anal. Chim. Acta* 1028, 32 (2018).
107. Ren J., Franklin E. T., Xia Y.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 1432 (2017).
108. Xie X. B., Zhao J., Lin M., Zhang J. L., Xia Y.: *Anal. Chem.* 92, 8487 (2020).
109. Maddox S. W., Olsen S. S. H., Velosa D. C., Burkus-Mateševac A., Peverati R., Chouinard C. D.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 31, 2086 (2020).
110. Ma X. X., Chong L., Tian R., Shi R. Y., Hu T. Y., Ouyang Z., Xia Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 2573 (2016).
111. Bednarik A., Bolsker S., Soltwisch J., Dreisewerd K.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 57, 12092 (2018).
112. Wäldchen F., Mohr F., Wagner A. H., Heiles S.: *Anal. Chem.* 92, 14130 (2020).
113. Feng G., Hao Y., Wu L., Chen S.: *Chem. Sci. J.* 11, 7244 (2020).
114. Rykaczewski K. A., Schindler C. S.: *Org. Lett.* 22, 6516 (2020).
115. Zhao J., Xie X. B., Lin Q. H., Ma X. X., Su P., Xia Y.: *Anal. Chem.* 92, 13470 (2020).
116. Li H.-F., Cao W., Ma X., Xie X., Xia Y., Ouyang Z.: *J. Am. Chem. Soc.* 142, 3499 (2020).
117. Jeck V., Korf A., Vosse C., Hayen H.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 33, 86 (2019).
118. Zhang W., Shang B., Ouyang Z., Xia Y.: *Anal. Chem.* 92, 6719 (2020).
119. Xie X. B., Xia Y.: *Anal. Chem.* 91, 7173 (2019).

Š. Strnad, V. Vrkoslav, and J. Cvačka (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, Prague, Czech Republic*): **Location of Double or Triple Bonds in Lipids Using Mass Spectrometry, Part I**

Structural analysis of lipids is one of the classical topics of organic mass spectrometry. In recent years, we have witnessed a rapid development of new methods that allow the characterization of lipid structures more accurately, more rapidly, and in more complex samples. These methods are mostly based on derivatization reactions or newly available fragmentation techniques. Basic mass

spectrometric analysis of lipids, i.e., determination of lipid class, acyl chain length, and degree of unsaturation, is usually relatively easy but the detailed structural description is more challenging. In this two-part review article, we present advances in mass spectrometry for characterizing double and triple bonds in lipid acyl chains by LC-MS and direct ionization of liquid samples at atmospheric pressure. The first paper discusses charge-switch derivatizations, ozonolysis, and the Paternò-Büchi reaction.

Keywords: double bond, fragmentation, lipids, mass spectrometry, ozonolysis, Paternò-Büchi, structural analysis, triple bond

Acknowledgments

This work was supported by the project National Institute for Research of Metabolic and Cardiovascular Diseases (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5104) – Funded by the European Union – Next Generation EU.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

CHEMILUMINISCENČNÍ A FOTOMETRICKÁ ANALÝZA MATRIX GLA PROTEINU U PACIENTŮ S ONEMOCNĚNÍM POHYBOVÉHO APARÁTU

MILOŠ BARNA^{a,b}, JANA ČEPOVÁ^a, KATEŘINA DUNOVSKÁ^a, JAKUB PETRUS^a,
PAVEL MELICHERČÍK^b, RICHARD PRŮŠA^a, RENÉ KIZEK^a a EVA KLAPKOVÁ^a

^a Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, Praha, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, ^b 1. Ortopedická klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, Praha, Česká republika
eva.klapkova@fnmotol.cz

Došlo 2.8.23, přijato 4.9.23.

Matrix Gla protein (MGP) je cirkulující protein s nízkou molekulární hmotností, který působí jako přirozený inhibitor kalcifikace. Řadíme ho do skupiny proteinů označených jako vitamin K dependentní proteiny. Jeho hlavní funkcí je prevence ukládání vápníku do měkkých tkání. Pro správné fungování musí být MGP dostatečně karboxylován a fosforylován, což je proces, který vyžaduje vitamin K₂ jako kofaktor gamma-glutamylkarboxylasy. Nedostatek vitamínu K se projevuje kardiovaskulárním onemocněním, nedostatečnou mineralizací kostní tkáně a vznikem kalcifikujících deposit v měkkých tkáních. Cílem práce bylo navržení metod pro sledování hladiny MGP a defosforylovaného nedostatečně karboxylovaného MGP (dp-uc MGP) za využití imunochemické detekce a aplikovat je na analýzu reálných patientských vzorků pro použití v klinických laboratořích, kde by tyto markery mohly sloužit jako potenciální markery závažnosti kloubních onemocnění, kardiovaskulárních onemocnění a také jako markery vypovídající o stavu vitamínu K v organismu.

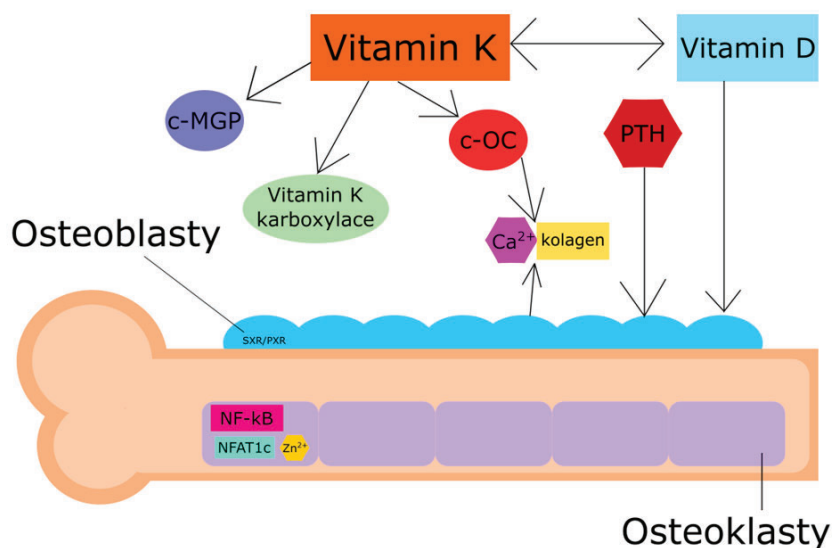
Klíčová slova: ELISA; hladiny vápníku a fosforu; kostní metabolismus; matrixové proteiny, vitamin K

Úvod

Heterotopické osifikace a kalcifikující tendinitida patří mezi onemocnění měkkých tkání pohybového aparátu s neznámou etiologií^{1,2}. Heterotopické osifikace jsou charakterizovány jako vznik lamelární kosti uvnitř měkkých tkání. Vznikají nejčastěji po operaci náhrady kyčelního kloubu^{1,2}. Jsou závažnou komplikací, která může vést k omezení hybnosti operovaného kloubu s nutností dalšího operačního zákroku^{3,4}. Příčina vzniku těchto osifikací zatím stále není jasná, nicméně existují rizikové faktory, které vznik tohoto onemocnění výrazně podporují. Jak je ukázáno na obr. 1, do procesu kostního metabolismu je zapojena řada molekul v různých molekulárně-biologických procesech. Některé z těchto molekul by se mohly stát vhodnými prognostickými markery osifikace^{5,6}.

Matrix γ -karboxylglutamátový (Gla) protein (MGP, 9531 Daltonů, pI 8,66) patří do skupiny matrixových proteinů, jejichž význam je momentálně intenzivně studován. MGP je jeden z rodiny vitamin K-dependentních proteinů (VKDP). Tato rodina čítá celkově 17 VKDP. Propeptid je při maturaci odštěpen karboxypeptidasou N. MGP obsahuje ve své molekule 5 karboxylglutamátů a 3 fosfoseriny. Mezi pozicemi 73 a 79 je disulfidová vazba a mezi pozicemi 51 a 97 je vlastní Gla doména. Biologický poločas

u savčích retikulocytů *in vitro* je 2,8 hodiny. Zatímco se předpokládá, že karboxylace má vliv na vazbu vápníku mezi dvě rezidua karboxylové kyseliny, fosforylace má ovlivnit uvolňování MGP do buněk⁷. Protože obě modifikace mohou být provedeny neúplně, mohou být identifikovány různé formy těchto MGP. Ačkoli úloha MGP není zcela známa, předpokládá se, že jeho exprese v subendoteliálních makrofázích a buňkách hladkého svalstva cév je zapojena do vaskulární kalcifikace jako důležitý lokální inhibitor^{8,9}. Syntéza MGP podléhá dvěma posttranslačním modifikacím: vitamínu K-dependentní γ -glutamátové karboxylaci a serinové fosforylaci^{10–12}. Nedostatek vitamínu K u dialyzovaných pacientů komplikuje karboxylaci MGP (cit.¹³). V několika studiích byl prokázán klinický význam stanovení hladiny MGP v krevním séru pacientů pro diagnostiku kardiovaskulárních onemocnění a osteoartrózy^{7,10,14–17}. V současnosti je k dispozici velmi málo informací o vztahu MGP k heterotopické osifikaci. Pro analýzu proteinů jsou využívány především imunochemické metody v různém uspořádání^{18,19}. Tyto metody jsou vhodné pro monitorování velmi nízkých koncentrací proteinů. Cílem práce bylo navržení metod pro sledování hladiny MGP a dp-uc MGP jako potenciálního markeru heterotopické osifikace, kalcifikující tendinitidy ramene či kardiovaskulárních onemocnění.



Obr. 1. **Kostní metabolismus představuje celou řadu složitých vazeb.** Na zjednodušeném schématu jsou naznačeny vazby k transkripčním faktorům jako je NF- κ B, NFAT1C, SXR/PXR. Je předpokládána asociace vitamínu K_2 s c-MGP proteinem, c-OC (osteokalcinem). Zde je interakce vápenatých iontů s kolagenovými vlákny. Na regulační úrovni zde vstupují PTH (parathormon) i vitamin D.

Experimentální část

Použité chemikálie

Isopropanol, hexan, diethylether a fluorid amonný byly v LC-MS čistotě. Deuterizované standardy vitamínů (MK-7-7- a K_1 -d7) byly zakoupeny v Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, ON, Kanada). Fylochinon, MK-7 a ostatní chemikálie použité pro analýzu byly zakoupeny od společnosti Merck (Darmstadt, Německo) v čistotě p.a. Chemická/biochemická analýza využívala pracovní roztoky od společnosti Siemens (USA).

Biologický materiál a příprava roztoků a vzorků

Pro primární analýzu bylo získáno přibližně 5 ml krve do zkumavek Vacuette s akcelerátorem hemokoagulace. Následnou centrifugací (Avanti J-15R, Beckman Coulter (USA) 1500 g, 10 min, 4 °C) bylo odděleno krevní sérum pro biochemickou analýzu. Před každým odběrem krve byl podepsán informovaný souhlas. Všechna vyšetření jsou v souladu se zásadami Helsinské deklarace. Kontrolní skupina zdravých probandů bez postižení pohybového aparátu byla vybrána tak, aby věkově byla podobná skupině pacientů ($n = 30$). Skupiny pacientů s onemocněním pohybového aparátu byly rozděleny na skupinu s kalcifikující tendinitidou ramene ($n = 21$); dále s heterotopickou osifikací kyčle ($n = 19$); s kalcifikací kolene ($n = 1$); a s artritidou ($n = 2$).

MGP ELISA stanovení

Pro detekci MGP byla využita metoda ELISA (Human Matrix Gla Protein, MyBioSource, USA). Sekundární protilátka byla značená křenuvou peroxidasou a jako substrát byl použit 5 mmol l^{-1} TMB (tetramethylbenzidin) s obsahem 3 mmol l^{-1} peroxidu vodíku. K zastavení reakce je používán přídatek 0,1 mol l^{-1} kyseliny sírové. Lidský MGP byl použit jako kalibrátor. K promývání bylo využito TECAN zařízení. Měření bylo provedeno na desítkovém čtecím zařízení Infinite (Tecan, Japonsko). Čtení barevného produktu reakce bylo nastaveno na střed jamky při 540 nm. Data byla vyhodnocena metodou kalibrační křivky. Více podrobností je uvedeno v práci Schurgerse¹⁵.

IDS-iSYS analýza

Analýza dp-uc MGP byla provedena plně automatizovaně na IDS-iSYS (Immuno-diagnostic Systems Holdings PLC, UK) za využití IDS InaKtif MGP (dp-uc MGP). K detekci je využívána fluorescenčně značená monoklonální protilátka dp-uc MGP. K detekci bylo využito chemiluminiscence (CLIA). Množství dávkovaného vzorku séra bylo 50 μ l. Další podrobnosti jsou uvedeny v metodice analýzy.

LC-MS/MS analýza

K analýze vitamínu K_1 a vitamínu K_2 (MK-7) v séru byl použit chromatografický systém Agilent Technologies 1290 Infinity II LC (Agilent Technologies, Santa Clara,

CA, USA) s autosamplerem, pumpami a termostatovanou kolonou za použití ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Hmotnostní detekce byla prováděna pomocí trojitěho kvadrupólu v módu MRM (Agilent 1290, Triple Quad 6470, Agilent Technologies). Jako vnitřní standardy byly použity isotopově značené formy vitamínu K (MK-7-d7, K₁-d7). Před samotnou analýzou bylo nezbytné provést předúpravu vzorku extrakcí tuhými fázemi (SPE). Vzorky byly separovány na koloně SB-C8 (2,1 × 100 mm, 1,8 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) při 40 °C za použití gradientu mobilních fází (A – 0,1% fluorid amonný v 50% methanolu, B – 0,1% fluorid amonný v methanolu). Doba separace byla přibližně 9 minut. Pro přípravu vzorku bylo použito 500 μl séra, ke kterému bylo přidáno 10 μl vnitřního standardu. Následně byly přidány 2 ml ethanolu, aby došlo k uvolnění vitamínů z vazby. Poté byl vzorek 5 min extrahován do 4 ml hexanu a centrifugován při 3727 g po dobu 10 min. Organická vrstva byla následně odpařena pod proudem dusíku a lipidový extrakt byl rozpuštěn ve 2 ml hexanu. U takto připraveného vzorku byla provedena SPE. Extrakční kolonky byly aktivovány postupně 9 ml hexanu a k eluci byla použita směs diethyletheru s hexanem (3:97). Takto připravený vzorek byl následně opět odpařen a odparek rozpuštěn ve 100 μl propan-2-olu. Připravený vzorek se přenesl do vialky a byl analyzován metodou LC-MS/MS. Další detaily jsou uvedeny v práci Dunovské²⁰.

Chemická analýza

Pro chemickou analýzu vzorků pacientů byl použit analyzátor Atellica Solutions CH 930 (Siemens, USA) a Atellica Solutions IM (Siemens, USA), který používá mikroobjemovou technologii pro fotometrické analýzy. Byly stanoveny koncentrace Ca, P, ALP, kreatininu a 25-(OH) vitamínu D. Ultračistá voda byla připravena na zařízení ELGA (Londýn, Spojené království), pH bylo kontrolováno na pH metru (VWR, USA).

Statistické a matematické vyhodnocení

Veškerá analyzovaná data byla převedena do laboratorní databáze QINSLAB a statisticky vyhodnocena. Všechny analýzy byly provedeny minimálně ve 3 opakováních. Analytické parametry LOD a LOQ byly vypočítány podle práce Hubaoux a Vose²¹.

Výsledky a diskuse

Biochemická a chemická analýza krevních sér pacientů

Ve sledovaném pilotním souboru pacientů s onemocněním pohybového aparátu byly analyzovány vybrané biochemické parametry související s kostním metabolismem (tab. I). Podle diagnóz byly vytvořeny skupiny. V jednotlivých skupinách byly stanoveny hladiny

analytů biochemických markerů vyjádřených jako průměrné hodnoty ALP (μkat l⁻¹): kontrola (1,2); ramena (1,3); kyčle (1,5); kolena (1,6); artritida (1,0); kreatinin (μmol l⁻¹): kontrola (81,6); ramena (69,4); kyčle (71,2); kolena (83,6); artritida (66,4); Ca (mmol l⁻¹): kontrola (2,4); ramena (2,4); kyčle (2,5); kolena (2,5); artritida (2,4); P (mmol l⁻¹): kontrola (1,1); ramena (1,2); kyčle (1,1); kolena (0,9); artritida (1,2); 25-(OH)-vitamin D (nmol l⁻¹): kontrola (86); ramena (73); kyčle (58); kolena (62); artritida (88). Zejména u vitamínu K₂ byl pozorován pozitivní účinek na kostní hmotu, kde působí na osteokalcin v průběhu jeho karboxylace. Dostatečná karboxylace je také nezbytná u MGP. Hladiny vybraných vitamínů byly analyzovány technikou LC-MS/MS (cit.^{20,22}). Vitamin K₂ MK-7 (nmol l⁻¹): kontrola (0,31); ramena (0,30); kyčle (0,37); kolena (0,96); artritida (0,38). Z těchto prvotních experimentálních dat byla provedena korelační analýza testovaných průměrných biochemických ukazatelů stanovených v séru. Byla zjištěna korelace k hladině sérového 25-(OH) vitamínu D a ALP (r = -0,881), dále MK-7 a MGP (r = 0,995), MGP a P (r = -0,894) a MGP a Ca (r = 0,768).

Spektrofotometrické stanovení celkového MGP

Byly publikovány studie zabývající se rozdíly v koncentracích MGP v séru u zdravých probandů, u pacientů s *anginou pectoris*, onemocněními chrupavky a osteoartrózy^{15,23–25}. Autoři naznačují, že MGP by se mohlo používat jako marker aktivity osteoartrózy²⁶.

Závislost změny signálu na koncentraci MGP

V naší práci jsme optimalizovali postup pro stanovení celkového MGP v biologickém vzorku. Po primárním promytí destičky bylo k analýze použito 100 μl vzorku (10× ředěné sérum). MGP se vázal na primární protilátku ukotvenou k povrchu destičky. K vlastní detekci byla využita protilátka značená peroxidasou (inkubace 60 min, 37 °C, 100 rpm v 0,01 mol l⁻¹ PBS, pH 7,0). Jako vhodný substrát byl využíván 5 mmol l⁻¹ TMB. Oxidací TMB vzniká typický barevný produkt (vložený obrázek v obr. 2Ab). Byla testována závislost signálu na koncentraci MGP (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 a 0 ng ml⁻¹). Obr. 2Ab ukazuje lineární část od 0 do 10 ng ml⁻¹. Ze získaných dat (n = 12) byly vypočteny analytické parametry: r = 0,9968; RSD = 9,3 %; LOD = 1,6; LOQ = 5,4 ng ml⁻¹; QC = koeficient 7,4 %. Získaná závislost byla využita pro stanovení koncentrace MGP v séru pacientů.

Koncentrace MGP u vzorků pacientů

Kromě toho byla ELISA metoda dále využita pro stanovení MGP proteinu u vybraných pacientů s dobrou reprodukovatelností do 20 %. Celkem bylo analyzováno 76 vzorků krevních sér (obr. 3Aa). Průměrná hladina MGP byla 25,9 ng ml⁻¹ s mediánem 20,5 ng ml⁻¹ a extrémní minimální koncentrace 8 ng ml⁻¹ a maximální koncentrace 73,1 ng ml⁻¹. V tomto vzorku bylo analyzováno 29 kontrol s průměrnou hladinou MGP 22,9 ng ml⁻¹

Tabulka I
Popis biochemických a chemických parametrů sledované skupiny probandů^a

Popis sledované skupiny	Zdraví probandi	Kalcifikace kolene	Kalcifikace ramene	Osifikace kyčle	Artritida
Počet případů, <i>n</i>	30	1	21	19	2
Věk	58 (58)	62 (62)	50 (49)	65 (73)	59 (59)
Alkalická fosfatasa (ALP), $\mu\text{kat l}^{-1}$	$1,2 \pm 0,4$ (1,2)	1,6 (1,6)	$1,3 \pm 0,3$ (1,3)	$1,5 \pm 0,5$ (1,5)	$1,0 \pm 0,2$ (1,0)
Kreatinin, $\mu\text{mol l}^{-1}$	$81,6 \pm 20,5$ (80,9)	83,6 (83,6)	$69,4 \pm 13,5$ (64,5)	$71,2 \pm 20,2$ (72,4)	$66,4 \pm 18,9$ (66,4)
Celkové vápenaté ionty, mmol l^{-1}	$2,4 \pm 0,1$ (2,4)	2,5 (2,5)	$2,4 \pm 0,1$ (2,4)	$2,5 \pm 0,2$ (2,5)	$2,4 \pm 0,1$ (2,4)
Celkové fosfáty, mmol l^{-1}	$1,1 \pm 0,2$ (1,1)	0,9 (0,9)	$1,2 \pm 0,2$ (1,2)	$1,1 \pm 0,2$ (1,2)	$1,2 \pm 0,2$ (1,2)
25-(OH) vitamin D, nmol l^{-1}	86 ± 16 (88)	62 (62)	73 ± 16 (75)	58 ± 14 (59)	85 ± 16 (85)
MK-7, ng ml^{-1}	$0,31 \pm 0,16$ (0,28)	0,96 (0,96)	$0,30 \pm 0,13$ (0,27)	$0,37 \pm 0,26$ (0,33)	$0,38 \pm 0,09$ (0,38)
MGP, ng ml^{-1}	23 ± 11 (18)	65 (65)	23 ± 16 (19)	28 ± 16 (23)	33 ± 28 (32)

^a Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty a směrodatná odchylka, v závorce je medián.

a mediánem 18 ng ml^{-1} . U 21 vzorků pacientů byla průměrná hladina MGP $30,2 \text{ ng ml}^{-1}$ a medián $27,9 \text{ ng ml}^{-1}$. Statisticky nebyl prokázán rozdíl v koncentracích MGP mezi skupinami ($p = 0,2191$) (obr. 3Ba). Na obr. 3Ca je ukázán rozdíl distribuce koncentrace MGP mezi pohlavími. U mužů byla koncentrace MGP $21,4 \text{ ng ml}^{-1}$ s mediánem $21,3 \text{ ng ml}^{-1}$ a u žen byla průměrná koncentrace MGP $16,9 \text{ ng ml}^{-1}$ a medián $17,0 \text{ ng ml}^{-1}$. Statisticky nebyl prokázán rozdíl v koncentracích MGP mezi skupinami ($p = 0,11$). Podle frekvenčního histogramu je většina hodnot sérové koncentrace MGP v intervalu od 6 do 14 nmol l^{-1} .

Chemiluminiscenční stanovení celkového dp-uc MGP

V několika studiích byl jako možný prediktor mortality popisován dp-uc MGP (cit.^{27–30}). dp-uc MGP by mohl mít vyšší klinickou specificitu než MGP, proto jsme se pokusili tento protein stanovit. Koncentrační hladiny dp-uc MGP jsou velmi nízké, a proto jejich stanovení vyžaduje pozornost.

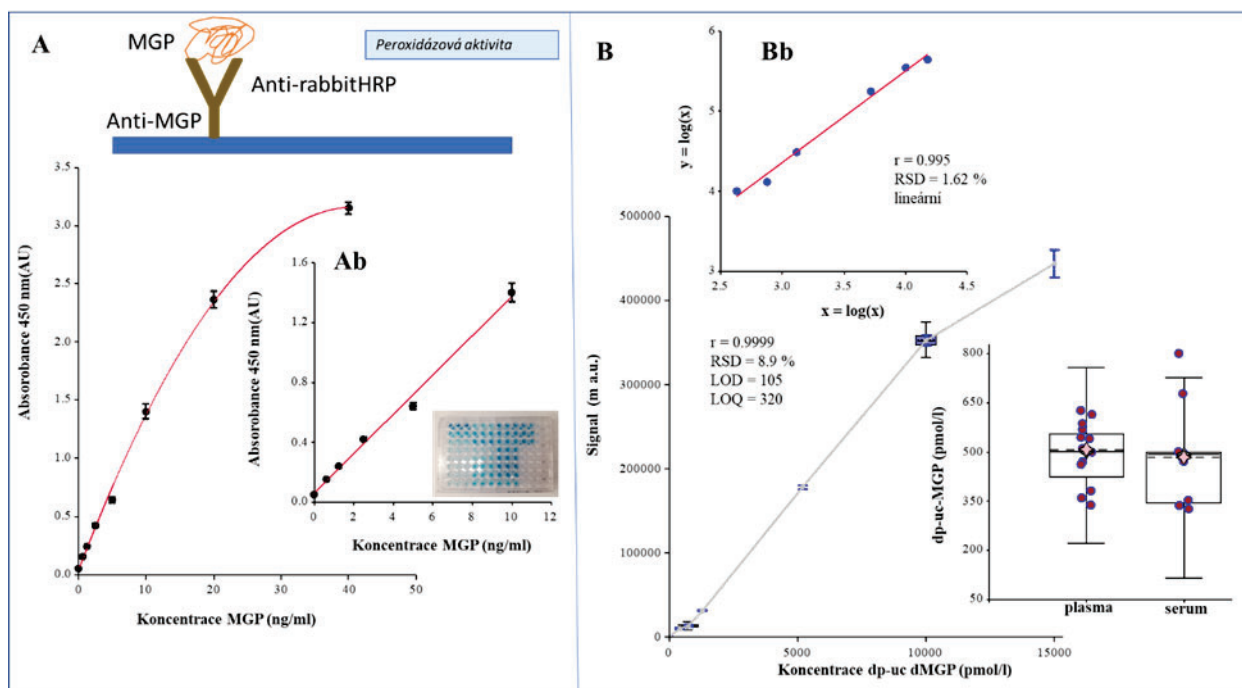
Závislost změny signálu na koncentraci dp-uc MGP

Analýza probíhala za využití plně automatizovaného systému (dávkování vzorku, promývání, inkubace, detekce). K detekci je využíváno fluorescenčně značené protilátky, která se specificky váže na detekční komplex. Fluorescenční signál pozadí je poměrně nízký, a tak je možné rozlišit i velmi nízkou koncentraci stanovovaného analytu. Na obr. 2B je závislost fluorescenčního signálu na koncentraci dp-uc MGP ($0\text{--}15\ 000 \text{ pmol l}^{-1}$). Závislost nebyla lineární a pro určení koncentrace ve vzorcích vyhovoval model kvadratické křivky ($y = -19418 + 45,17x -$

$0,0009x^2$). Kalibrační experimenty byly provedeny v několika nezávislých opakováních ($n = 8$) s dobrou relativní chybou kolem 8,9 %. Ze získaných dat bylo možné určit $\text{LOD} = 105$ a $\text{LOQ} = 320 \text{ pmol l}^{-1}$. Ve vloženém obrázku v obr. 2B je závislost signálu na koncentraci dp-uc MGP linearizována logaritmováním ($r = 0,995$).

Koncentrace dp-uc MGP u vzorků pacientů

Na obr. 2 B ve vloženém obrázku je ukázána distribuce měřených signálů dp-uc MGP v plasmě a séru stejného vzorku. Průměrné koncentrace byly v plasmě zvýšené v porovnání se sérem ($n = 14$, průměr 501 pmol l^{-1}) a séru ($n = 11$, průměr 492 pmol l^{-1}). Hladina dp-uc MGP v séru je velmi nepatrně nižší než v plasmě (do 10 %), což může způsobovat komplikace při automatizovaném vyhodnocení koncentrace ve vzorku. Celkem bylo analyzováno 41 vzorků krevních sér (obr. 3Ab). Průměrná hladina dp-uc MGP byla $2,47 \text{ ng ml}^{-1}$ s mediánem $2,5 \text{ ng ml}^{-1}$ a extrémní minimální koncentrace 2 ng ml^{-1} a maximální koncentrace 4 ng ml^{-1} . V tomto vzorku bylo analyzováno 29 kontrol s průměrnou hladinou dp-uc MGP $2,5 \text{ ng ml}^{-1}$ a mediánem $2,4 \text{ pmol l}^{-1}$. U 21 vzorků pacientů byla průměrná hladina dp-uc MGP $2,55 \text{ ng ml}^{-1}$ a medián $2,5 \text{ ng ml}^{-1}$. Statisticky nebyl prokázán rozdíl v koncentracích dp-uc MGP mezi skupinami (obr. 3Bb). Na obr. 3Cb je ukázán rozdíl distribuce koncentrace dp-uc MGP mezi pohlavími. U mužů byla koncentrace dp-uc MGP $2,45 \text{ ng ml}^{-1}$ s mediánem $2,4 \text{ ng ml}^{-1}$ a u žen byla průměrná koncentrace dp-uc MGP $2,52 \text{ ng ml}^{-1}$ a medián $2,5 \text{ ng ml}^{-1}$. Statisticky nebyl prokázán rozdíl v koncentracích dp-uc MGP mezi skupinami. Podle frekvenčního histogramu je většina hodnot sérové koncentrace dp-uc MGP v intervalu od 6 do 14 ng ml^{-1} . Hladiny dp-uc MGP



Obr. 2. ELISA detekce MGP v krevním séru. Závislost na koncentraci MGP (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 a 0 ng ml⁻¹) (A), vložený obrázek lineární závislost (0–10 ng ml⁻¹) (Ab). Sekundární protilátka značená křenuvou peroxidasou oxiduje substrát 5 mmol l⁻¹ TMB, 15 min, 37 °C, 100 rpm za vzniku modrého zbarvení. Enzymatická reakce je zastavena přidávkem 0,05 mol l⁻¹ H₂SO₄. CLIA detekce dp-uc MGP v krevním séru. Změna signálu na koncentraci dp-uc MGP (B) ve vloženém obrázku logaritmicke linearizace koncentrační závislosti (Bb). Pro přepočet koncentrací dp-uc MGP bylo použito MW 12350. Pro všechna testování byl počet jednotlivých opakování 4, chybové úsečky zobrazeny jako CI (95 %). Další podrobnosti jsou uvedeny v části Materiál a metody.

byly v séru velmi homogenní a většina hodnot se pohybovala v intervalu mezi 2–3 ng ml⁻¹ s maximem kolem 2,5 ng ml⁻¹. Na získaném vzorku korelační analýza mezi hladinou průměrných koncentrací dp-uc MGP a MGP prokázala korelační závislost $r = -0,66$.

Závěr

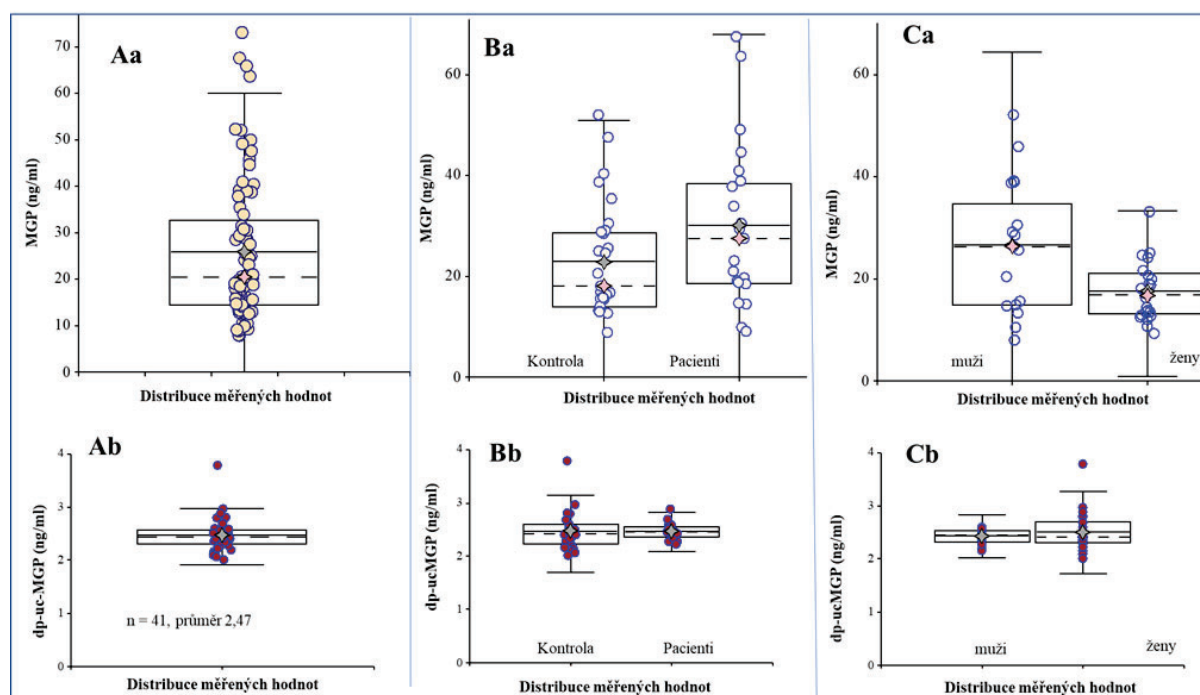
Při nedostatečné karboxylaci MGP dochází k tzv. „kalciovému paradoxu“, kdy se nadměrně ukládají vápenaté ionty do měkkých tkání na úkor kostní hmoty a nastává aberantní mineralizace měkkých tkání. Byly navrženy metody pro detekci MGP a dp-uc MGP splňující základní analytické charakteristiky pro použití v klinických laboratořích. Postup byl aplikován na reálné vzorky pacientů s onemocněním pohybového aparátu. V současné době není stanovení celkového MGP v klinické praxi rutinně využíváno a stanovení dp-uc MGP je využíváno rutinně pouze u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Pilotně získaná experimentální data ukázala na rozdíly mezi testovanými skupinami pacientů a kontrol. Experimenty budou dále rozšiřovány na větší soubor pacientů pro následné využití v ortopedické klinické praxi. Tyto markery

by mohly sloužit jako potenciální ukazatele závažnosti kloubních onemocnění (kalcifikující tendinitida ramene, heterotopické osifikace), kardiovaskulárních onemocnění a také jako markery vypovídající o stavu vitamínu K v organismu.

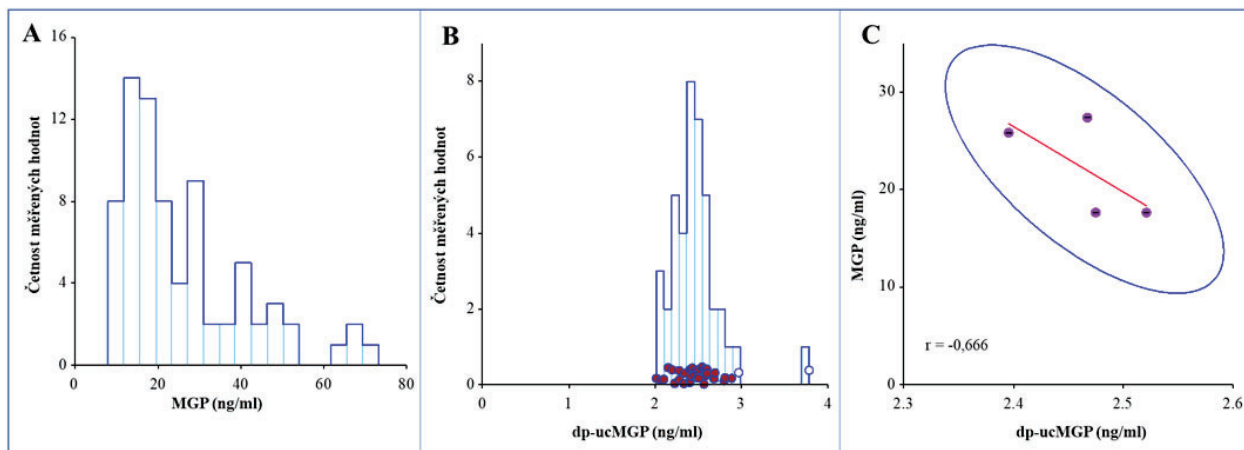
Práce byla realizována za podpory institucionální podpory MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203.

Seznam zkratk

MGP	celkový MGP, také t-MGP
uc-MGP	nedostatečně karboxylovaný MGP
dp-MGP	defosforylovaný MGP
dp-uc MGP	defosforylovaný nedostatečně karboxylovaný MGP
ELISA	enzymová imunoabsorbční analýza
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií
VKDP	vitamin K dependentní proteiny
VK2	vitamin K ₂
MK-7	menachinon-7



Obr. 3. **Distribuce hladin MGP a dp-uc MGP u kontrolní a pacientské skupiny.** Rozvrstvení hladin MGP u všech analyzovaných vzorků krevního séra, $n = 76$ (Aa) a dp-ucMGP $n = 41$ (Ab). Porovnání koncentračních hladin MGP mezi kontrolní skupinou a pacientskou skupinou (Ba) a dp-ucMGP (Bb). Porovnání koncentračních hladin MGP mezi pohlavím (Ca) a dp-ucMGP (Cb). Podrobnosti k materiálu a metodám jsou uvedeny v části materiály a metody. Všechny analýzy byly opakovány 3krát.



Obr. 4. **Frekvenční histogramy distribuce naměřených hodnot.** MGP (A) a dp-ucMGP (B) v celkovém souboru vzorků krevních sér. Korelační analýza hladin MGP a dp-ucMGP (C). Další podrobnosti jsou uvedeny na obr. 3.

LITERATURA

- Kotb M. M., Omar U. F., Kaliya-Perumal A. K.: *Diagnostics* 13, 1711 (2023).
- Klapkova E., Dunovska K., Kizek R., Hodik M., Cepova J., Prusa R., Barna M., Melicharcik P.: *Motol In* 15, 16 (2023), <https://www.fnmotol.cz/wp-content/uploads/motol-in-kveten-final1-web.pdf>, staženo 4. 9. 2023.
- Olsen E., Endrizzi D., Stephenson M., Farrarher S.: *Skeletal Radiology* 50, 973 (2021).
- Dhollander O., McKee A., Houben R.: *Acta Orthop. Belg.* 86, 162 (2020).

5. Wilkinson J. M., Stockley I., Hamer A. J., Barrington N. A., Eastell R.: *J. Orthopaed. Res.* 21, 529 (2003).
6. Ishihara C., Kushida K., Takahashi M., Ohishi T., Murata H., Nagano A., Goto S.: *Spinal Cord* 38, 211 (2000).
7. Bjorklund G., Svanberg E., Dadar M., Card D. J., Chirumbolo S., Harrington D. J., Aaseth J.: *Cur. Med. Chem.* 27, 1647 (2020).
8. Luo G. B., Ducey P., McKee M. D., Pinero G. J., Loyer E., Behringer R. R., Karsenty G.: *Nature* 386, 78 (1997).
9. Murshed M., Schinke T., McKee M. D., Karsenty G.: *J. Cell Biol.* 165, 625 (2004).
10. Schurgers L. J., Cranenburg E. C. M., Vermeer C.: *Thromb. Haemost.* 100, 593 (2008).
11. Westendorf R. a 11 spoluautorů: *Am. J. Kidney Dis.* 59, 186 (2012).
12. Saritas T. a 15 spoluautorů: *Clin. Kid. J.* 15, 2300 (2022).
13. Vidula M. K. a 10 spoluautorů: *Am. J. Hypert.* 35, 393 (2022).
14. Schurgers L. J., Teunissen K. J. F., Knapen M. H. J., Kwaijtaal M., van Diest R., Appels A., Reutelingsperger C. P., Cleutjens J. P. M., Vermeer C.: *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 25, 1629 (2005).
15. Schurgers L. J., Teunissen K. J. F., Knapen M. H. J., Geusens P., van der Heijde D., Kwaijtaal M., van Diest R., Ketteler M., Vermeer C.: *Clin. Chim. Acta* 351, 131 (2005).
16. Cranenburg E. C. M. a 11 spoluautorů: *J. Thromb. Haemost.* 9, 1225 (2011).
17. Crintea A., Dutu A. G., Constantin A. M., Fekete Z., Samasca G., Lupan I., Florian I. A., Silaghi C. N., Craciun A. M.: *Biology-Basel* 11, 82 (2022).
18. Svestak M., Sporova L., Prochazkova J., Karpisek M., Dragusin L. G., Moravcikova D., Stejskal D.: *Chem. Listy* 105, 622 (2011).
19. Hou F. P., Sun S. Q., Abdullah S. W., Tang Y., Li X. X., Guo H. C.: *Anal. Met.* 15, 2154 (2023).
20. Dunovska K., Klappkova E., Sopko B., Cepova J., Prusa R.: *PeerJ* 7, e7695 (2019). DOI: 10.7717/peerj.7695.
21. Hubaux A., Vos G.: *Anal. Chem.* 42, 849 (1970).
22. Klappkova E., Cepova J., Dunovska K., Prusa R.: *J. Clin. Lab. Anal.* 32, e22381 (2018).
23. Shea M. K., O'Donnell C. J., Hoffmann U., Dallal G. E., Dawson-Hughes B., Ordovas J. M., Price P. A., Williamson M. K., Booth S. L.: *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1799 (2009).
24. Cranenburg E. C. M., Koos R., Schurgers L. J., Magdeleyns E. J., Schoonbrood T. H. M., Landewé R. B., Brandenburg V. M., Bekers O., Vermeer C.: *Thromb. Haemost.* 104, 811 (2010).
25. Misra D., Booth S. L., Crosier M. D., Ordovas J. M., Felson D. T., Neogi T.: *J. Rheumatol.* 38, 1960 (2011).
26. Lis K.: *Reumatologia* 46, 1 (2008).
27. Wei F. F. a 10 spoluautorů: *J. Am. Heart Assoc.* 8, e011960 (2019).
28. Schlieper G. a 12 spoluautorů: *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 387 (2011).
29. Oikonomaki T., Papatirou M., Ntrinas T., Kalogeropoulou C., Zabakis P., Kalavrizioti D., Papadakis I., Goumenos D. S., Papachristou E.: *Int. Urol. Nephrol.* 51, 2037 (2019).
30. Levy-Schousboe K. a 17 spoluautorů: *Clin. Kid. J.* 14, 2114 (2021).

M. Barna^{a,b}, J. Čepová^a, K. Dunovská^a, J. Petrus^a, P. Melicherčík^a, R. Průša^a, R. Kizek^a, and E. Klappková^a (^a Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic, ^b Department of Orthopaedics, First Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic): **Chemiluminescent and Photometric Analysis of Matrix Gla Protein from Patients with a Defect of Musculoskeletal System**

Matrix Gla protein (MGP) is a circulating protein with a low molecular weight that acts as a natural inhibitor of calcification. It belongs to the group of vitamin K-dependent proteins. For its proper function, MGP must undergo vitamin K-dependent carboxylation and phosphorylation. Its main function is the prevention of soft-tissue calcification. It requires vitamin K₂ as a cofactor for gamma glutamyl carboxylase. Vitamin K insufficiency is manifested by cardiovascular diseases, insufficient mineralization of bone tissue and the formation of calcifying deposits in soft tissues. The aim of this study was to design methods for monitoring the levels of MGP and dp-uc MGP by using immunochemical detection and to apply them to the analysis of real samples for use in clinical laboratories. These markers could serve as potential markers of the severity of joint diseases, cardiovascular diseases and also as markers indicating the status of vitamin K in organism.

Keywords: ELISA, levels of calcium and phosphates, bone metabolism, matrix Gla proteins, vitamin K



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

METODIKA PRO STANOVENÍ CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ FENOLICKÝCH LÁTEK, FLAVONOIDŮ A ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY ROSTLINNÝCH VZORKŮ POMOCÍ KOMBINOVANÉ EXTRAKCE

VERONIKA BERKOVÁ^a, LENKA ŠTĚPÁNKOVÁ^a, PETR ČÍČMANEC^a, LUCIE FREJLICOVÁ^b
a MIROSLAV BERKA^a

^a Ústav molekulární biologie a radiobiologie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^b Mendeleum – ústav genetiky, Zahradnická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Valtická 334, 691 44 Lednice na Moravě, Česká republika
veronika.berkova@mendelu.cz

Došlo 27.2.23, přijato 19.9.23.

Přestože existuje řada metodik pro stanovení základních antioxidačních parametrů u rostlin, spousta studií využívá oddělené extrakce pro jednotlivé typy stanovení. Cílem práce bylo blíže specifikovat metodiku, která umožňuje základní analýzu celkového množství fenolických látek, flavonoidů a celkové antioxidační kapacity z jednoho vzorku, přičemž pro minimalizaci spotřeby vzorku využívá destičkový formát. Popsaný extrakční postup a snížení spotřeby vzorku současně umožňuje provedení komplementárních analýz a bližší charakterizaci složení rostlinných vzorků. Výsledky lze využít pro následné cílené analýzy, což bylo demonstrováno na stanovení vybraných flavonoidů analýzou GC-MS, která potvrdila výsledky spektrofotometrického stanovení. Popsané využití kombinované extrakce pro analýzu rostlinných vzorků usnadňuje analýzy, snižuje množství výchozího materiálu a umožňuje následnou analýzu biomolekul např. pomocí hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova: antioxidační kapacita, fenolické sloučeniny, flavonoidy, reaktivní formy kyslíku, abiotický stres

Úvod

Rostliny jakožto přisedlé organismy jsou vystavovány různým nepříznivým podmínkám prostředí, a to jak biotickým stresům (patogeny, býložravci), tak abiotickým stresovým faktorům (chlad, sucho, zasolení, toxicita kovů, nedostatek živin, mraz nebo zvýšená teplota). Jedním z klíčových znaků abiotického stresu na molekulární úrovni je produkce reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), které zahrnují např. peroxid vodíku (H₂O₂), singletový kyslík (¹O₂), hydroxylový radikál ([•]OH), superoxidový aniontový radikál (O₂^{•-}) (cit.¹). V nízkých koncentracích mohou ROS hrát důležitou roli v signalizaci a vývoji rostlin²⁻⁴. Všechny zmíněné formy ROS jsou ovšem schopny reagovat s nukleovými kyselinami, proteiny a enzymy, případně s membránovými lipidy, což má za následek poškození buněk⁵. Proto je klíčové studium antioxidačního systému rostlin, který byl vyvinutý pro ochranu buněk a pletiv a k neutralizaci volných radikálů⁶.

Fenolické sloučeniny patří k nejpočetnější skupině sekundárních metabolitů s významnou antioxidační aktivitou účastníci se mnoha fyziologických procesů ovlivňujících růst a vývoj rostlin. Kromě zapojení do klíčení semen, tvorby fotosyntetických pigmentů, strukturálních a ochranných

funkce buněčných stěn mohou fenolické látky rostlin působit také jako signální molekuly pro endosymbiotické organismy (např. mykorrhizní houby)⁷⁻¹⁰. V rámci stresových podmínek jsou významné pro přirozenou obranu proti mikrobiálním patogenům, herbivorům nebo pro adaptaci vůči nepříznivým abiotickým podmínkám¹¹⁻¹⁴.

Fenolické sloučeniny jsou složeny z aromatického jádra nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin, přičemž jejich výsledná struktura může být velmi rozmanitá. Rostlinné fenolické sloučeniny se rozdělují do několika tříd, mezi které patří fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany¹⁵. Největší skupinou rostlinných fenolů jsou flavonoidy zahrnující strukturální třídy jako flavonoly, flavony, flavanoly, flavanony, antokyanidy, chalkony nebo isoflavony¹⁶. Flavonoidy mají společnou základní strukturu skeletu C6-C3-C6 sestávající se ze dvou aromatických kruhů a heterocyklického kruhu obsahující jeden atom kyslíku. Chemická struktura flavonoidů a dalších rostlinných polyfenolů je významná pro vycytávání volných radikálů a jejich antioxidační vlastnosti zahrnují chelataci kovových iontů, regeneraci antioxidačních sloučenin (např. α-tokoferolu), aktivaci antioxidačních enzymů anebo inhibici tvorby enzymů produkujících radikály.

Charakterizace antioxidantů a fenolických sloučenin je zásadní nejen pro oblast výzkumu rostlin, ale i pro výživu člověka. Vzhledem k velké rozmanitosti jsou fenolické sloučeniny jako markery oxidačního stresu určovány různými metodikami, které závisí na odbornosti každé laboratoře. K identifikaci a kvantifikaci mohou být využity pokročilé analytické techniky včetně vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s UV/Vis detektorem nebo detektorem diodového pole¹⁷. Pro individuální separaci a kvantifikaci se často používá rovněž kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS)¹⁸. Pro detekci částí fenolických sloučenin lze také využít plynovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)¹⁹. Tyto techniky mohou být využity pro přesné, citlivé a selektivní stanovení sloučenin v rostlinných vzorcích, nicméně vyžadují poměrně sofistikované přístrojové vybavení a nákladnou údržbu.

Rovněž je možné provést spektrometrické stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC), celkového obsahu fenolických sloučenin (TPC) a flavonoidů (TFC), které využívají cenově dostupná činidla a přístrojové vybavení²⁰. Stanovení celkového množství fenolických látek, flavonoidů nebo celkové stanovení antioxidační kapacity patří již několik desítek let mezi zavedené metody pro analýzu rostlinného materiálu vystaveného abiotickým nebo biotickým stresovým podmínkám. Přestože se jedná o rutinní analýzy, využívá spousta studií oddělené extrakce pro jednotlivé typy stanovení^{13,21}. Tato skutečnost může být limitující pro analýzy s omezeným množstvím vzorku (např. analýza klíčnicích rostlin, určitého vývojového stádia listů). Nezávislé extrakce mohou být také časově náročnější a nemusí být lehce reprodukovatelné. V posledních letech je snaha optimalizovat extrakční postupy pro získání různých typů biomolekul z jednoho vzorku, což mnohdy urychluje a umožňuje práci s menším množstvím materiálu. Příkladem jsou studie popisující kombinovanou extrakci pro přípravu vzorků pro hmotnostní spektrometrii^{22,23} nebo kombinovanou extrakci pro spektrofotometrickou analýzu různorodých látek²⁰. Uvedené studie umožňují analýzy rozdílných látek a přináší velké množství výhod, nicméně mají i své nevýhody. Cílem práce bylo rozšířit metodiku pro rychlou a základní analýzu antioxidačních markerů, která v následných krocích umožňuje stanovení proteinů a metabolitů metodou hmotnostní spektrometrie. Na závěr byly výsledky srovnány s výsledky stanovení vybraných flavonoidů pomocí GC-MS analýzy.

Experimentální část

Reagencie

Ke stanovení byly použity standardy rutinu ($C_{27}H_{30}O_{16}$) čistoty $\geq 94\%$, gallové kyseliny ($C_7H_6O_5$) $\geq 99\%$ a askorbové kyseliny ($C_6H_8O_6$) $\geq 99\%$ (Merck, Německo). Ze standardů byly připraveny zásobní roztoky, ze

kterých byly připraveny pětibodové kalibrační křivky v následujících intervalech koncentrací: 0,0625–1 mM pro rutin, 0,375–6 mM pro gallovou kyselinu a 0,125–2 mM pro askorbovou kyselinu. Chemikálie pro extrakci: methyl-*tert*-butyl ether (MTBE; $C_5H_{12}O$) čistoty $\geq 99,8\%$ (Merck, Německo), aceton (C_3H_6O) čistoty $\geq 99,8\%$, (HiPerSolv CHROMANORM® pro HPLC; VWR Chemicals) a methanol (CH_3OH) čistoty $\geq 99,9\%$ (HiPerSolv CHROMANORM® pro LC-MS; VWR Chemicals). Chemikálie pro stanovení fenolických látek: Folinovo fenolické činidlo a uhličitan sodný (Na_2CO_3) čistoty $\geq 99,5\%$ (Merck, Německo). Chemikálie pro stanovení flavonoidů: dusitan sodný ($NaNO_2$) čistoty $\geq 97,0\%$, chlorid hlinitý ($AlCl_3$) čistoty $\geq 98\%$ (Merck, Německo) a hydroxid sodný ($NaOH$) čistota p.a. (Penta, Česká republika). Chemikálie pro stanovení antioxidační kapacity: fosforečnan sodný (Na_3PO_4) čistoty $\geq 96\%$, heptamolybdenan amonný ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$) čistoty $\geq 99\%$ a kyselina sírová (H_2SO_4) 96 % čistota p.a. (Penta, Česká republika). Chemikálie pro GC-MS analýzu: pyridin (C_5H_5N) čistoty $\geq 99,8\%$, *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid ($CF_3CON(CH_3)Si(CH_3)_3$) čistoty $\geq 98,5\%$, methoxyamin hydrochlorid ($CH_3ONH_2 \cdot HCl$) čistoty $\geq 97,5\%$ (Merck, Německo). Pro extrakci, přípravu roztoků a následná stanovení byla použita čistá voda splňující požadavky pro měření na hmotnostním spektrometru (HiPerSolv CHROMANORM® pro LC-MS; VWR Chemicals).

Přístrojové vybavení

Pro homogenizaci byl využit kulový mlýn Retsch Mixer Mill MM 400 umožňující účinnou homogenizaci rostlinných pletiv. ThermoMixer comfort (Eppendorf) s adaptéry pro zkumavky a jamkovou destičku sloužil pro inkubace a promíchávání vzorků. Spektrofotometrické stanovení probíhalo na destičkovém spektrofotometru Tecan, Infinite® M1000 Pro s využitím polystyrenových průhledných 96jamkových destiček s plochým dnem a maximálním objemem 350 μ l (VWR® 96 well plate, VWR). Pro odpaření vzorků byl využit vakuový koncentrátor (Speed-Vac system; Thermo Fisher, USA). Výsledky ze spektrofotometrického měření byly následně doplněny pomocí měření na plynovém chromatografu Trace 1300 Gas chromatograph (Thermo Fisher, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Q Exactive™ GC Orbitrap™ GC-MS/MS (Thermo Fisher, USA).

Kultivace rostlin a příprava materiálu

K experimentu byly použity rostliny jahodníku (*Fragaria vesca*) odrůdy Rujana. Vitální a plně vyvinuté jahodníky (3 měsíce od vysazení) byly kultivovány v experimentálních boxech v polních podmínkách. Jeden box s rostlinami byl vystaven abiotickému stresu, a to stresu ze sucha. Rostliny ve druhém boxu byly kultivovány s pravidelnou závlakou. Týden po působení stresu byly listy sesbírány do tekutého dusíku a lyofilizovány. Násled-

ně byly vzorky homogenizovány v kulovém mlýnu (Retsch Mixer Mill MM 400) a z homogenní směsi listových vzorků bylo naváženo 10 mg pro následnou analýzu.

Extrakce metabolitů

Metabolity byly extrahovány přidáním 1 ml vychlazené směsi MTBE a methanolu (3:1, v/v) a inkubovány na ThermoMixer comfort (Eppendorf) při 4 °C, 90 min, 1000 rpm. Po celou dobu extrakce byly vzorky uchovávány na ledu nebo při 4 °C. Vzorky byly následně centrifugovány (10 min, 12 000 g, 4 °C) a po centrifugaci byl odebrán supernatant do nové zkumavky. K peletu (sedimentu) bylo následně přidáno 500 µl vychlazeného methanolu, vzorky byly protřepány a následně centrifugovány (10 min, 12 000 g, 4 °C). Supernatant byl odebrán a přidán k předchozímu supernatantu. K peletu může být přidána směs vody a acetonu (2:8, v/v) a vzorky lze uložit při teplotě –80 °C pro případnou extrakci proteinů. Ze supernatantu bylo odebráno 600 µl a pro rozdělení metabolitů na polární a nepolární frakci bylo přidáno 150 µl MTBE a 450 µl vody. Vzorky byly důkladně promíchány (Retsch Mixer Mill MM 400, 60 s, 30 Hz) a centrifugovány (10 min, 12 000 g, 4 °C). Centrifugace rozdělila vzorky na nepolární a polární frakci (spodní fáze). Pro spektrometrické stanovení a GC-MS analýzu bylo dle použité metody odebráno odpovídající množství polární fáze.

Stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin (TPC)

Do jamek 96jamkové destičky bylo nanášeno 5 µl supernatantu vzorku nebo standardu. Pro určení pozadí byla místo vzorku nanášena voda. Následně bylo přidáno 12,5 µl Folinova fenolického činidla (FCR) a 150 µl vody. Připravená směs byla inkubována při 20 °C po dobu 10 min, a poté bylo do připravených roztoků pipetováno 37,5 µl 20% Na₂CO₃. Destička byla nejprve inkubována a promíchávána ve tmě 2,5 min při 45 °C a 300 ot./min (ThermoMixer). Ke vzorkům bylo poté přidáno 45 µl vody a destička byla následně inkubována při 25 °C po dobu 60 min (opět bez přístupu světla). Následně byla změřena absorbance při 760 nm.

Stanovení celkového obsahu flavonoidů (TFC)

Do 96jamkové destičky bylo napipetováno 10 µl odebraného supernatantu vzorku nebo standardu. Pro určení pozadí byla místo vzorku nanášena voda. Následně bylo přidáno 115 µl vody a 7,5 µl 5% NaNO₂ a směs byla inkubována 5 min při 300 ot./min (ThermoMixer). Poté bylo přidáno 7,5 µl 10% AlCl₃ (vodný roztok) a směs opět inkubována 5 min při 300 ot./min (ThermoMixer). Po dalších pěti minutách bylo přidáno 50 µl 1M NaOH. Reakční směs byla promíchána 15 min při 300 ot./min (ThermoMixer). Následně byla měřena absorbance pomocí destičkového spektrofotometru při 510 nm.

Stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC)

Nejprve bylo připraveno reakční činidlo (28mM Na₃PO₄, 4mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 3,2% H₂SO₄). Do 0,5 ml zkumavek bylo nanášeno 20 µl supernatantu vzorku nebo standardu a 200 µl roztoku výše uvedeného reakčního činidla. Pro určení pozadí byla místo vzorku nanášena voda. Směs byla promíchána a inkubována při 95 °C po dobu 90 min (ThermoMixer). Po ochlazení na teplotu místnosti bylo pipetováno po 200 µl reakční směsi na spektrofotometrickou destičku. Poté byla změřena absorbance při 695 nm.

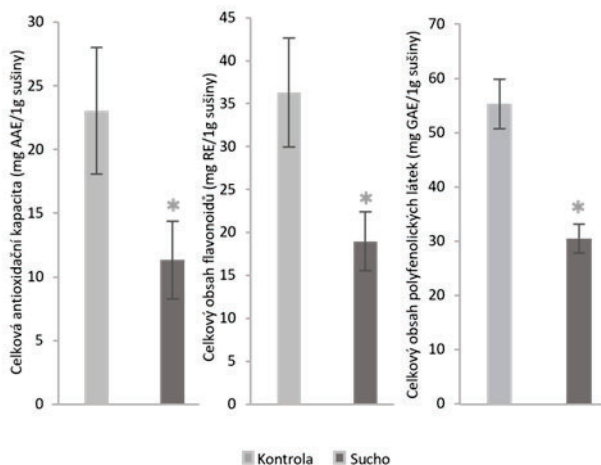
Stanovení vybraných metabolitů metodou GC-MS

Vybrané metabolity byly stanoveny dle dříve publikovaných studií^{24,25}. Ze vzorků byly odebrány alikvoty o objemu 100 µl, které byly následně odpařeny (Speed-Vac system; Thermo Fisher) a derivatizovány 20 µl methoximačnického roztoku (40 mg methoxyamin hydrochloridu v 1 ml pyridinu) a inkubovány po dobu 90 min při 30 °C za neustálého třepání (800 ot./min ThermoMixer). Po inkubaci bylo přidáno 80 µl silylačního roztoku (*N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamid) a směs byla inkubována po dobu 30 min při 37 °C za stálého třepání (800 ot./min ThermoMixer). Derivatizované vzorky o objemu 1 µl byly nastříknuty pomocí TriPlus RSH autosampleru (Thermo Fisher, USA) na kolonu TG-5SILMS GC column (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; Thermo Fisher USA) a separovány pomocí 28minutového teplotního gradientu (70–320 °C) a ionizovány elektronovou ionizací (energie elektronů 70 eV, emisní proud 50 µA, teplota iontového zdroje 250 °C). Hmotnostní spektrometr operoval s rozlišením 60 000 a hmotnostním rozsahem 50–600 *m/z*. Data byla analyzována programem Skyline19.3 (cit.²⁶) a na základě srovnání s jednotlivými standardy.

Výsledky a diskuse

Pro ověření využitelnosti specifikované metodiky byl využit rostlinný materiál vystavený abiotickému stresu, což umožnilo ověření této metodiky přímo v praxi. Pro testování byly zvoleny rostliny jahodníku, které se vyznačují mělkou kořenovou strukturou a velkou listovou plochou vyžadující značné množství vody. Z tohoto důvodu byly rostliny vystaveny suchu, jelikož nedostatek vody v důsledku sucha je závažným environmentálním faktorem limitujícím vývoj a produkci rostlin.

Ze stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin a celkové antioxidační kapacity je patrné, že vystavení rostlin intenzivnímu nedostatku vody vede k významnému snížení obou parametrů (obr. 1). Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, které ukazují, že dlouhodobý a nepřetržitý stres ze sucha inhibuje celkovou syntézu fenolických sloučenin jak v listech, tak kořenech. Kromě inhibice růstu rostlin dochází také k poklesu foto-



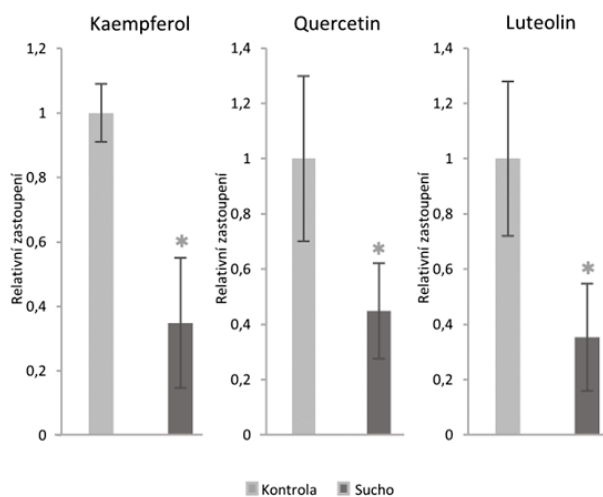
Obr. 1. Stanovení celkové antioxidační kapacity, fenolických látek a flavonoidů rostlin jahod vystavených stresu ze sucha. Světle šedé sloupce reprezentují kontrolní vzorky listů jahod a tmavě šedé sloupce označují listy jahod vystavených suchu. Hodnoty jsou vyjádřeny v ekvivalentech askorbové kyseliny (AAE), rutinu (RE) a gallové kyseliny (GAE). Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku měření ($n=3$). Hvězdička označuje statisticky významnou odchylku ($P < 0,05$, t-test)

syntetických pigmentů, ovlivnění rychlosti transpirace, uzavírání průduchů, narušení iontové rovnováhy nebo redukci fotosyntézy^{27,28}. Obsah fenolických látek přímo souvisí se schopností vychytávat volné radikály, což následně umožňuje provést lineární korelaci s antioxidační kapacitou²⁹. Z tohoto důvodu bylo významné rovněž hodnocení antioxidační kapacity. Ukázalo se přibližně 50% snížení celkové antioxidační kapacity a celkového množství fenolických látek v porovnání s rostlinami rostoucími za standardních podmínek, což naznačuje, že rostliny byly efektivně vystaveny stresovým podmínkám. Stejný trend jako u fenolických sloučenin a antioxidační kapacity byl pozorován taktéž u flavonoidů (obr. 2), kdy opět došlo k jejich významnému poklesu v reakci na suchu. Tyto výsledky opět odpovídají předchozím studiím³⁰. Uvedené analýzy dokazují funkčnost uvedené metodiky umožňující stanovení TCP, TFC a TAC z jednoho vzorku v destičkovém formátu (obr. 3).

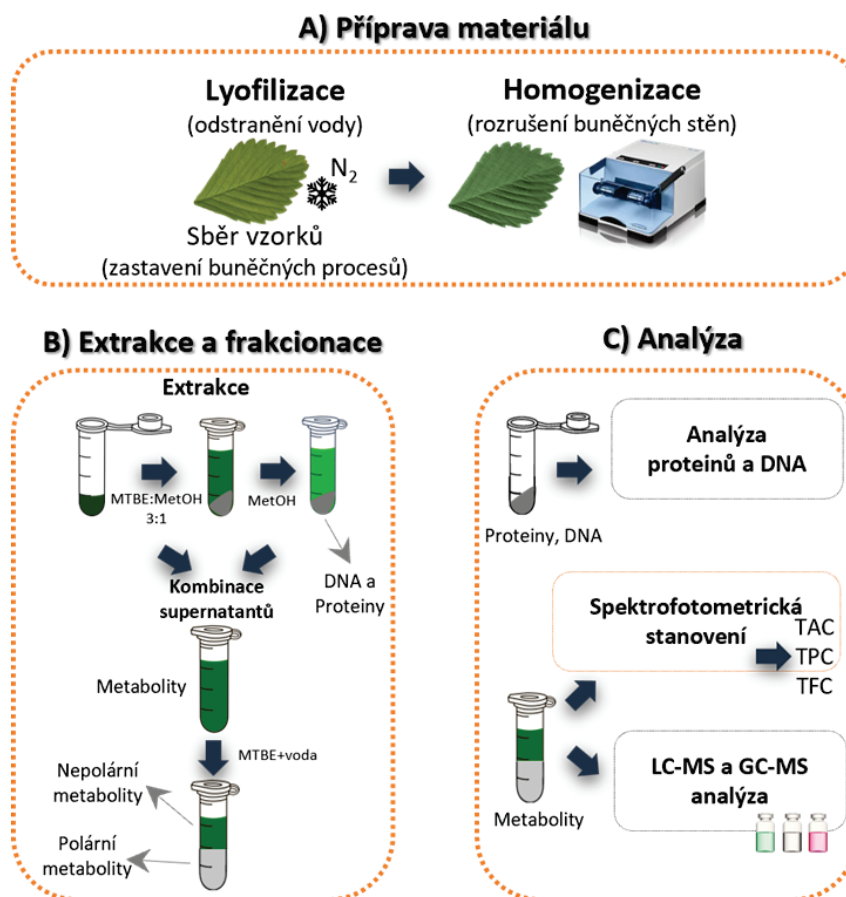
Nutno podotknout, že řada autorů ve svých studiích prokázala, že produkce fenolických látek v rostlinných pletivech i za abiotických stresových podmínek může narůstat^{31,32}. Nesrovnalosti ve výsledcích lze přičíst především rozdílům v intenzitě působení stresu, době jeho trvání, vývojové fázi rostlin, případně samotnému typu abiotického stresu. Pomocí uvedené metody lze tyto procesy velmi efektivně sledovat v závislosti na čase a určit závislost mezi mírou stresu a reakcí rostlin. Metodika navíc výrazně usnadňuje manipulaci se vzorky, což umožňuje zpracování velkého množství vzorků v krátkém časovém intervalu. Během extrakce jsou rovněž extrahovány nepo-

lární metabolity pomocí MTBE, například mastné kyseliny, lipidy a mimo jiné i fotosyntetické pigmenty, které lze stanovit spektrofotometricky. Dříve publikovaná studie²³ je rovněž založena na extrakci metabolitů pomocí směsi MTBE a methanolu. Tato metodika ovšem nevyužívá kombinaci obou supernatantů, což vede ke ztrátám části polárních metabolitů, jakými jsou např. antokyany. Při kombinaci obou extrakčních kroků a následném okyselení části polární frakce je možné stanovit i antokyany. V průběhu optimalizace byla taktéž testována možnost stanovení malondialdehydu, které ovšem při uvedeném extrakčním postupu nebylo proveditelné.

Při použití extrakčních činidel vyšší čistoty umožňuje uvedená metoda následnou analýzu metabolitů kapalino-ovou nebo plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Metodu lze tudíž použít jako prvotní analýzu neznámých vzorků, která pomůže nastínit, zda v analyzovaných vzorcích dochází k významným změnám sekundárních látek (obr. 3). Kromě toho napomůže určit, zda má význam provádět cenově náročné analýzy využívající hmotnostní spektrometrii. Výsledky spektrofotometrických stanovení a kompatibilita extrakce byly ověřeny stanovením vybraných flavonoidů metodou GC-MS (obr. 2). Kaempferol a quercetin patří mezi nejdříve zastoupené flavonoidy v listech jahod³³. Získané výsledky ukazují významný pokles kaempferolu a quercetinu u listů jahod vystavených suchu a shodují se se spektrofotometrickým stanovením celkových flavonoidů. Uvedená metoda navíc umožňuje současnou analýzu proteinů případně i nukleových kyselin³⁴, jelikož při použití methanolu dochází k jejich srážení (obr. 3).



Obr. 2. Vliv sucha na zastoupení flavonoidů v listech jahod. Světle šedé sloupce reprezentují kontrolní vzorky listů jahod a tmavě šedé sloupce označují listy jahod vystavených suchu. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku měření ($n=3$). Hvězdička označuje statisticky významnou odchylku ($P < 0,05$, t-test)



Obr. 3. Schématické zobrazení kombinované extrakce a přípravy vzorků pro spektrofotometrické stanovení sekundárních metabolitů a následně komplementární analýzy

Uvedená metodika výrazně snižuje množství použitého vzorku oproti dříve publikovaným metodám. Příkladem je jedna z nejcitovanějších studií³⁵, která stanovuje celkové množství fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacitu. Pro extrakci látek využili autoři studie methanol, ale ve srovnání s námi použitou metodou používali velké navážky rostlinných vzorků (až 70 g) a extrakty následně zakonzentrovali, což komplikuje analýzy. Následně pro stanovení jednotlivých parametrů využívali velké množství vzorku a činidel, což výrazně zvyšuje cenovou náročnost analýz oproti námi použité metodice. Destičkový formát navíc výrazně šetří čas a omezuje nutnost stálého otevírání a zavírání zkumavek při přidávání jednotlivých složek směsi. V porovnání s další často citovanou studií³⁶ je v rámci uvedené metodiky použito 100krát méně vzorku a 200krát méně FC činidla. Při sledování efektu stresu na rostliny je množství materiálu limitní, proto většina studií používá již menší navážky vzorků a objemy reakčních směsí^{30,37}. Uvedené metody ovšem v rámci extrakce nevyužívají kombinaci polárního a nepolárního rozpouštědla a pro stanovení chlorofylu musí provádět novou ex-

trakci. V rámci naší metodiky je ovšem získána rovněž nepolární frakce, kterou lze využít pro stanovení chlorofylů případně karotenoidů dle zavedených protokolů.

Závěr

Kombinovanou extrakci lze využít pro následné stanovení celkového množství fenolických látek, flavonoidů a celkové antioxidační kapacity z jednoho vzorku. Využití destičkového formátu umožňuje nahrazení jednotlivých extrakčních kroků, usnadňuje manipulaci se vzorky, čímž výrazně snižuje časovou náročnost analýz. Jednou z dalších výhod je možnost stanovení fotosyntetických pigmentů, karotenoidů nebo antokyanů. Metodika navíc využívá extrakční činidla, která umožňují analýzu polárních a nepolárních látek hmotnostní spektrometrií. Zvolením vhodného extrakčního roztoku je dále získán pelet, který obsahuje proteiny a nukleové kyseliny, které lze využít pro další analýzy.

Tento výstup vznikl za podpory projektu Interní grantová schémata Mendelovy univerzity v Brně, reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016670, financovaného z ESF.

Seznam zkratk

FCR	Folinovo fenolické činidlo (Folin-Ciocalteu reagent)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
TAC	celková antioxidační kapacita (total antioxidant capacity)
TFC	celkový obsah flavonoidů (total flavonoid content)
TPC	celkový obsah fenolických sloučenin (total phenol content)

LITERATURA

- Mittler R.: Trends Plant Sci. 22, 11 (2017).
- Černý M., Habánová H., Berka M., Luklová M., Brzobohatý B.: Int. J. Mol. Sci. 19, 2812 (2018).
- Dufková H., Berka M., Luklová M., Rashotte A. M., Brzobohatý B., Černý M.: Molecules 24, 4270 (2019).
- Berka M., Luklová M., Dufková H., Berková V., Novák J., Saiz-Fernández I., Rashotte A. M., Brzobohatý B., Černý M.: Front. Plant Sci. 11, 590337 (2020).
- Fujita M., Hasanuzzaman M.: Antioxidants 11, 925 (2022).
- Dumanović J., Nepovimova E., Natić M., Kuča K., Jačević V.: Front. Plant Sci. 11, 552969 (2021).
- Xu M., Rao J., Chen B.: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 60, 740 (2020).
- Falcioni R., Moriwaki T., de Oliveira D. M., Andreotti G. C., de Souza L. A., Dos Santos W. D., Bonato C. M., Antunes W. C.: Front. Plant Sci. 9, 1391 (2018).
- Sarmiento-López L. G., López-Meyer M., Sepúlveda-Jiménez G., Cárdenas L., Rodríguez-Monroy M.: Biocatal. Agric. Biotechnol. 31, 101889 (2021).
- Tanase C., Bujor O.-C., Popa V. I., v knize: Polyphenols in Plants (Watson R. R., ed.), kap. 3, str. 45. Academic Press, London 2019.
- Zaynab M., Fatima M., Abbas S., Sharif Y., Umair M., Zafar M. H., Bahadar K.: Microb. Pathog. 124, 198 (2018).
- Singh A. K., Dhanapal S., Yadav B. S.: Mol. Biol. Rep. 47, 1459 (2020).
- Ahmed U., Rao M. J., Qi C., Xie Q., Nousahi H. A., Yaseen M., Shi X., Zheng B.: Molecules 26, 5546 (2021).
- Hampejšová R., Berka M., Berková V., Jersáková J., Domkářová J., von Rundstedt F., Frary A., Saiz-Fernández I., Brzobohatý B., Černý M.: Front. Plant Sci. 13, 2295 (2022).
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L.: Am. J. Clin. Nutr. 79, 727 (2004).
- Shen N., Wang T., Gan Q., Liu S., Wang L., Jin B.: Food Chem. 383, 132531 (2022).
- Ziani B. E. C., Heleno S. A., Bachari K., Dias M. I., Alves M. J., Barros L., Ferreira I. C. F. R.: Food Res. Int. 116, 312 (2019).
- López-Fernández O., Domínguez R., Pateiro M., Munekata P. E. S., Rocchetti G., Lorenzo J. M.: Antioxidants 9, 479 (2020).
- Cerny M., Berka M., Dvořák M., Milenković I., Saiz-Fernández I., Brzobohatý B., Ďurkovič J.: Front. Plant Sci. 13, 1018272 (2022).
- López-Hidalgo C., Meijón M., Lamelas L., Valledor L.: Plant, Cell Environ. 44, 1977 (2021).
- Ma D., Sun D., Wang C., Li Y., Guo, T.: Plant Physiol. Biochem. 80, 60 (2014).
- Valledor L., Escandón M., Meijón M., Nukarinen E., Cañal M. J., Weckwerth W.: Plant J. 79, 173 (2014).
- Salem M. A., Yoshida T., de Souza L., Alseekh S., Bajdzienko K., Fernie A. R., Giavalisco P.: Plant J. 103, 1614 (2020).
- Berková V. a 11 spoluautorů: Int. J. Mol. Sci. 24, 5454 (2023).
- Berková V. a 11 spoluautorů: Plants 11, 2931 (2022).
- Pino L. K., Searle B. C., Bollinger J. G., Nunn B., MacLean B., MacCoss M. J.: Mass Spectrom. Rev. 39, 229 (2020).
- Abid G. a 11 spoluautorů: Plant Biosyst. 155, 797 (2021).
- Mansour E., Desoky E.-S. M., Ali M. M. A., Abdul-Hamid M. I., Ullah H., Attia A., Datta A.: Agric. Water Manage. 247, 106754 (2021).
- Gharibi S., Tabatabaei B. E. S., Saeidi G., Goli S. A. H.: Appl. Biochem. Biotechnol. 178, 796 (2016).
- Shin Y. K., Bhandari S. R., Jo J. S., Song J. W., Lee J. G.: Horticulturae 7, 238 (2021).
- Wróbel M., Karama M., Amarowicz R., Frzczek E., Weidner S.: Acta Physiol. Plant. 27, 313 (2005).
- Sarker U., Oba S.: BMC Plant Biol. 18, 1 (2018).
- Kårlund A., Hanhineva K., Lehtonen M., McDougall G. J., Stewart D., Karjalainen R. O.: J. Sci. Food Agric. 97, 2182 (2017).
- Dufková H. a 11 spoluautorů: Plants 11, 61 (2021).
- Aryal S., Baniya M. K., Danekhu K., Kunwar P., Gurung R., Koirala N.: Plants 8, 96 (2019).
- Niroula A., Khatri S., Khadka D., Timilsina R.: Int. J. Food Prop. 22, 427 (2019).
- Shin Y. K., Bhandari S. R., Jo J. S., Song J. W., Cho M. C., Yang E. Y., Lee J. G.: Agronomy 10, 1627 (2020).

V. Berková^a, L. Štěpánková^a, P. Čičmanec^a, M. Berka^a and L. Frejlichová^b (^aDepartment of Molecular Biology and Radiobiology, ^bMendeleum – Department of Genetics, Brno, Czech Republic): **Methodology for Determination of the Total Amount of Phenolic Substances, Flavonoids and Antioxidant Capacity of Plant Samples using Combined Extraction**

Although multiple methodologies are used to determine antioxidant parameters in plants, most studies use separate extractions for each type of the determination. The aim of this work was to specify detailed methodology able to analyse the total amount of phenolic and flavonoid compounds and total antioxidant capacity from one sample using a microtitration plate format to minimize the sample consumption. In addition to that, the described extraction procedure and the decreased sample consumption enable one to make complementary analyses and a closer characterization of the composition of plant samples. The extract can be used for subsequent targeted analyses, which was demonstrated by the determination of selected flavonoids using GC-MS analysis, which confirmed the results of spectrophotometry. The described combined extraction of plant samples facilitates complex analyses, reduces the amount of starting material and enables the subsequent analysis of biomolecules.

Keywords: antioxidant capacity, phenolic compounds, flavonoids, reactive oxygen species, abiotic stress

Acknowledgements

This work was supported by the Internal Grant Schemes of Mendel University in Brno. Reg. no. CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016670, funded by the ESF.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

HROMADNÝ OTEVŘENÝ ONLINE KURZ „VÝZNAM RADIOCHEMIE PRO NAŠI SPOLEČNOST“

ANU AIRAKSINEN^a, FRANCESCA CONCIA^b, SUDEEP DAS^a, PETR DISTLER^c, JAN JOHN^c, ELENA MACERATA^d, MARIO MARIANI^b, EROS MOSSINI^d, MADDALENA NEGRIN^d, MOJMÍR NĚMEC^c, VIVIEN POTTGIEBER^e, TEODORA RETEGAN^f, MARKO ŠTOK^g, MILADA TEPLÁ^h a CLEMENS WALTHER^e

^a Department of Chemistry, University of Helsinki, A.I. Virtasen aukio 1, 00560 Helsinki, Finland, ^b METID, Politecnico di Milano, Piazza L. da Vinci, 32, 20133 Milano, Italy, ^c Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská ČVUT, Břehová 7, 115 19 Praha 1, ^d Department of Energy, Politecnico di Milano, Piazza L. da Vinci 32, I-20133 Milano, Italy, ^e Institute of Radioecology and Radiation Protection, Leibniz Universität Hannover, Herrenhäuser Str. 2, Gebäude 4113, 30419 Hannover, Germany, ^f Division of Nuclear Chemistry and Industrial Materials Recycling, Department of Chemistry and Chemical Engineering, Chalmers University of Technology, Kemigården 4, 412 96 Gothenburg, Sweden, ^g Department of Environmental Sciences, Jožef Stefan Institute, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenia, ^h Katedra učitelství a didaktiky chemie, Přírodovědecká fakulta UK, Albertov 6, 128 00 Praha 2
petr.distler@ffj.cvut.cz

Došlo 13.2.23, přijato 14.9.23.

Hromadný otevřený online kurz „*Essential radiochemistry for society*“ představuje moderní formu vzdělávání. Díky poutavému designu, pestrému obsahu a interaktivnímu charakteru má potenciál oslovit různé zájmové skupiny. Tematicky je kurz rozdělen do pěti týdnů: Radiochemie a životní prostředí, zdraví, průmysl, jaderná energetika a společnost. Kromě radiochemie a jaderné chemie, které jsou základem kurzu, lze nalézt přímé vztahy k biologii, fyzice, ekologii nebo umění a kultuře. Kurz je ucelený, účastník může nastudovat jen vybrané kapitoly nebo celý kurz zcela samostatně. Pro pedagogy byla sestavena doporučení a tipy na efektivní využití kurzu ve výuce.

Klíčová slova: radiochemie, jaderná chemie, hromadný otevřený online kurz

1. Vzdělávání a potřeby trhu práce v oblasti jaderné chemie a radiochemie

Obory STEM (Science, Technology, Engineering, and Mathematics) se dlouhodobě potýkají s malým zájmem a zároveň i s vysokým počtem studentů, kteří studium předčasně ukončí¹. To úzce souvisí i se specializovanými jadernými obory, ve kterých je nedostatek odborných pracovníků, kteří by měli zajistit nejenom provoz jaderných elektráren, jejich následné vyřazení z provozu, vývoj nových typů reaktorů, nakládání s vyhořelým jaderným palivem, ale i odborníky pro neenergetické oblasti (např. nukleární medicína, radioekologie nebo archeologie)². Jednou z evropských iniciativ, která se snaží současnou situaci zlepšit, je série evropských projektů *Cooperation In Education and Training in Nuclear and RadioChemistry* (CINCH). Projekty se zaměřují na zlepšení vzdělávání v oblasti radiochemie a jaderné chemie včetně podchycení zájmu o tyto vědní obory již u středoškolských žáků a vytvoření moderních učebních materiálů a nástrojů pro studenty vysokých škol³.

V rámci projektu CINCH byl vytvořen a pilotován kurz MOOC (Massive Open Online Course, název bývá překládán do českého jazyka jako *hromadný otevřený online kurz*) nazvaný „*Essential radiochemistry for society*“ („*Význam radiochemie pro naši společnost*“) a nyní běží třetí ročník⁴. Připomeňme, že radiochemie je vědní disciplína, která využívá chemické poznatky a metody ke studiu radioaktivity a vlastností radioaktivních látek, stejně tak jako i radionuklidy při zkoumání vlastností chemických. Je součástí jaderné chemie, která je definována jako „*vědní obor, který se zabývá vlastnostmi hmoty a jevy chemické a fyzikálně-chemické povahy, jejichž původcem je nebo na nichž se podílí jádro atomu*“⁵.

2. Principy hromadného otevřeného online kurzu

MOOC kurzy patří k jedné z forem celoživotního vzdělávání. Na jednom místě poskytují kompletní informace o studované problematice, jsou dostupné z celého

světa, zpravidla zdarma (někdy bývá zpoplatněn certifikát o ukončení kurzu) a umožňují aktivní účast včetně diskuse na fóru s ostatními účastníky a tvůrci kurzu. Poslední ze zmíněných charakteristik, tedy vtažení do učebního procesu, by měla zvyšovat pravděpodobnost úspěšného ukončení kurzu⁶. Přesto úspěšnost dokončení MOOC kurzů bývá kolem 10 %. Mezi hlavní faktory, způsobující toto nízké číslo, patří:

- obtížnost kurzu (neměl by být ani lehký, ani těžký),
- nenaplnění očekávaného obsahu,
- jazyková bariéra (může způsobit neporozumění připraveným studijním materiálům),
- absence prezenčního kontaktu s vyučujícím.

Důležitým faktorem, který může mít zároveň motivační i demotivační charakter dle povahy účastníka, je, že si organizuje své učení – postup v jednotlivých týdnech a modulech – dle svých možností⁷. Každý kurz trvá zpravidla několik týdnů, v rámci kterých bývá často rozdělen na dílčí témata/části.

3. Struktura a obsah MOOC kurzu *Význam radiochemie pro naši společnost*

Proces tvorby MOOC začal analýzou cílové skupiny a jejich potřebami, výběrem témat, stanovením výukových cílů, určením osvojených znalostí a dovedností účastníků včetně kritérií splnění již zmíněných cílů. Poté následovala příprava podkladů, nahrávání videí a finalizace studijních materiálů. Každý z modulů připravili akademičtí pracovníci, řešící současné vědecké výzvy, grafici a pracovníci natáčecího studia a v neposlední řadě podpůrný pedagogický tým.

Tabulka I
Témata kurzu „*Význam radiochemie pro naši společnost*“

Týden 1	Radiochemie a životní prostředí
Přírodní radioaktivita	
Antropogenní radioaktivita	
Náprava životního prostředí kontaminovaného radionuklidy	
Týden 2	Radiochemie a zdraví
Nukleární medicína	
Sterilizace ionizujícím zářením	
Týden 3	Radiochemie a průmysl
Využití stopovačů v průmyslu	
Radiační technologie	
Týden 4	Radiochemie a jaderná energetika
Přepřacování vyhořelého jaderného paliva	
Nakládání s radioaktivním odpadem	
Vyřazování jaderných zařízení z provozu	
Týden 5	Radiochemie a společnost
Kulturní dědictví	
Jaderná forenzní analýza a nešíření jaderných zbraní	

3.1. Struktura MOOC kurzu *Význam radiochemie pro naši společnost*

MOOC „*Význam radiochemie pro naši společnost*“ je rozdělen do pěti týdnů, které mají jasně demonstrovat odvětví, jež se bez znalostí a využití radiochemie neobejdou, a dvanácti témat (tab. I). Celkem bylo vytvořeno 152 lekcí. Ty jsou založeny na 52 videích, 23 infografikách, 33 článcích, 34 průběžných kvízech, doplňujících odkazech na zajímavé stránky pro zájemce a závěrečných testech. Cílovou skupinou zmíněného kurzu MOOC jsou bakalářští studenti přírodních věd (chemie, fyzika, biologie), technických oborů nebo medicíny. Přesto může najít své využití i v posledních ročních středních škol nebo i při kurzech celoživotního vzdělávání. Cílem kurzu MOOC je zvýšení povědomí o využití radiochemie a jejím praktickém dopadu na náš každodenní život, probuzení zájmu o tento obor u žáků i studentů včetně následného studia na vysoké škole a snižování miskoncepce a strachu, které v souvislosti s daným oborem panují mezi veřejností³.

Pro všech 12 připravených témat je typická následující struktura: První část lekce je krátké animované video zobrazující situaci z běžného života, která na první pohled vůbec nemusí s radiochemií souviset. Druhá lekce je stejné video, akorát je okomentováno, kde a jak jsou radionuklidy, resp. radioaktivita přímo spojené s danou situací. V této části nejsou účastníkovi vysvětlována teoretická východiska nebo principy, cílem je pouze zdůraznit význam radiochemie v dané situaci a stimulovat pro samostudium dalších lekcí. Tato část nevyžaduje odborné znalosti, a proto může být pochopitelná a zajímavá i pro širší veřejnost.



Obr. 1. Ukázka tepelného řezání z lekce „Vyřazování jaderných zařízení z provozu“

Třetí lekce již přináší přehled celého modulu a vysvětluje první pojmy důležité pro pochopení připravených témat a konceptů. V rámci dalších lekcí jsou už systematicky definovány a na konkrétních příkladech představeny pojmy a principy. Vše je doplněno fotografiemi, obrázky (ukázka na obr. 1), schémata, tabulkami nebo grafy, sloužícími nejenom pro lepší vysvětlení pojmů, ale i zatraktivnění materiálů.

Pro účastníky jsou připraveny průběžné kvízy, při jejichž řešení si ověří pochopení představených témat, pojmů a principů, a získají okamžitou zpětnou vazbu o porozumění dané části. Pro zodpovězení otázky má účastník zpravidla více pokusů, aby se mohl sám znovu zamyslet nad správnou odpovědí a korigoval svou původní

odpověď. Otázky jsou stejné pro všechny účastníky a při špatné odpovědi se jejich znění nemění. Pro zájemce je navíc připravena stránka s odkazy na volně dostupné materiály, které ještě více prohloubí studovanou problematiku a znalosti v oblasti radiochemie. U dílčích otázek závěrečného testu se okamžitě zobrazí vyhodnocení odpovědi a v případě chybně vybraných možností má účastník šanci na opravu. Práce s chybou je zde vnímána jako přirozená část učení (se). Pro získání osvědčení o úspěšně zakončeném kurzu MOOC je třeba získat 60 % bodů ze závěrečných testů. Ukázka osvědčení je na obr. 2.

Všechny materiály jsou vytvořeny v anglickém jazyce. Jak je ukázáno na obr. 3, v případě videa je vždy mluvené slovo převedeno do psaného textu v pravém sloupci, což napomáhá pochopení a účastník si může v případě potřeby neznámé slovo vyhledat. V následujícím textu bude stručně představen obsah rozčleněný do pěti týdnů.

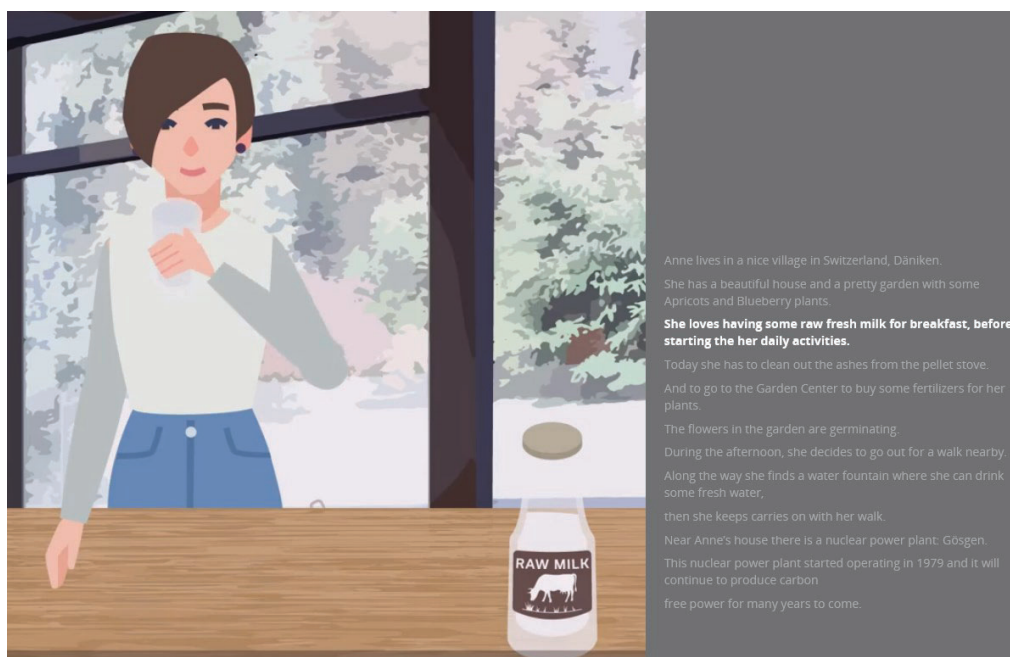
3.2. Obsah MOOC kurzu *Význam radiochemie pro naši společnost*

Radiochemie a životní prostředí

První týden připomene účastníkům stavbu atomu a jádra, seznámí ho s přirozenou radioaktivitou a definicemi základních pojmů (modul 1 je rozepsán později podrobněji). Stručně seznámí s jaderným palivem, principy radiochemických separačních metod a představí interakci ionizujícího záření s hmotou. Prostor je věnován i principu detekce ionizujícího záření. Zajímavé jsou i články o vztahu radioaktivity a těžby ropy a zemního plynu nebo výroby fosforečných hnojiv, nebo video



Obr. 2. Ukázka osvědčení po úspěšném zakončení kurzu MOOC



Obr. 3. Ukázka úvodního animovaného videa z lekce „Antropogenní radioaktivita“ včetně přepisu mluveného slova

o stanovení ^{90}Sr v mléce. Poslední část se zaměřuje na odstraňování radionuklidů ze životního prostředí, např. po radiačních haváriích v Černobylu nebo Fukušimě, po spalování uhlí v tepelných elektrárnách nebo po těžbě kovů v povrchových dolech.

Radiochemie a zdraví

Druhý týden se zaměřuje na benefity radiochemie pro lidské zdraví. Hlavní pozornost je věnována nukleární medicíně – při diagnostice (např. pozitronová emisní tomografie s využitím ^{18}F -fluorodeoxyglukosy, nebo využití $^{99\text{m}}\text{Tc}$) i terapii (např. ^{131}I), nebo jak funguje příjem a pobyt pacienta na klinice nukleární medicíny. Je vysvětleno, jaký typ záření se používá při diagnostice, jaký při terapii, způsob výroby využívaných radionuklidů na cyklotronech nebo v jaderných reaktorech, důležitost poločasu přeměny použitého radionuklidu a principy zobrazovacích metod. Druhá část je věnována využití ionizujícího záření při sterilizaci a jsou porovnány jeho výhody s chemickou a fyzikální sterilizací. Jedná se o využití při procesech jako např. ničení mikrobů, sterilizace chirurgických nástrojů nebo zlepšení kvality a trvanlivosti potravin.

Radiochemie a průmysl

Třetí týden je věnován méně známým, ale přesto důležitým aplikacím – např. jak využití radionuklidů může pomoci zvýšit úrodu v zemědělství, objasnit fungování buněk a tkání v našem těle, nebo mapovat pohyb polutantů v životním prostředí. Samostatnou kategorií je využití radionuklidů ve stopových množstvích v průmyslu při monitorování různých procesů, detekcích netěsností např.

u potrubí, nebo analýzy průtoků tekutin. Nechybí ani přehled nejdůležitějších radionuklidů, jejich příprava a využití v průmyslových aplikacích. Vhodné radionuklidy mohou být využity i ke sledování pohybu a akumulace těžkých kovů nebo organických látek ve vodách i živých organismech. Jako zajímavost je popsán záchyt kontaminantů z průmyslu nebo zemědělství v mořských organismech a následný potravní řetězec vedoucí až k produktům – potravinám, které konzumujeme.

Radiochemie a jaderná energetika

Známější využití radiochemie v jaderné energetice je představeno ve čtvrtém týdnu. Začíná se od přírodních jaderných reaktorů v africkém Oklu, poté je probrán palivový cyklus, možnosti přepracování a ukládání vyhořelého jaderného paliva. Jsou představeny i různé typy reaktorů, paliva, princip fungování jaderné elektrárny a hlubinného úložiště radioaktivního odpadu. V neposlední řadě je účastník seznámen s principy vyřazování jaderných zařízení z provozu, protože se jedná o potřebné a aktuální téma. Ukázka z této části je na obr. 1 a rádi bychom zmínili, že před třemi lety byl otevřen i nový studijní obor „Vyřazování jaderných zařízení z provozu“ na ČVUT v Praze⁸.

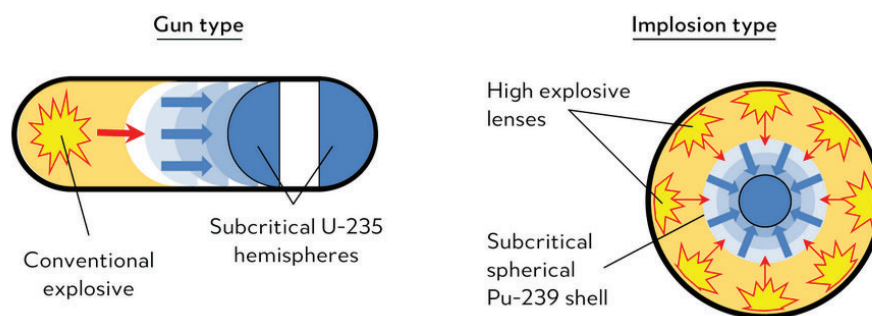
Radiochemie a společnost

V poslední části jsou uvedeny zajímavé příklady aplikace nedestruktivních technik radiochemie v archeologii (radiouhlíkové datování), v památkové péči (konzervace a restaurování) nebo umění obecně (ověřování pravosti děl, určení místa vzniku nebo použitých materiálů). V této

Design of atomic bombs

In order to ensure controlled release of energy, an atomic bomb must be designed in such a way that the nuclear chain reaction cannot begin before the intended ignition. To achieve criticality of initially sub-critical masses of U-235 or Pu-239, two different designs were developed: gun type and implosion type.

In the gun type, the nuclear chain reaction is started by shooting a subcritical hemisphere with a normal explosive onto another hemisphere to get a critical sphere. In the case of the implosion type, a subcritical spherical shell is compressed by explosive lenses to reach criticality.



Obr. 4. Ukázka části infografiky z lekce „Jaderná forenzní analýza a nešíření jaderných zbraní“

části jsou také popsány různé metody studia materiálů, založené např. na rentgenové fluorescenční spektrometrii nebo neutronové aktivační analýze. Závěrečná část představuje „jadernou detektivku“, neboli pátrání po příčinách přítomnosti radioaktivních látek (např. v životním prostředí, kam se mohly dostat z farmaceutického závodu, jaderné elektrárny nebo výzkumného zařízení) s využitím jaderných forenzních technik. Jak je ukázáno na obr. 4, součástí tohoto modulu jsou i jaderné zbraně, jejich vztah k těmto speciálním metodám včetně informací o dohodách o nešíření jaderných zbraní.

4. Vybrané závěry z pilotáže kurzu MOOC

Úvodní pilotáže kurzu se zúčastnilo přes 200 zájemců z 20 různých zemí. Z detailnější zpětné vazby byly vyhodnoceny získané znalosti (nejen formou testu, ale i subjektivních tvrzení „osvojil jsem si dostatečné znalosti, abych toto téma dokázal vysvětlit dalším lidem“/„rozumím hlavním tématům a obecným situacím s ním spojených“ nebo „znám pouze některá z hlavních témat“), byla detekována náročná témata a části (např. téma zpracované do podoby infografiky u obtížnějších témat, příliš hutné texty s přemírou odborné terminologie, nebo nedostatečně vysvětlené termíny), a v neposlední řadě byly zaznamenány četné kladné ohlasy (např. pestrost materiálů, kvalita videí, průběžné kvízy na ověření pochopení a aplikací znalostí). Po vyhodnocení získané zpětné vazby lze konstatovat, že navržený kurz je efektivní a uživatelsky zajímavý. Průměrná doba řešení celého kurzu studenty vysoké školy byla kolem 30 hodin.

5. Možnosti využití kurzu ve vzdělávání v prostředí české školy

Bez ohledu na typ školy či osobní zájem o absolvování celého kurzu nebo vybraných částí, doporučujeme zájemcům projít prvním modulem *Natural radioactivity* (Přirozená radioaktivita), kde je představena radiochemie, jádro atomu, druhy radioaktivních přeměn a jejich charakteristika, zákon radioaktivní přeměny a přeměnové řady, a další koncepty, které pomohou pochopit následující témata. V této kapitole je zmíněna i problematika radonu, která je v České republice velmi aktuální. Radon přispívá z 50 % k celkovému ozáření české populace, v rámci přírodních zdrojů ionizujícího záření vykazuje dokonce 70% podíl⁹.

V rámci středoškolské výuky byl kurz ověřen v průběhu prezenční výuky i v rámci samostudia v chemickém semináři s žáky 6. a 7. ročníku osmiletého gymnázia. Úvodní modul žákům trval přibližně dvě hodiny. Při využití kurzu MOOC žáci vyzdvihli zejména přehlednou orientaci v celém kurzu, pestré materiály, zajímavé odkazy a možnost zvětšování obrázků/grafů pro lepší prostudování a pochopení. Pokud se v průběhu studia objevil obtížný pojem, tak byl dle slov žáků brzy vysvětlen. Ocenili i průběžné kvízy poskytující průběžnou zpětnou vazbu. Jako náročnou složku označili, že někdy bylo až moc nových informací a pojmů. To může být vyřešeno rozdělením času práce na MOOC do více kratších intervalů, aby si žáci mohli pojmy lépe zafixovat, promyslet a pochopit. U některých videí bylo náročné porozumět mluvenému textu; tuto obtíž žáci řešili s využitím transkriptu a překladem/vyhledáním neznámých slov. Závě-

rem bychom doporučili vést žáky k psaní drobných poznámek během práce na MOOC. Ty žákům pomáhaly v lepší orientaci v tématu a vzhledu do prezentovaných zákonitostí.

Na vysoké škole doporučujeme využít kurz při kombinovaném vzdělávání, tedy v rámci samostudia zadat studentům k nastudování konkrétní téma(ta), která budou následně během prezenční výuky společně diskutována nebo budou studenti řešit problémové úlohy založené na osvojených znalostech z kurzu MOOC (model převrácené třídy, flipped classroom). Tento model byl úspěšně ověřen na vybraných lekcích s bakalářskými studenty 1. ročníku oboru jaderná chemie v předmětu Obecná chemie. Druhou možností je osvojení problematiky (např. vybrané radioanalytické metody) před vstupem do radiochemického praktika. Před započítáním laboratorní práce pak mohou být studenty prozkoušeni z porozumění tématu a principů (blended-learning, termín se do češtiny zpravidla nepřekládá). Tento způsob šetří čas, finance i odborné kapacity pedagogů, kteří nemusí teoretická východiska vysvětlovat před každým během praktika.

6. Závěr

Představený kurz MOOC nazvaný „*Essential radiochemistry for society*“ představuje moderní formu vzdělávání a je zdarma přístupný pro všechny zájemce z celého světa, tedy i pro české žáky, studenty, pedagogy i odbornou veřejnost. Díky poutavému designu, pestrému obsahu a interaktivnímu charakteru má potenciál oslovit různé zájmové skupiny. Kromě (radio)chemie, která je základem kurzu, lze nalézt vztahy k biologii, fyzice, ekologii nebo umění a kultuře. Kurz je ucelený, účastník může nastudovat vybrané kapitoly nebo celý kurz zcela samostatně. Na základě pilotáže byla pro pedagogy českých škol sestavena doporučení, jak s kurzem MOOC ve výuce efektivně pracovat. Pro další zatraktivnění kurzu jsou průběžně organizovány a následně zveřejněny speciální webináře s předními odborníky v radiochemii¹⁰.

Tvorba příspěvku byla podpořena grantovým projektem Horizon 2020 (MEET-CINCH, 754972, a A-CINCH, 945301).

LITERATURA

1. Van der Hurk A., Meelissen M., van Langen A.: *Int. J. Sci. Educ.* 41, 150 (2019).
2. Perna J., Law G. T. W., Ranjan S.: *J. Chem. Educ.* 98, 426 (2021).
3. Němec M., Distler P., John J.: *Jaderná energie/Jadrová energia* 2(67/4), 32 (2021).

4. https://www.pok.polimi.it/courses/course-v1:Polimi+ERS101+2023_M8/about, staženo 8. 1. 2023.
5. Majer V.: *Základy jaderné chemie*. 2. vyd. SNTL – Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1981.
6. Baturay M. H.: *Procedia Soc. Behav. Sci.* 174, 427 (2015).
7. Eriksson T., Adawi T., Stöhr Ch.: *J. Comput. High Educ.* 29, 133 (2017).
8. <https://www.fjfi.cvut.cz/cz/studium/bakalarske-studium/studijni-programy/vyrazovani-bc-aktualni>, staženo 13. 1. 2023.
9. <http://www.radonovyprogram.cz>, staženo 30. 12. 2022.
10. <https://www.youtube.com/@cinchtalks2858>, staženo 27. 12. 2022.

A. Airaksinen^a, F. Concia^b, S. Das^a, P. Distler^c, J. John^c, E. Macerata^d, M. Mariani^b, E. Mossini^d, M. Negrin^d, M. Němec^c, V. Pottgießer^e, T. Retegan^f, M. Štrok^g, M. Teplá^h, and C. Walther^e (^aDepartment of Chemistry, University of Helsinki, Finland, ^bMETID, Politecnico di Milano, Italy, ^cDepartment of Nuclear Chemistry, CTU in Prague, Czech Republic, ^dDepartment of Energy, Politecnico di Milano, Italy, ^eInstitute of Radioecology and Radiation Protection, Leibniz Universität Hannover, Germany, ^fDivision of Nuclear Chemistry and Industrial Materials Recycling, Chalmers University of Technology, Sweden, ^gDepartment of Environmental Sciences, Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia, ^hDepartment of Chemistry Education, Charles University, Czech Republic): **Massive Online Open Course „Essential Radiochemistry for Society“**

The massive open online course "Essential radiochemistry for society" represents a modern form of education. Due to its attractive design, varied content and interactive nature, it has the potential to appeal to various interest groups. Thematically, the course is divided into five weeks: Radiochemistry for the environment, health, industry, nuclear energy and society. In addition to radiochemistry and nuclear chemistry, which are the basis of the course, direct connections can be found to biology, physics, ecology, art and culture. The course is comprehensive; a participant can study only selected chapters or the entire course independently. Recommendations and tips for effectively using the course in classes have been compiled for teachers and lecturers.

Keywords: radiochemistry, nuclear chemistry, massive open online course



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.



Česká společnost chemická, Sekretariát a redakce Chemických listů
Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1
tel.: 221 082 383, redakce tel. 221 082 370
e-mail: chem.spol@csvts.cz
<http://www.csch.cz>

Členské služby a výhody | Česká společnost chemická

Zapojení v České chemické společnosti, členu Asociace českých chemických společností, EuCheMS, ECTN-A a ČSVTS přináší individuálním chemikům, kromě vlastního členství v největší a nejstarší české profesní organizaci chemiků (zal. 1866):

ROZŠÍŘTE SVÉ KONTAKTY

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCh,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění,...
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC, a z toho plynoucí sleva u nakladatelství Blackwell a na konferencích sponzorovaných IUPAC, členové IUPAC dostávají časopis Chemistry International,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.),

ZÚČASTNĚTE SE NÁRODNÍCH SJEZDŮ

- možnost zúčastnit se národních sjezdů s významnou slevou pro členy, které jsou pořádány každoročně, jednou na Slovensku jednou v ČR,

ZLEPŠETE SVOJI INFORMOVANOST

- možnost dostávat 4x ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů v tištěné či elektronické podobě,
- možnost dostávat 4x ročně, cestou elektronické pošty, členské upozornění na nejdůležitější události a aktuality,
- volný přístup k členskému magazínu ChemViews (<http://www.chemistryviews.org/>), jehož je ČSCh spoluvlastníkem, a to i na vašem mobilním telefonu apod.,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě,
- informace o dění v evropských strukturách, jako např. EuCheMS, ECTN, EC2E2N a podobně,
- přístup k elektronickým informačním médiím Společnosti,
- volný přístup k tištěným verzím časopisů ChemPubSoc Europe v „knihovně ČSCh“, kterou po dohodě s PřF UK Praha zřídila ČSCh v Knihovně chemie (sídlicí v budově Hlavova 8/2030, Praha 2, Albertov, přízemí, v místnostech č. 148, 149, 150).

ZAPOJTE SE DO ŘEŠENÍ GRANTŮ EU

- možnost participovat na řešení grantů s evropskými partnery, jako např. ECTN a partnerskými národními společnostmi.

UŠETŘETE PENÍZE

- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCh,
- významnou slevu (ca 90 %) na předplatné časopisu Chemistry – A European Journal, a dalších evropských časopisů konsorcia ChemPubSoc Europe, jichž je ČSCh spolumajitelem,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCh,
- slevu při zapůjčení automobilu (až 35 %) u společností AVIS a HERTZ na celém světě, kromě Austrálie, a použití těchto automobilů na akcích v ČR za speciální tarify,
- sleva 20 % z publikačních poplatků v časopise ChemOpenChem, který společnost spoluvlastní.

ZDŮRAZNĚTE SVOJI PROFESIONALITU

- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu EurChem, platného v celé EU,

BUĎTE VIDĚNI

- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- a řadu dalších služeb, které se teprve sjednávají,

PRO FIRMY A PODNIKATELE

- Firmám, podnikům, institucím a dalším právnickým osobám nabízí ČSCh mimo jiné i tzv. „kolektivní členství“, při kterém se ve vzájemné smlouvě sjedná to, čím mohou pomoci jedna strana druhé. Podrobnosti na dotaz.

OBSAH

ÚVODNÍK	
75. sjezd chemických společností	669
T. Navrátil	
REFERÁTY	
O oddělení a posílení obrazu za zrcadlem (deracemizace a amplifikace chiralita)	671
M. Jurášek, B. Kratochvíl, M. Kohout, F. Švec a P. Drašar	
Vitamin E – doporučený a skutečný příjem	677
M. Sabolová, J. Fišnar a Z. Réblová	
Určení poloh násobných vazeb v lipidech pomocí hmotnostní spektrometrie. Část I	684
Š. Strnad, V. Vrkoslav a J. Cvačka	
PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE	
Chemiluminiscenční a fotometrická analýza matrix Gla proteinu u pacientů s onemocněním pohybového aparátu	694
M. Barna, J. Čepová, K. Dunovská, J. Petrus, P. Melicherčík, R. Průša, R. Kizek a E. Klapková	
Metodika pro stanovení celkového množství fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacity rostlinných vzorků pomocí kombinované extrakce	701
V. Berková, L. Štěpánková, P. Čičmanec, M. Berka a L. Frejlichová	
VÝUKA CHEMIE	
Hromadný otevřený online kurz „Význam radiochemie pro naši společnost“	708
A. Airaksinen, F. Concia, S. Das, P. Distler, J. John, E. Macerata, M. Mariani, E. Mossini, M. Negrin, M. Němec, V. Pottgießer, T. Retegan, M. Štok, M. Teplá a C. Walther	

CONTENTS

EDITORIAL	
75th Meeting of Chemists	669
T. Navrátil	
REVIEW ARTICLES	
On the Separation and Strengthening of the Image Behind the Mirror (Deracemization and Chirality Amplification)	671
M. Jurášek, B. Kratochvíl, M. Kohout, F. Švec, and P. Drašar	
Vitamin E – Recommended and Actual Intake	677
M. Sabolová, J. Fišnar, and Z. Réblová	
Location of Double or Triple Bonds in Lipids Using Mass Spectrometry, Part I	684
Š. Strnad, V. Vrkoslav, and J. Cvačka	
ORIGINAL AND METHODOLOGICAL PAPERS	
Chemiluminescent and Photometric Analysis of Matrix Gla Protein from Patients with a Defect of Musculoskeletal System	694
M. Barna, J. Čepová, K. Dunovská, J. Petrus, P. Melicherčík, R. Průša, R. Kizek, and E. Klapková	
Methodology for Determination of the Total Amount of Phenolic Substances, Flavonoids and Antioxidant Capacity of Plant Samples Using Combined Extraction	701
V. Berková, L. Štěpánková, P. Čičmanec, M. Berka, and L. Frejlichová	
EDUCATION IN CHEMISTRY	
Massive Online Open Course „Essential Radiochemistry for Society“	708
A. Airaksinen, F. Concia, S. Das, P. Distler, J. John, E. Macerata, M. Mariani, E. Mossini, M. Negrin, M. Němec, V. Pottgießer, T. Retegan, M. Štok, M. Teplá, and C. Walther	

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 117 (2023), čís./no. 11 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 147, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 133 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUČÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTORI/EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA, ČR) • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Rápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffner, J. Hanika, Z. Havlas, M. Hof, Z. Hostomský, J. Káš, M. Koman, P. Konvalinka, J. Kotek, J. Koubek, J. Málek, P. Matějka, K. Melzoch, V. Pačes, M. Pospíšil, V. Růžička, P. Slaviček, I. Stibor, J. Zima, T. Zima • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného Lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 221 082 383, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 • Cena výtisku 180 Kč, roční plně předplatné 2023 (12 čísel) 1810 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 900 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 96 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 73 EUR (doručování via SCHS), 96 EUR + poštovné (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG • Pokyny pro autory najdete na <http://www.chemicke-listy.cz>, zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz <http://cassi.cas.org/search.jsp>) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: V. Spiwok • Dáno do tisku 30.10.2023.



ÚOCHB ^{AV}_{ČR}
IOCB PRAGUE

Podcast ÚOCHB
CHEmic

O životě vědců a vědkyň
nejen v laboratoři

Poslouchejte v podcastových aplikacích



www.uochb.cz



[iocbprague](https://www.instagram.com/iocbprague)



[IOCBPrague](https://www.facebook.com/IOCBPrague)

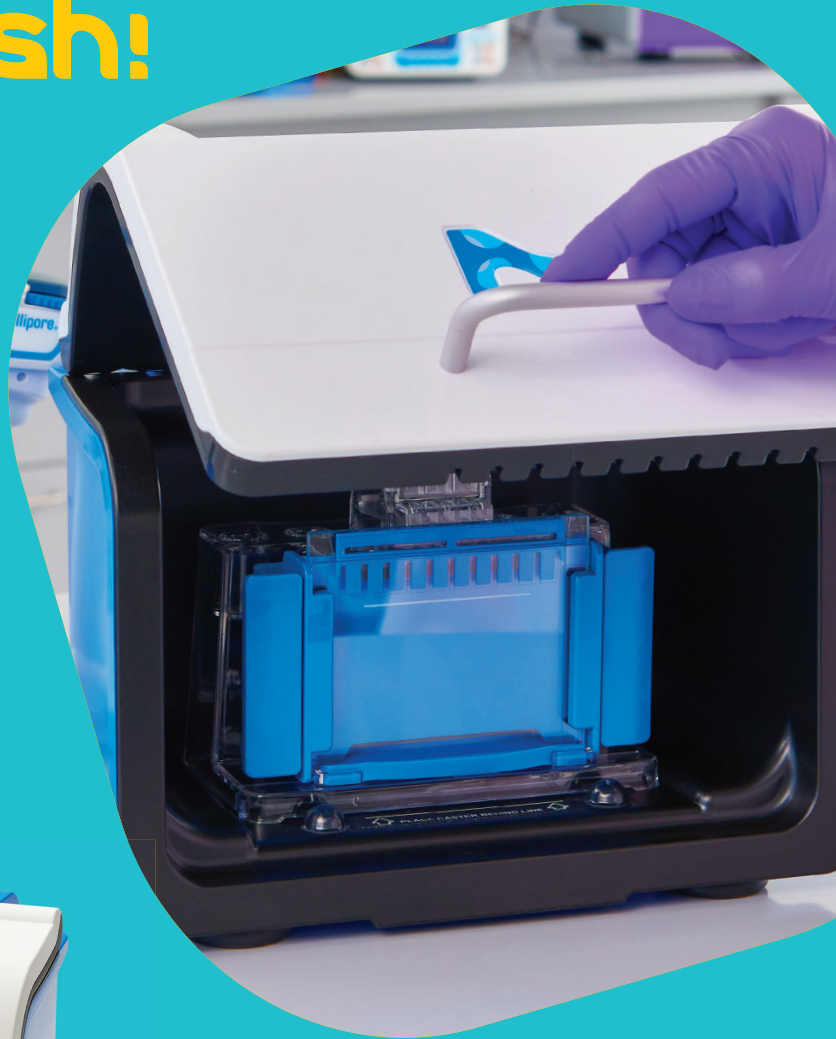
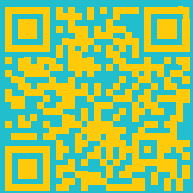
GELS in 3 Minutes? That's fresh!

Take control of your day and discover the **mPAGE® Lux Casting System** for preparation of ready-to-use bis-tris protein gels in just 3 minutes.

mPAGE® Lux Casting System replaces your traditional gel casting process with a simpler and safer method with more reproducible results. Take a breath and get used to an ultra-fast gel casting process with less waste, less toxic chemicals and without the worry of failure. Ask us for more and book your demo soon.

Learn more at

SigmaAldrich.com/mPAGELux



The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada

Millipore®

Preparation, Separation, Filtration & Monitoring Products