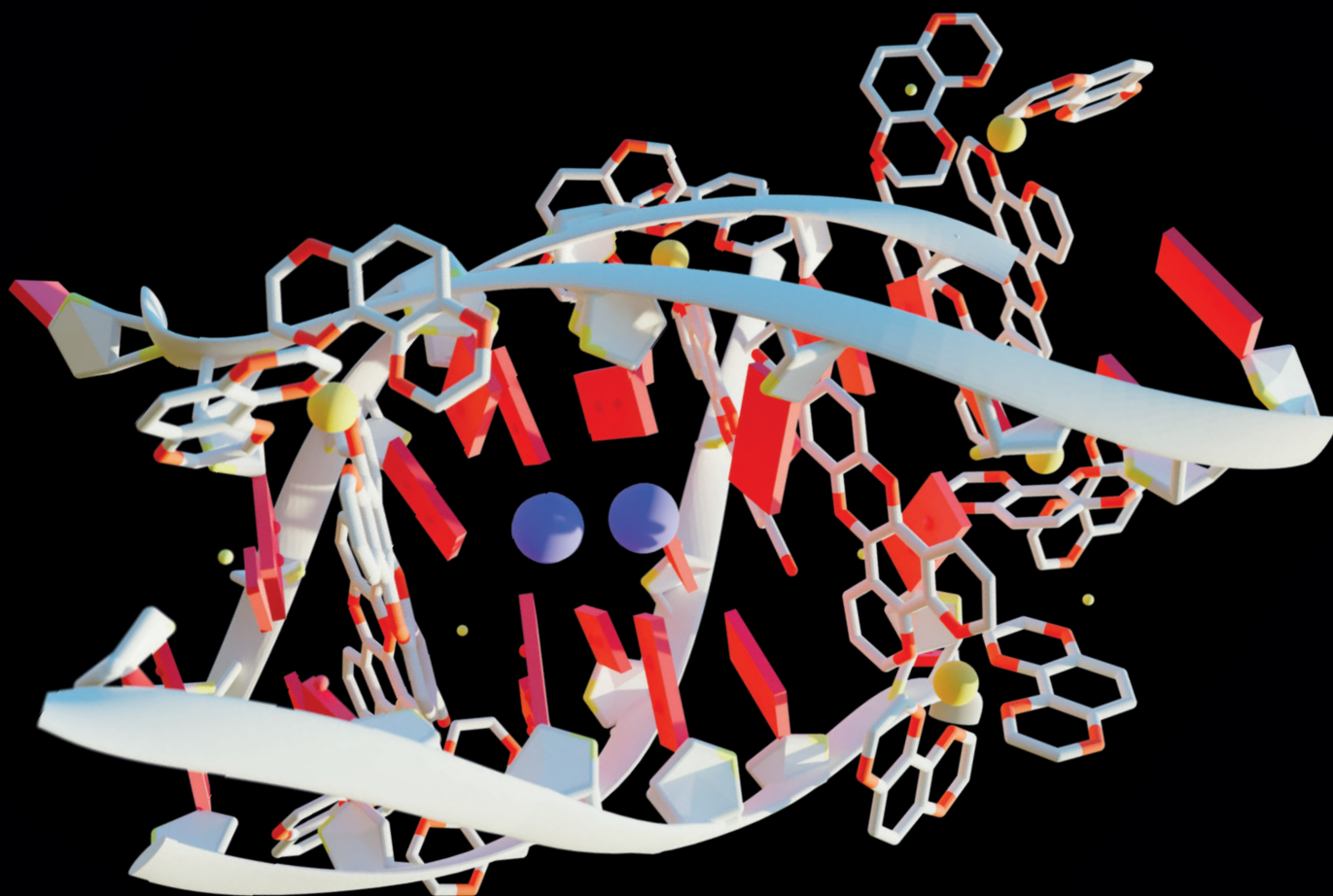


# Chemické Listy

# 2

ročník • 118



Betulininy v syntéze léčivých látek

Biotechnologická výroba butanolu

Analýza organofosfátů

Spektrofotometrie pigmentů





MESSE  
MÜNCHEN

# What will be possible in the laboratory of the future.

Lab trends, innovations & know-how

Svět laboratoří se rychle rozvíjí – a na veletrhu analytica budete v centru tohoto pokroku. Přední světový veletrh pro laboratoře, technologie, analýzy a biotechnologie nabízí kompletní přehled trhu na výstavní ploše 55 000 m<sup>2</sup>: Seznamte se s lídry trhu a odborníky, objevte svět novinek a najdete optimální řešení pro vaše potřeby!



**analytica**

we create lab

duben 9.–12. 2024

[analytica.de](https://www.analytica.de)

## Od přirozeného k umělému

Frekvence užívání přídavného jména „umělý“ v posledním období – zejména díky umělé inteligenci – výrazně vzrostla. Obsahem pojmu umělý je zřejmě vlastnost, která vznikla na základě vědomého zásahu člověka a nikoliv přírodním (přirozeným) děním. Využití tohoto slova k popisu skutečnosti je velmi široké. Můžeme tak použít spojení umělá kvočna, umělá řeč, umělá květina, umělé úsměvy politiků atd. Nabízí se úvaha, zda ono „umělé“ nezačíná v životě společnosti převládat nad tím přirozeným. Pod slovním spojením „umělá hmota“ (používání tohoto pojmu již současná norma nepřípoštlí, historicky byl odvozen z německého slova Kunststoff) si zpravidla vybavujeme chemický produkt – plast (i když např. „Umělá hmota“ je i název české undergroundové hudební skupiny).

Plasty nás doprovázejí relativně krátkou dobu, přibližně od druhé poloviny 19. století. Připomeňme si ty z nich, které současně generace již prakticky neznají, ale ve své době výrazně ovlivnily spotřebu v průmyslu i v domácnostech. Na světové výstavě v Londýně roku 1862 byla představena nová hmota, která byla pojmenována podle svého vynálezce, anglického chemika Alexandra Parkese, parkesin. Základem byl nitrát celulózy a kafr v různém poměru, dále případně modifikovaný ethanolem a barvivou. Původně nahrazoval slonovinu při výrobě kulečnickových koulí, ale začaly se z něj vyrábět i žádané ozdoby a předměty denní potřeby – např. hřebínky, obroučky brýlí atd. Na základě dalších experimentů postupně vznikl i materiál, komerčně nazvaný celulooid, který se stal důležitým východiskem pro rozvoj fotografického a filmového průmyslu. Vzpomínám si, že jako kluci jsme z filmového celulooidu připravovali „čoudáky“, což byl svitek filmu zabalený do kousku novin, zapálený a následně okamžitě zašlápnutý. Protože celulooid hoří prakticky i bez přístupu vzduchu, vyvíjel „čoudák“ k naší radosti množství bílého dýmu. Právě snadná hořlavost celulooidu ale byla příčinou řady požárů biografů po celém světě. Pod názvem galalit, který se získal reakcí kaseinu a formaldehydu, se od roku 1897 získávala nová tvrdá hmota (z řeckých slov gala

(mléko) a lithos (kámen)). Její nevýhodou bylo, že se nedala dodatečně tvarovat, ale díky její schopnosti imitovat různé materiály se uplatnila v módním a knoflíkářském průmyslu a oproti celulooidu byla nehořlavá. První kompletně syntetickým plastem byl pravděpodobně bakelit, pojmenovaný podle Leo Hendrika Baekelanda, který si jej nechal patentovat v roce 1909. Nový plast vznikl reakcí fenolu s formaldehydem, dal se tvářet i odlévat a byl dobrým izolantem. Jeho vlastnosti se ukázaly být neocenitelné pro elektrotechnický a automobilový průmysl a do padesátých let minulého století se jednalo o dominantní plast, se kterým se ještě dnes můžeme setkávat např. ve starší zástavbě (vypínače, elektrické zásuvky, dveřní kliky). S rozvojem petrochemie ovládly trh nové plasty v čele s polystyrenem, polyethylenem, polyethylentereftalátem atd. Postupně se začaly uplatňovat požadavky na přípravu materiálů s předem definovanými vlastnostmi, které by byly recyklovatelné, příp. biologicky odbouratelné.

Ač téma „umělých hmot“ je stále aktuální, ve veřejném prostoru rezonuje nyní především jako hit umělá inteligence (AI). Zdá se, že kromě velkého potenciálu přispívajícího pro další vývoj lidského společenství sebou přináší i značná nebezpečí. V řadě aspektů se jeví ekonomičtější než lidská práce a některé limity pro AI jsou zcela jině než limity pro biologickou inteligenci. Je rychlejší a využívá větší „databázi znalostí“ než lidský mozek. Odborníci ale často varují před nebezpečím AI. Jedná se např. o vytváření falešných mediálních výstupů, schopnosti generovat zákeřné kódy, prolamovat hesla apod. Tyto obavy vedly k tomu, že používání AI v Evropské unii bude upraveno takzvaným aktem o umělé inteligenci, prvním komplexním zákonem o AI na světě, který má společnost chránit před jejími negativními schopnostmi. Předpokládá se, že s rozvojem AI bude stoupat i její kreativita. V naší redakci jsme vyzkoušeli, že ta je zatím „nic moc“ (alespoň v ChatGPT), jak je možné se přesvědčit čtením úvodníku Umělá inteligence píše pro Chemické listy<sup>1</sup>, který vznikl mimo jiné po zadání statí na předem zadané téma.

Pavel Chuchvalec

## LITERATURA

1. Kratochvíl B.: Chem. Listy 117, 346 (2023).



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 jakéhokoli média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

## BETULONOVÁ A PLATANOVÁ KYSELINA JAKO ZÁKLAD PRO SYNTÉZU NOVÝCH TERAPEUTICKY ÚČINNÝCH LÁTEK

LUCIE ČERNÁ<sup>a</sup>, ZDENĚK WIMMER<sup>b</sup>, ANGELINA MASSYAGUTOVA<sup>a</sup> a PETRA LOVECKÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika,

<sup>b</sup> Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika  
Lucie4.Cerna@vscht.cz

Došlo 17.4.23, přepracováno 26.9.23, přijato 3.10.23.

Přírodní látky produkované rostlinami představují významný zdroj nových léčivých substancí. Tento článek je zaměřen na popis antimikrobiální, antivirální a cytotoxické aktivity syntetizovaných derivátů betulonové a platanové kyseliny, zejména jejich oximových derivátů. Cílem článku je poskytnout přehled zmíněných aktivit těchto derivátů a jejich možného využití v oblasti léčby infekčních či nádorových onemocnění.

**Klíčová slova:** betulonová kyselina, platanová kyselina, oximové deriváty, antivirová aktivita, antibakteriální aktivita, protinádorová aktivita

### Obsah

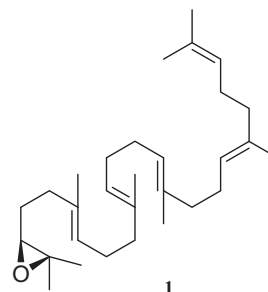
1. Úvod
2. Syntéza derivátů
3. Biologické aktivity
4. Závěr

### 1. Úvod

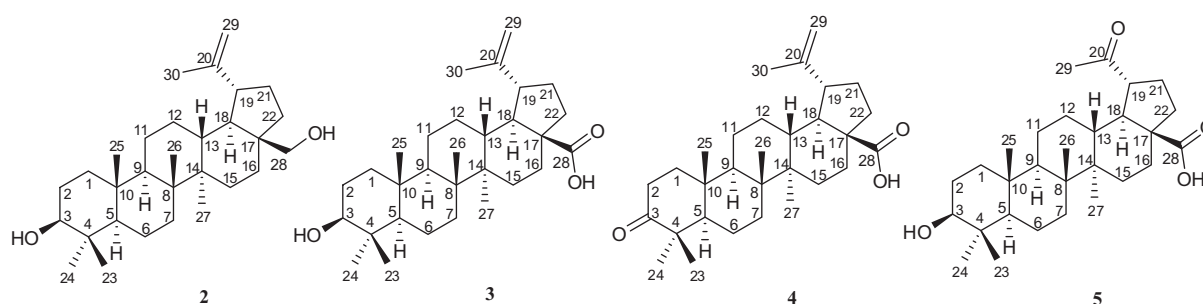
Rostliny představují rozmanitý a bohatý zdroj biologicky aktivních látek<sup>1</sup>. Léčivé rostliny byly používány již v historii v tradiční humánní medicíně<sup>2</sup>. Hlavní výhodou je, že rostliny jsou snadno dostupnými zdroji<sup>3</sup>. Příkladem může být skupina rostlinných triterpenoidů, syntetizovaná rostlinami v podobě sekundárních metabolitů<sup>3,4</sup>. Sekundární metabolity mají různé funkce a disponují velkou strukturální rozmanitostí<sup>2,3</sup>. Patří do skupiny isoprenoidů, které jsou tvořeny základní jednotkou isoprenu o pěti uhlíkových atomech a dělí se podle počtu zúčastněných jednotek ve struktuře<sup>4</sup>. Triterpenoidy (obsahují ve struktuře heteroatom, většinou kyslík) jsou klasifikovány na tetracyklické a pentacyklické<sup>2,3</sup>. Rozdělují se dále na základě jejich struktury na deriváty lupanu, oleananu nebo ursanu<sup>5</sup>. Za důležitou třídu přírodních produktů jsou považovány pentacyklické triterpenoidy<sup>6</sup>. Pentacyklické triterpeny se skládají ze šesti isoprenových jednotek, tedy ze skeletu o třiceti uhlíkových atomech. Vznikají biosyntetickou cyklizací 2,3-oxidoskvalenu (1; obr. 1) katalyzovanou oxidoskvalenylklasami nebo triterpensyntasami<sup>2</sup>.

Bylo izolováno více než 20 000 triterpenů a v rostlinách se mohou vyskytovat v jejich částech (kůra,

korok, list, ovocná slupka) ve formě volných kyselin nebo aglykonů<sup>2,3</sup>. Triterpenoidní kyseliny se v přírodních zdrojích mohou vyskytovat jako polárnější konjugáty s mono- a oligosacharidy nebo estery cukrů<sup>1</sup>. Do kategorie pentacyklických triterpenoidů lupanové struktury patří lupeol, betulin (2), betulinová (3), betulonová (4) a platanová kyselina (5) (obr. 2)<sup>3</sup>. Kůra březvy bělokore, čeleď *Betula-ceae* (*Betula alba* L., *Betula pendula*) je nejbohatším zdrojem betulinu [(3β)-lup-20(29)-en-3,28-diol]<sup>3</sup>. Betulin tvoří až 30 % březové kůry<sup>7</sup>. Dále ho lze také izolovat z hřebíčkovce (*Syzygium* z čeledi *Myrtaceae*)<sup>3</sup>. Betulinová kyselina [(3β)-3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-ová kyselina] může být také izolovaná i z jiných rostlin čeledi *Betula-ceae*, avšak v menším množství, proto se získává chemickou nebo enzymatickou oxidací betulinu<sup>2</sup>. Dalším zdrojem mohou být rostliny z čeledi *Rhamnaceae*, *Myrtaceae*, *Ebenaceae* nebo *Paeoniaceae*<sup>8</sup>. Oproti betulinové kyselině



Obr. 1. 2,3-oxidoskvalen (1)



Obr. 2. Triterpenoidní kyseliny: betulin (2), betulinová kyselina (3), betulonová kyselina (4) a platanová kyselina (5)

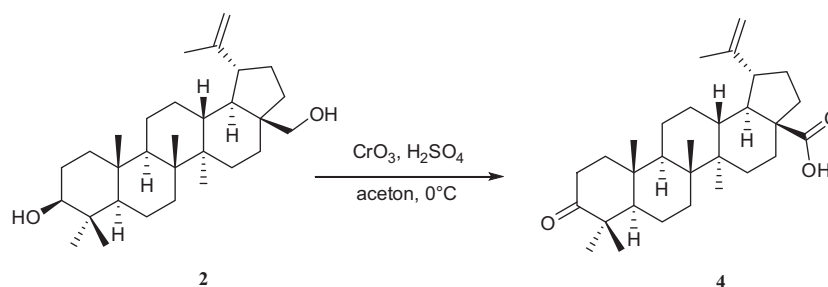


Schéma 1. Jonesova oxidace betulinu (2) na betulonovou kyselinu (4)

se betulonová [3-oxo-lup-20(29)-en-28-ová kyselina] kyselina liší v poloze C-3, kde se vyznačuje ketoskupinou místo  $\beta$ -konfigurovaného hydroxyly. Betulonová kyselina se získává také z březové kůry extrakcí organickými rozpouštědly (ethanol, aceton nebo chloroform), avšak její obsah je nízký, takže pro její získání se využívá semisyntetická oxidace betulinu – Jonesova oxidace (schéma 1)<sup>3</sup>.

Platanová kyselina [(3 $\beta$ )-3-hydroxy-20-oxo-30-norlupan-28-ová kyselina] je pentacyklický triterpenoid 30-norlupanového typu, vyskytující se v rostlinách čeledi *Platanaceae* (*Platanus x hybrida* Brot. a *Platanus occidentalis* L (cit.<sup>2</sup>)). Lze ji jako minoritní složku izolovat z rostliny balmín metlatý (*Leptospermum scoparium*, čeleď *Myrtaceae*)<sup>2,7</sup>. Vzhledem k menšímu obsahu v rostlinách, platanovou kyselinu získáme syntetickou cestou založenou na oxidaci ze snadno dostupných triterpenoidů, jako je betulin. Oxidace C20(29)-nenasycené vazby může být provedena pomocí  $\text{RuO}_4$  (*m*-CPBA a  $\text{CHCl}_3$ ) nebo  $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$  ve vodném dioxanu<sup>7</sup>. V porovnání s betulonovou kyselinou, má ketoskupinu umístěnou na C-20, který je součástí řetězce, napojeného do pětičlenného kruhu E (cit.<sup>9</sup>).

## 2. Syntéza derivátů

Semisyntetické deriváty přírodních produktů jsou navrhovány za účelem zlepšení biologické dostupnosti

(snížení hydrofobicity), překonání buněčné rezistence a posílení terapeutického účinku<sup>3</sup>. Tímto způsobem lze získat látky se zvýšenou biologickou aktivitou nebo zvýšenou selektivitou působení<sup>3,10</sup>. Triterpenoidy rostlinného původu jsou důležitým výchozím bodem pro syntézu strukturně rozmanitých derivátů<sup>11</sup>. Komplexace s cyklodextrinem a lipozomální nanoformulace byly jedním z přístupů ke zvýšení hydrofility látek. Nejběžnějším možným řešením v medicíně je modifikace struktury a substituce různými typy skupin včetně heterocyklů<sup>5</sup>. U nových derivátů lze sledovat vztah mezi strukturou a aktivitou. Modifikace struktury lupanu se běžně provádějí na C-1, C-2, C-18, C-20, C-22 a C-29 (cit.<sup>12</sup>). Dalšími cílovými místy v úpravách skeletu triterpenoidu jsou C-3 (hydroxylová/oxo skupina), C-28 (hydroxylová/karboxylová skupina) a C-30 (allylová skupina) nebo spojení heterocyklů s A kruhem. Jako raménko (linker) spojující skelet s heterocykly může být používána 1,2,3-triazolová skupina<sup>5</sup>. Častou strukturální modifikací je substituce piperazinem, kde dva dusíkové atomy představují vhodný linker pro tvorbu dalších strukturálních motivů<sup>1</sup>. Zavedením piperazinylové skupiny do triterpenoidních struktur dochází ke zvýšení biologických aktivit (protinádorové, antimikrobiální, antivirové, antimalarické, aj.)<sup>11</sup>. Deriváty mohou být strukturně modifikovány na kruhu A (C-3 a C-2), na karboxylové funkční skupině (vznik amidového nebo esterového postranního řetězce)<sup>6</sup>. Původní kyseliny (betulinová nebo platanová) mají relativně nízkou cytoto-

xicitu v porovnání s polosyntetickými deriváty, např. 3-*O*-acetylované amidy těchto kyselin. Deriváty benzylamidů, (homo)-piperaziny amidů nebo konjugáty rhodaminu B mají cytotoxické účinky i v nanomolárních koncentracích<sup>13</sup>. Zavedení piperidinu nebo pyrrolidin-nitroxylu pomocí amidové vazby do polohy C-28 betulonové kyseliny způsobuje optimalizaci hepatoprotektivních vlastností. Přítomnost 1,3,4-oxadiazolů připojených přes aminokyseliny řetězec v poloze C-28 vykazuje *in vivo* protizánětlivý účinek. Dalším derivátem betulonové kyseliny vykazující protizánětlivý účinek je derivát se substituovaným heterocyklem 1,2,3-triazolem v C-28 poloze<sup>5</sup>. Deriváty betulonové kyseliny s amidovými, thiolovými a piperidinovými skupinami amplifikují protinádorové vlastnosti betulonové kyseliny<sup>3</sup>. Kromě syntézy aminových a amidových derivátů je popsána jako další z efektivních způsobů modifikace také syntéza oximových derivátů<sup>9</sup>. Přehledový článek Bednarczyk-Cwynar a spol.<sup>14</sup> podrobně shrnuje poznatky o triterpenických oximech a oximesterech do roku 2015, v dalších letech se tímto tématem zabývali například Kahnt a spol.<sup>9</sup>, Kozubek a spol.<sup>15</sup> nebo Lombrea a spol.<sup>3</sup>. Oximová funkční skupina patří do skupiny iminů a je charakteristická dvojnou vazbou mezi atomem uhlíku a dusíku, jehož součástí je hydroxylová skupina<sup>16</sup>. Oximové deriváty lze syntetizovat pomocí reakce karbonylových sloučenin (aldehydů nebo ketonů) s činidlem hydrochloridu hydroxylaminu za přítomnosti nejčastěji bezvodého organického rozpouštědla suchého pyridinu spolu s methanolem nebo ethanolem a zahříváním pod refluxem, a to ve vysokých výtěžcích (schéma 2)<sup>14,17–19</sup>. Reakce vyplývá z nukleofilní adice, kde nukleofilní skupina, hydrochlorid hydroxylaminu, atakuje elektrofilní místo karbonylové skupiny. Reakcí lze získat také směs produktu obsahující oxim jako isomer s dvou konfiguracích *syn* a *anti*<sup>20</sup>. Kromě dalších možností můžeme oximy dále modifikovat působením acylačních a alkylačních činidel na oximestery nebo oximethery. Jedním ze způsobů přípravy oximesterů je syntéza acylhalogenidů kyselin s oximy za běžných podmínek nebo reakce anhydridů kyselin s oximy v přítomnosti silné kyseliny<sup>21–23</sup>. Dalším způsobem je přímá esterifikace mezi karboxylovou kyselinou a alkoholem s využitím karbodiimidových činidel (např. EDCI) v přítomnosti DMAP v DCM za pokojové teploty, vedoucí k vysokým výtěžkům v optimálním čase<sup>21,24</sup>. V případě syntézy oximetherových derivátů je realizována nejčastěji reakce oximů s alkyl/arylhalogenidy, nejčastěji chloridy případně bromidy. Reakční podmínky pak záleží na volbě báze a rozpouštědla, např. NaH v DMF (cit.<sup>25</sup>).

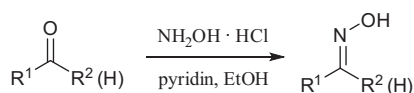


Schéma 2. Syntéza oximových derivátů (R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup> – různé substituenty)

### 3. Biologické aktivity

Výzkum pentacyklických triterpenoidů začal již v roce 1788, kdy byl poprvé extrahován betulin z rostlinného materiálu. Na počátku a v polovině 20. století byla látka hojně studována, avšak její farmaceutický význam byl zaznamenán až později. V roce 1995 E. Pisha pozoroval cytotoxický účinek betulonové kyseliny proti buňkám melanomu, díky němuž vzrostl zájem o studium těchto látek<sup>13</sup>. Po provedení mnoha studií bylo odhaleno, že pentacyklické triterpenoidy disponují řadou biologických aktivit, jako jsou protinádorová, antimikrobiální, antivirová, antidiabetická, protizánětlivá, hepatoprotektivní, imunostimulační a antioxidační aktivity, které lze využít v léčebné terapii<sup>5</sup>. Velkou pozornost si získala kyselina betulonová, která je známa svými protinádorovými nebo anti-HIV účinky. Je účinná v mikromolárních koncentracích a vykazuje vysoký stupeň selektivity k maligním nádorům, například proti buňkám melanomu. Působí mechanismem zahrnujícím permeabilizaci mitochondriální membrány s uvolňováním faktoru cytochromu c, aktivátoru kaspasy Smac nebo faktoru AIF, aktivaci kaspas, jadernou fragmentaci a indukci apoptózy<sup>6</sup>. Antihyperlipidemická aktivita byla sledována u betulonové kyseliny při testování na oběžných myších<sup>1</sup>. Betulin a betulonová kyselina zvyšují absorpci glukosy, zvyšují sekreci inzulinu, zvyšují vychytávání glukosy v periferních orgánech a pomáhají tak v léčbě diabetu. Stejně jako betulin, betulonová kyselina snižovala hladinu glukosy v krvi, plazmatické triglyceridy a hladiny celkového cholesterolu v myším modelu krmeném stravou s vysokým podílem tuku. U kyseliny betulonové byly pozorovány *in vitro* antioxidační účinky. Bylo prokázáno, že některé deriváty platanové kyseliny jsou účinnými inhibitory butyrylcholinesterasy BChE (EC 3.1.1.8)<sup>3</sup>. U derivátů platanové kyseliny, které měly C-20 karbonylovou skupinu modifikovanou na aminoskupinu, bylo sledováno vylepšení BChE inhibiční aktivity již v nanomolárních rozmezích<sup>2</sup>. Přírodní látky by tak mohly být aplikovány do odvětví medicíny, kde zároveň roste zájem o jejich používání<sup>14</sup>. Nicméně doposud se nepodařilo zavést sloučeninu z této třídy nebo její derivát do terapie. Druhé fáze klinických studií dosáhl pouze bevirimat pro své anti-HIV účinky, avšak studie byla v roce 2010 přerušena<sup>5</sup>. V dnešní době je přibližně 50 % všech schválených léčiv tvořeno nebo odvozeno z přírodních látek<sup>26</sup>. Avšak limitací použití pentacyklických triterpenoidů v terapii je jejich vysoká lipofilita mající vliv na biodostupnost *in vivo*<sup>5</sup>. Strategie chemické modifikace původních struktur může přispět k získání nových derivátů, které mají výhodnější farmakologickou aktivitu<sup>10,14</sup>.

Současný výzkum v medicíně se věnuje problematice bakteriálních infekcí. Asi nejvýznamnějším příkladem patogenní bakterie může být grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*<sup>27</sup>. Podle publikovaných údajů<sup>28</sup> triterpenoidy vykazují antimikrobiální aktivitu proti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis* v koncentracích mezi 0,006–200 mg ml<sup>-1</sup>. U betulonové

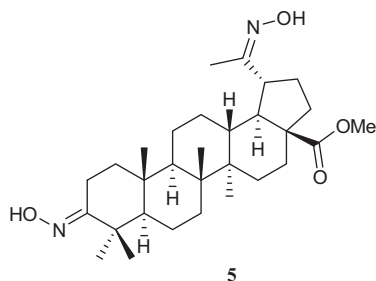
a platanové kyseliny je popsána zejména účinnost proti grampozitivním bakteriím v porovnání s gramnegativními, a to s největší citlivostí vůči bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*<sup>29–31</sup>. Výzkum Kazakové a spol.<sup>31</sup> ukázal, že betulonová kyselina v koncentracích do 80 mg ml<sup>-1</sup> snížila růst *Staphylococcus aureus* a v koncentracích 90 a 100 mg ml<sup>-1</sup> zcela potlačila růst této bakterie. Nicméně proti *Klebsiella pneumoniae* se účinek projevil pouze snížením růstu, nikoliv úplným potlačením růstu<sup>31</sup>. Betulonová kyselina derivatizovaná tri-Boc-sperminem v pozici C-28 vykazuje antimikrobiální účinky na *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* a *Listeria monocytogenes* při koncentraci 6,25 mM (cit.<sup>32</sup>). Poumále a spol.<sup>33</sup> zkoumali antibakteriální účinky platanové kyseliny v extraktu z *Dorstenia convexa*. Platanová kyselina zde inhibovala růst všech zkoumaných bakterií, mezi nimiž byly *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a další, její účinek je srovnatelný s betulonovou kyselinou<sup>33</sup>. V dnešní době je velkou výzvou aktivní hledání a vývoj nových antibiotik<sup>34</sup>. WHO prohlásila rezistenci k antibiotikům za jednu ze tří hlavních hrozeb pro veřejné zdraví<sup>14,35</sup>.

V řadě publikací je u triterpenových kyselin také popsána antivirová aktivita. U betulinové kyseliny je zkoumána zejména anti-HIV aktivita. Virus HIV byl poprvé identifikován před 30 lety. Betulinová kyselina zabraňuje dozrávání viru tím, že nedochází ke štěpení capsid-spacer peptidu u Gag proteinu. Betulinová kyselina působí také proti Herpes simplex viru (HSV-1, HSV-2), Epstein-Barrové viru (EBV) a proti hepatitidě B (HBV)<sup>1</sup>. Bylo zjištěno, že platanová kyselina a její deriváty vykazují značnou aktivitu proti HIV inhibicí replikace HIV-1 v buňkách H9 lymfocytů<sup>7,9,36,37</sup>. Methyl-3,20-bisoximoplatanoát (5, obr. 3) vykazuje antivirové účinky proti HSV-1 a HPV-11 s EC<sub>50</sub> > 1,20 μM a 3,47 μM (cit.<sup>7</sup>).

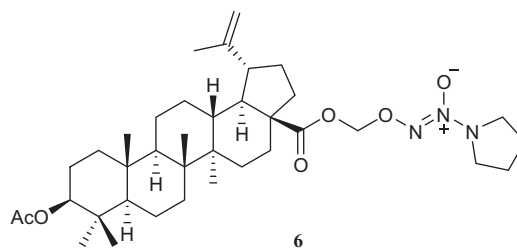
U betulonové kyseliny byla prokázána antivirová aktivita zejména proti virům HSV-1 a EBV (cit.<sup>38</sup>). Její oximový derivát byl popsán jako účinný proti viru *Influenza A* (cit.<sup>27,38</sup>).

Rakovina i přes veškeré úsilí prevence a léčby představuje stále druhou nejčastější příčinu úmrtí na světě<sup>26</sup>. Hlavními příčinami přispívajícími k rozvoji onkologického onemocnění mohou být životní styl, vlivy prostředí nebo dědičné vlivy. Zatímco v regionech s nízkými příjmy

je způsoben vznik rakoviny především virovými a bakteriálními infekcemi, tak ve vyspělých regionech je vznik ze 40 % zapříčiněn rizikovými faktory, jako je užívání tabáku, alkoholu nebo nadváha<sup>39</sup>. Díky sekvenování genomu bylo zjištěno, že rakovina zahrnuje dynamické změny v genomu<sup>40</sup>. Mutace genů má za následek dysregulaci exprese protoonkogenů (např. Ras) a tumorsupresorových genů (např. p53) majících klíčovou roli v karcinogenezi<sup>41,42</sup>. Přírodní produkty a jejich deriváty se v průběhu historie ukázaly jako užitečné při vývoji nových chemoterapeutik<sup>3</sup>. Pentacyklické triterpenoidy byly identifikovány jako účinné protirakovinné látky se selektivním cytotoxickým působením<sup>43</sup>. Nejčastějším mechanismem protinádorového účinku je indukovaná apoptóza probíhající s aktivací kaspas, mitochondriální permeabilizací a zvýšenou produkcí ROS (cit.<sup>2</sup>). Bylo pozorováno, že betulinová kyselina má také angiogenní vlastnosti. Molekulární cíle betulinové kyseliny pravděpodobně vyplývají ze změn v modulaci B-buněčného lymfomu (Bcl-2) a jaderného faktoru NF-κB. Rozdíly ve specifitě a mechanismu účinku (stimulaci apoptózy a inhibici kinas) mohou být u betulinové kyseliny způsobeny drobnými modifikacemi ve struktuře. Bylo prokázáno, že kyselina betulinová redukuje některé projevy toxicity protinádorové látky doxorubicinu, který je silně kardiotoxický<sup>1</sup>. Betulinová kyselina má silné antiproliferativní účinky proti lidským buňkám melanomu IC<sub>50</sub> = 1,5–1,6 μg ml<sup>-1</sup>, karcinomu plic IC<sub>50</sub> = 1,5–4,2 μg ml<sup>-1</sup>, karcinomu děložního čípku IC<sub>50</sub> = 1,8 μg ml<sup>-1</sup>, atd.<sup>3</sup>. Zavedení amidové funkce v pozici C-28 vede k vytvoření účinných induktorů apoptózy, vyplývá to z výsledků Shintyapina a spol.<sup>44</sup>, kteří zkoumali inhibiční účinky na buněčné linie MT-4, MOLT-4, CEM (T-lymfoblastická leukemie) a HepG2 (karcinom jater). V rozmezí koncentrací 4,2–32,0 μg ml<sup>-1</sup> bylo dosaženo hodnoty 50% inhibice<sup>3</sup>. Byly zkoumány také di- a polyamin amidové deriváty betulinové kyseliny. Nejvíce cytotoxicky aktivními zde byly deriváty s piperazinem a sperminem. Derivát betulinové kyseliny syntetizovaný z diazen-1-ium-1,2-dioxalátu (6, obr. 4) působil antiproliferačně v sub-mikromolárních koncentracích na několika nádorových buněčných liniích a byl 20krát aktivnější než cisplatina<sup>1</sup>.



Obr. 3. Methyl-3,20-bisoximoplatanoát (5)



Obr. 4. Derivát betulinové kyseliny syntetizovaný z diazen-1-ium-1,2-dioxalátu (6)

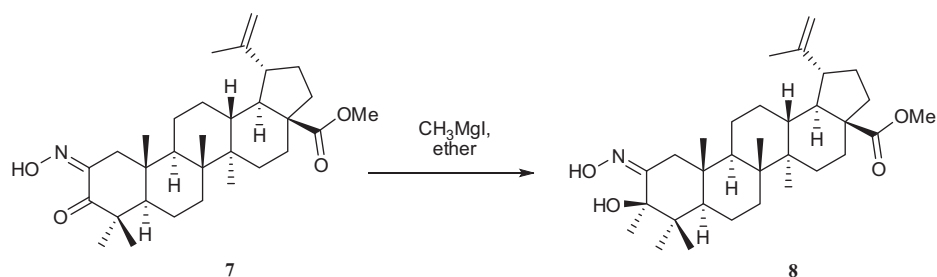
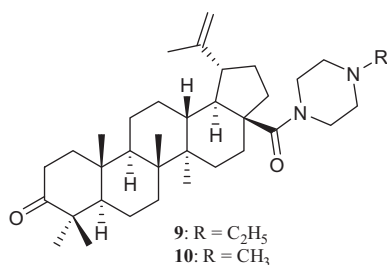


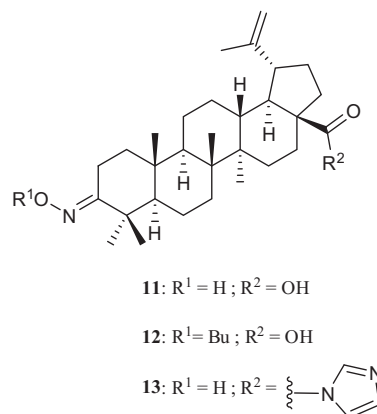
Schéma 3. Syntéza cytotoxicky aktivního C-2-oximového derivátu betulonové kyseliny (8)

Amidové deriváty betulinové kyseliny na bázi polyaminu vázaného k C-17-COOH amidovou vazbou vykazovaly vysokou cytotoxicitu. Analoga vzniklá kombinací esterové a amidové vazby na skupině C-3-OH byla cytotoxická pouze proti buněčným liniím T-lymfoblastické leukémie (CEM) a aktivita na fibroblasty byla nízká oproti C-17 derivátům. Bylo prokázáno, že poloha substituce (*o*-, *m*- a *p*-) pyridinového kruhu v cílových amidech ovlivňuje cytotoxickou aktivitu<sup>2</sup>. Hoenke a spol.<sup>13</sup> pozorovali nejvyšší aktivitu u amidu betulinové kyseliny s *trans*-1,4-cyklohexyldiaminem, který vykazoval cytotoxicitu EC<sub>50</sub> = 0,6 μM proti HT29 (buněkám adenokarcinomu tlustého střeva)<sup>13</sup>. *In vitro* studie derivátů betulonové kyseliny ukazují cytotoxické účinky proti nádorovým buňkám pocházejícím z melanomu, lymfomu, karcinomu střeva, plic, jater, prostaty, vaječníku, prsu, děložního čípku nebo mnohočetného myelomu, atd.<sup>3,43</sup>. U betulonové kyseliny byla prokázána vysoká aktivita proti buněčným liniím MEL-2 (melanom), KB (epidermální karcinom), PC-3 (karcinom prostaty) a A549 (adenokarcinom plic)<sup>43,45</sup>. Oximové deriváty betulonové kyseliny vykazují silnou cytotoxicitu především na buňky HeLa (karcinom děložního čípku), A2780 (karcinom vaječníků), MCF-7 (karcinom prsu) a MOLT-4 (lymfoblastická leukémie)<sup>3,14</sup>. V přehledovém článku Bildziukevich a spol.<sup>1</sup> je popsána syntéza 2,3-*secotriterpenoidů* zahrnující modifikaci C-2-oximového derivátu betulonové kyseliny (7) na cytotoxicky aktivní derivát (8; schéma 3)<sup>1</sup>. Při zavedení amidové skupiny v pozici C-28 betulonové kyseliny vzniká efektivní induktor apoptózy s protinádorovými účinky<sup>44</sup>. *N*-Ethylpiperaza-

Obr. 5. *N*-ethylpiperazinylamid (9) a *N*-methylpiperazinylamid (10) betulonové kyseliny

zinylamid betulonové kyseliny vykazuje protinádorovou aktivitu proti buněčným kulturám CEM-13, U-937 a MT-4.

Amid betulonové kyseliny s *N*-methylpiperazinem je účinný proti SR (buněčná linie lymfomu), NCI-H460 (karcinom plic) a HCT-116 (karcinom tlustého střeva). Z výsledků Giniyatullina a spol.<sup>11</sup> bylo potvrzeno, že po zavedení C-3 oximu k amidu betulonové kyseliny s *N*-methylpiperazinem je látka účinná pouze proti leukemickým buňkám<sup>11</sup>. Kromě protizánětlivé aktivity je C-28 1,2,3-triazolový heterocyklus klíčový farmakofor derivátů betulonové kyseliny s protinádorovou aktivitou. Konjugát s 3'-deoxythymidin-5'-ylem byl neúčinnější proti buněčné linii SNB-19 (glioblastom) s IC<sub>50</sub> = 0,17 μM. Připojením aminothiazolového kruhu ke kruhu A v poloze C-2 a C-3 vykazují deriváty významnou protinádorovou aktivitu proti leukemickým buňkám CEM, karcinomu plic A549, karcinomu tlustého střeva HCT116, atd.<sup>5</sup>. Betulonová kyselina substituovaná piperidinem vykazuje jednu z nejvyšších aktivit<sup>46</sup>. Pyridinová skupina derivátů 3-pyridylideno-28-oxo-allobetulonů byla aktivní proti několika typům nádorů včetně leukemických. Při syntéze 4-pyridylideno-analoga bylo zjištěno, že poloha dusíku má vliv na cytotoxicitu a selektivitu<sup>5</sup>. V přehledovém článku Lombrea a spol.<sup>3</sup> je uvedeno, že derivát oximu betulonové



Obr. 6. Oximové deriváty betulonové kyseliny



kyseliny (**11**) má silné účinky na buněčnou linii A2780, použije-li se ve vyšší dávce, přičemž nejsilnější aktivitu projevoval butylimin (**12**) proti HeLa buňkám. C-28-imi-dazolid 3-hydroxyimino-lup-20(29)-en-28-karboxylové kyseliny (**13**) inhibuje buněčné linie karcinomu plic, tlustého střeva, prsu, prostaty, vaječnicků, buňky leukémie a melanomu, atd. (obr. 6)<sup>3</sup>.

*In vivo* protinádorová aktivita nebyla zatím dostatečně prozkoumána z důvodu hydrofobních vlastností betulonové kyseliny<sup>3</sup>. Některé deriváty betulonové kyseliny konjugované s trifenylofosfoniovými solemi vykazují lepší antiproliferační účinky selektivně na nádorových buňkách způsobené tím, že nádorové buňky lépe vstřebávají triterpenoidní kyseliny<sup>43</sup>. Další modifikace thiomorfolinem v pozici C-28 také prokázala dobré výsledky, methylester v pozici C-28 po enkapsulaci do liposomu pro zvýšení biodostupnosti vykazuje třikrát lepší cytotoxické účinky<sup>47</sup>. Substituce v pozici C-17 1,3,4-oxadiazolem má za následek mírně zvýšenou a střední cytotoxickou aktivitu ve srovnání s betulonovou kyselinou<sup>48</sup>. Ganaie a spol.<sup>6</sup> pozorovali zvýšení cytotoxicity platanové kyseliny po syntéze na aryl-enony. Nejvíce aktivní a s vysokou selektivitou zde byl derivát s *p*-tolylou substitucí, kde proti buňkám MDA-MB-231 (karcinom prsu) a A-549 (karcinom plic) byla aktivita srovnatelná s 5-fluorouracilem<sup>6</sup>. Ve výzkumu Khusnutdinové a spol.<sup>7</sup> bylo u platanové kyseliny zjištěno, že zavedením benzyloxy skupin do pozice C-2 došlo ke zlepšení protizánětlivé, protinádorové a antidiabetické aktivity. Bylo pozorováno, že methyl-3,20-bis-oximo-platanoát (**5**, obr. 3) byl citlivý vůči buněčné linii karcinomu vaječnicků A2780 s EC<sub>50</sub> = 9,14 μM (cit.<sup>7</sup>). Zavedení oximu do pozice C-20 vede k mírným protinádorovým účinkům, přičemž konfigurace oximů nemá vliv na hodnoty EC<sub>50</sub>. C-20 primární amin platanové kyseliny chráněný methyloxy skupinou na C-28 vykazuje protinádorové účinky a vyvolává apoptózu nádorových buněk. Chránění aminového derivátu benzyloxy skupinou na C-28 zvyšuje protinádorovou aktivitu, byla prokázána účinnost proti liniím buněk střevního adenokarcinomu<sup>9</sup>. Kozubek a spol.<sup>15</sup> zjistili, že cytotoxická aktivita amidů platanové kyseliny je vyšší než u odpovídajících oximů. Amidy v pozici C-28 odvozené od ethylaminu, morfolinu či homopiperazinu vykazovaly vysokou cytotoxicitu na všechny typy lidských nádorových buněk, ale také na linii nemaligních myších fibroblastů a lidských embryonálních ledvinových buněk<sup>15</sup>.

#### 4. Závěr

Úkolem moderní biologie a medicíny je hledání nových vysoce účinných léků proti zmíněným onemocněním<sup>49</sup>. Triterpenoidy se jeví jako perspektivní a hrají tak stále větší roli při objevování a vývoji nových léků<sup>14</sup>.

#### Seznam použitých zkratek

A549	lidská buněčná linie karcinomu plic
A2780	lidská buněčná linie karcinomu vaječnicků
AIF	faktor indukující apoptózu
Bcl-2	protoonkogen, regulační protein apoptózy
BChE	butyrylcholinesterasa
CD95	transmembránový receptor
CEM	buňky T-lymfoblastické leukémie
DCM	dichlormethan
DMAP	4-( <i>N,N</i> -dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
EBV	Epstein-Barrové virus
EC <sub>50</sub>	polovina maximální účinné koncentrace
EDCI	<i>N</i> -[3-(methylamino)propyl]- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid hydrochlorid
HBV	virus hepatitidy B
HCT-116	lidská buněčná linie karcinomu tlustého střeva
HeLa	lidská buněčná linie karcinomu děložního čípku
HepG2	lidská buněčná linie karcinomu jater
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPV	lidský papilomavirus
HSV	Herpes simplex virus
HT29	lidská buněčná linie kolorektálního adenokarcinomu
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IL-12	cytokin, interleukin 12
MCF-7	lidská buněčná linie karcinomu prsu
MDA-MB-231	lidská buněčná linie karcinomu prsu
MDR	mnohočetná léková rezistence
MEL-2	lidská buněčná linie melanomu
MOLT-4	lidská buněčná linie leukémie
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní k methicilinu
MT-4	buňky T-lymfoblastické leukémie
NCI-H460	lidská buněčná linie karcinomu plic
NF-κB	transkripční faktor
ROS	reaktivní formy kyslíku
Smac	druhý mitochondriální aktivátor kaspasy
SR	lidská buněčná linie lymfomu
TNF-α	tumor nekrotizující faktor α
U-937	lidská buněčná linie histiocytárního lymfomu
WHO	Světová zdravotnická organizace

#### LITERATURA

1. Bildziukevich U., Özdemir Z., Wimmer Z.: *Molecules* 24, 3546 (2019).
2. Özdemir Z., Wimmer Z.: *Phytochemistry* 203, 113340 (2022).

3. Lombrea A., Scurtu A. D., Avram S., Pavel I. Z., Turks M., Luginina J., Peipins U., Dehelean C. A., Soica C., Danciu C.: *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3676 (2021).
4. Hordyjewska A., Ostapiuk A., Horecka A., Kurzepa J.: *Phytochem. Rev.* **18**, 929 (2019).
5. Nistor G., Trandafirescu C., Prodea A., Milan A., Cristea A., Ghiulai R., Racoviceanu R., Mioc A., Mioc M., Ivan V.: *Molecules* **27**, 6552 (2022).
6. Ganaie B. A., Shahid M., Rashid A., Ara T., Ahmad Banday J., Malik F., Bhat B. A.: *Chem. Biodiversity* **18**, e2100292 (2021).
7. Khusnutdinova E., Galimova Z., Lobov A., Baikova I., Kazakova O., Thu H. N. T., Tuyen N. V., Gatilov Y., Csuk R., Serbian I.: *Nat. Prod. Res.* **36**, 5189 (2022).
8. Rios J. L., Manez S.: *Planta Med.* **84**, 8 (2018).
9. Kahnt M., Heller L., Grabandt P., Al-Harrasi A., Csuk R.: *Eur. J. Med. Chem.* **143**, 259 (2018).
10. de L. e Silva M., David J. P., Silva L. C., Santos R. A., David J. M., Lima L. S., Reis P. S., Fontana R.: *Molecules* **17**, 12197 (2012).
11. Giniyatullina G. V., Kazakova O. B.: *Chem. Nat. Comp.* **57**, 698 (2021).
12. Salvador J. A. R., Leal A. S., Alho D. P. S., Gonçalves B. M. F., Valdeira A. S., Mendes V. I. S., Jing Y.: *Stud. Nat. Prod. Chem.* **41**, 33 (2014).
13. Hoenke S., Christoph M. A., Friedrich S., Heise N., Brandes B., Deigner H. P., Al-Harrasi A., Csuk R.: *Molecules* **26**, 2102 (2021).
14. Bednarczyk-Cwynar B., Zaprutko L.: *Phytochem. Rev.* **14**, 203 (2015).
15. Kozubek M., Hoenke S., Schmidt T., Ströhl D., Csuk R.: *Med. Chem. Res.* **31**, 1049 (2022).
16. Sahyoun T., Arrault A., Schneider R.: *Molecules* **24**, 2470 (2019).
17. Ledeti I., Avram S., Bercean V., Vlase G., Vlase T., Ledeti A., Zupko I., Mioc M., Suta L. M.: *Molecules* **20**, 22691 (2015).
18. Baltina L. A., Flekhter O. B., Nigmatullina L. R., Boreko E. I., Pavlova N. I., Nikolaeva S. N., Savinova O. V., Tolstikov G. A.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3549 (2003).
19. Haavikko R., Nasereddin A., Sacerdoti-Sierra N., Kopelyanskiy D., Alakurtti S., Tikka M., Jaffe C. L., Yli-Kauhaluoma J.: *Med. Chem. Commun.* **5**, 445 (2014).
20. da Souza S. L. G. a 11 spoluautorů: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 435 (2016).
21. Bettadaiah B. K., Kumar S. C. S., Kumar N. V., Srinivas P.: *Synthesis* **46**, 1847 (2014).
22. Karakurt A., Alagoz M. A., Sayoglu B., Calis U., Dalkara S.: *Eur. J. Med. Chem.* **57**, 275 (2012).
23. Dikuser E. A., Zhukovskaya N. A.: *Russ. J. Org. Chem.* **44**, 1389 (2008).
24. Lutjen A. B., Quirk M. A., Kolonko E. M.: *J. Vis. Exp.* **140**, 1 (2018).
25. Kosmalski T., Studzinska R., Daniszewska N., Ullrich M., Sikora A., Marszall M., Modzelewska-Banachiewicz B.: *ChemistryOpen* **7**, 551 (2018).
26. Hoenke S., Heise N. V., Kahnt M., Deigner H. P., Csuk R.: *Eur. J. Med. Chem.* **207**, 112815 (2020).
27. Dayan G. H., Mohamed N., Scully I. L., Cooper D., Begier E., Eiden J., Jansen K. U., Gurtman A., Anderson A. S.: *Expert Rev. Vaccines* **15**, 1373 (2016).
28. Chue K. T., Chang M. S., Ten L. N.: *Chem. Nat. Compd.* **47**, 759 (2011).
29. Haque S., Nawrot D. A., Alakurtti S., Ghemtio L., Yli-Kauhaluoma J., Tammela P.: *PLoS One* **9**, e102696 (2014).
30. Hernández-Pérez M., López-García R. E., Rabanal R. M., Darias V., Arias A.: *J. Ethnopharmacol.* **41**, 115 (1994).
31. Kazakova O. B., Giniyatullina G. V., Tolstikov G. A., Medvedeva N. I., Utkina T. M., Kartashova O. L.: *Bioorg. Khim.* **36**, 416 (2010).
32. Bildziukevich U., Malik M., Özdemir Z., Rarova L., Janovska L., Slouf M., Saman D., Sarek J., Nonappa, Wimmer Z.: *J. Mater. Chem. B* **8**, 484 (2020).
33. Poumale H. M. P., Amadou D., Shiono Y., Kapche G. D. W., Ngadjui B. T.: *Asian J. Chem.* **23**, 525 (2011).
34. Karaman R., Jubeh B., Breijyeh Z.: *Molecules* **25**, 1340 (2020).
35. Giniyatullina G., Petrova A., Mustafin A., Zileeva Z., Kuzmina U., Vakhitova Y., Kazakova O.: *Med. Chem. Res.* **1** (2021). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-327649/v1>.
36. Heller L., Kahnt M., Loesche A., Grabandt P., Schwarz S., Brandt W., Csuk R.: *Eur. J. Med. Chem.* **126**, 652 (2017).
37. Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R. E., Cosentino L. M., Bailas L. M., Jiang J. B., Janzen W. P., Chen I., Lee K.: *J. Nat. Prod.* **57**, 243 (1994).
38. Flekhter O. B., Boreko E. I., Nigmatullina L. R., Tretyakova E. V., Pavlova N. I., Baltina L. A., Nikolaeva S. N., Savinova O. V., Eremin V. F., Galin F. Z.: *Russ. J. Bioorg. Chem.* **30**, 80 (2004).
39. Brennan P., Davey-Smith G.: *J. Natl. Cancer Inst.* **114**, 353 (2022).
40. Hanahan D., Weinberg R. A.: *Cell* **100**, 57 (2000).
41. Roy P. S., Saikia B. J.: *Indian J. Cancer.* **53**, 441 (2016).
42. Kontomanolis E. N., Koutras A., Syllaios A., Schizas D., Kalagasidou S., Pagkalos A., Alatzidou D., Kantari P., Ntounis T., Fasoulakis Z.: *JBUON* **26**, 1723 (2021).
43. Tsepaeva O. V., Nemtarev A. V., Salikhova T. I., Abdullin T. I., Grigor Eva L. R., Khozyainova S. A., Mironov V. F.: *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **20**, 286 (2020).
44. Shintyapina A. B., Shults E. E., Petrenko N. I., Uzenkova N. V., Tolstikov G. A., Pronkina N. V., Kozhevnikov V. S., Pokrovsky A. G.: *Russ. J. Bioorg. Chem.* **33**, 579 (2007).
45. Tolstikova T. G., Sorokina I. V., Tolstikov G. A., Tolstikov A. G., Flekhter O. B.: *Bioorg. Khim.* **32**, 42 (2006).

46. Yang S. J., Liu M. C., Zhao Q., Hu D. Y., Xue W., Yang S.: *Eur. J. Med. Chem.* 96, 58 (2015).
47. Csuk R., Stark S., Nitsche C., Barthel A., Siewert B.: *Eur. J. Med. Chem.* 53, 337 (2012).
48. Antimonova A. N., Petrenko N. I., Shakirov M. M., Pokrovskii M. A., Pokrovskii A. G., Shul'ts E. E.: *Chem. Nat. Compd.* 50, 1016 (2014).
49. Dubinin M. V., Semenova A. A., Ilzorkina A. I., Mikheeva I. B., Yashin V. A., Penkov N. V., Vydrina V. A., Ishmuratov G. Y., Sharapov V. A., Khoroshavina E. I.: *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1862, 183383 (2020).

**L. Černá<sup>a</sup>, Z. Wimmer<sup>b</sup>, A. Massyagutova<sup>a</sup>, and P. Lovecká<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic,* <sup>b</sup> *Department of Chemistry of Natural Compounds, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*): **Betulonic and Platanic Acids as a Basis for the Synthesis of New Therapeutically Effective Substances**

Natural substances produced by plants represent an important source of new medicinal products. This article is focused on the description of the antimicrobial, antiviral, and cytotoxic activity of the synthesized derivatives of betulonic and platanic acids, especially their oxime-based derivatives. It is also aimed at providing overview of the possible use of these derivatives in the treatment of infectious or cancer diseases.

**Keywords:** betulonic acid, platanic acid, oxime derivatives, antiviral activity, antibacterial activity, anticancer activity



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.

## BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE BUTANOLU

BARBORA BRANSKÁ

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika  
barbora.branska@vscht.cz

Došlo 10.7.23, přijato 23.11.23.

Biotechnologická produkce butanolu a dalších doprovodných rozpouštědel má více než stoletou historii a v současnosti představuje alternativní možnost produkce žádaných chemikálií z různých odpadních proudů v souladu s konceptem oběhového hospodářství. Tento přehledový článek shrnuje současný stav možné průmyslové produkce, představuje hlavní producenty rozpouštědel, solventogenní klostridia a jejich metabolismus spolu s hlavními aspekty, které ovlivňují fyziologické a produkční charakteristiky. Poslední část je věnována substrátům, které mohou být k produkci biobutanolu využívány, zejména lignocelulose, všudypřítomné odpadní rostlinné hmotě, do níž jsou stále vkládány velké naděje ve spojitosti s velkoobjemovou biotechnologickou produkcí mnoha komodit.

Klíčová slova: butanol, ABE fermentace, *Clostridium*, lignocelulosa, alternativní substráty

### Obsah

1. Průmyslová produkce butanolu – vize a skutečnost
2. Solventogenní zástupci rodu *Clostridium*
  - 2.1. Centrální metabolismus solventogenních klostridií a tvorba cílových produktů
    - 2.1.1. Klasická teorie ABE fermentace a její regulace
    - 2.1.2. Úloha redoxního potenciálu v regulaci solventogeneze, tvorba H<sub>2</sub>
  - 2.2. Sporulace jako stresová odpověď?
3. Využití alternativních surovin k produkci rozpouštědel
  - 3.1. Využití lignocelulosity
    - 3.1.1. Inhibitory z lignocelulosity a jejich působení na produkční organismy
    - 3.2. Nelignocelulosové substráty
4. Závěr

### 1. Průmyslová produkce butanolu – vize a skutečnost

Historie průmyslové produkce rozpouštědel butanolu a acetonu sahá do počátku 20. století a nedávno slavila své 100. výročí. Poměrně málokdo ví, že patřila spolu s výrobou lihu k jednomu z největších průmyslových biotechnologických aplikací na světě. Továrna na fermentační produkci butanolu stála dokonce i na území České republiky a to v Rájci nad Svitavou<sup>1</sup>. Poměrně záhy po svém rozvoji byla ale vytlačena levnější chemickou výrobou a zažívala pouze krátká období vzrůstu hlavně v souvislosti s válečnými konflikty a nedostatkem surovin.

V 70. letech 20. století zbývala ve světě jen torza výrobních továren, a to v Africe a Asii, později byla výroba ukončena i tam.

Začátkem 21. století byla myšlenka biotechnologické produkce rozpouštědel oprášená ve snaze produkovat čisté chemické látky z obnovitelných surovin a ekologičtějším způsobem. Biotechnologická produkce butanolu budila opět velké naděje, tentokrát jako alternativní biopalivo, neboť jeho fyzikálně-chemické vlastnosti vyhovují spalovacím motorům používaným v automobilové dopravě dokonce více než dnes již běžně přidávaný bioethanol<sup>2</sup>. Vědecké skupiny po celém světě začaly hledat cesty, jak zvýšit produkci butanolu, upravovaly motory pro využití čistého butanolu, postavily několik dobře fungujících prototypů, výrobci a dodavatelé pohonných hmot si od butanolu slibovali mnohé a začali se připravovat na jeho implementaci. V létě roku 2006 oznámili dva ropní giganti BP a DuPont spojení svých sil ve snaze dostat na trh toto nové aditivum a přestavět obrovské kapacity výroby ethanolu na produkci butanolu<sup>3</sup>.

Biobutanol je vyráběn přirozeně, fermentační cestou mikroorganismy, které patří do skupiny tzv. solventogenních klostridií v procesu známém jako ABE fermentace (A, B a E značí první písmena hlavních produktů primárního metabolismu: acetonu, butanolu a ethanolu). Řada těchto solventogenních klostridií má navíc velmi široký utilizační potenciál ve vztahu k použitým zdrojům uhlíku i dusíku<sup>4-6</sup>, což ještě umocňuje jejich potenciál ve výrobě chemikálií z obnovitelných surovin. Bohužel, i výčet omezení je poměrně rozsáhlý a mezi ty největší se řadí dvoufázovost celého procesu, ve kterém dochází nejprve k tvorbě určitého množství kyselin (octové a máselné), a tím ke

ztrátám vstupní suroviny na nežádoucí produkty. Hlavní problém ale spočívá v nízké koncentraci produkovaných rozpouštědel způsobené jejich toxicitou vůči producentovi. Přirozeně se koncentrace butanolu pohybuje u divokých kmenů kolem  $10 \text{ g l}^{-1}$  (většinou od 8 do  $12 \text{ g l}^{-1}$ ) a v případě „super-producentů“ maximálně okolo  $20 \text{ g l}^{-1}$  s nejslibnějšími výsledky pro *Clostridium acetobutylicum* JB200, který je schopen tvořit  $19 \text{ g l}^{-1}$  butanolu<sup>7</sup> a *Clostridium beijerinckii* BA101 (cit.<sup>8</sup>) s koncentrací až  $21 \text{ g l}^{-1}$ . Veškeré snahy přimět mikroorganismy k vyšší produkci končí u jednotek či desítek procent zlepšení, což ale stále zůstává velmi daleko za koncentracemi dosaženými při produkci ethanolu a za současné situace je izolace produktu ekonomicky nerentabilní. Teoretické hodnoty pro rentabilní průmyslovou produkci se pohybují okolo  $50 \text{ g l}^{-1}$  butanolu s produktivitou minimálně  $3 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (cit.<sup>9</sup>).

Přes velké naděje vkládané do butanolu tak ani v době sepsování tohoto textu není ve světě žádný fungující průmyslový provoz. Samozřejmě s přihlédnutím k dostupným pramenům. Na evropské úrovni byla novodobá komerční výroba zastoupena firmou Green Biologics, kterou založil v roce 2003 v Oxfordu Edward Green a která stála za konstrukcí několika pilotních provozů ve Velké Británii a Spojených státech<sup>10</sup>. Dle dostupných informací ale žádný z těchto provozů dnes nestaví své komerční aktivity na produkci butanolu. Současná snaha nejen Evropské unie o udržitelnost a oběhové hospodářství, primárně využívající již existující zdroje, dává mikrobiální produkci butanolu (ve směsi s acetonem a ethanollem) ještě stále určitou naději. Průkopníky obnovy průmyslové produkce ABE z odpadních surovin je anglická firma Celtic Renewables, která představila možnost produkce biobutanolu ze zbytků po výrobě whisky a která staví v Caledon Green ve skotském Grangemouthu komerční zpracovatelský závod<sup>11</sup>, který by měl zároveň sloužit i jako demonstrační jednotka.

## 2. Solventogenní zástupci rodu *Clostridium*

Rod *Clostridium* byl poprvé popsán v roce 1880 (cit.<sup>12</sup>) a zahrnuje obsáhlou skupinu mikroorganismů z kmene *Firmicutes* (nově *Bacillota*<sup>13</sup>), jejichž charakteristickými znaky jsou nízký obsah GC bazí, obligátní anaerobiosa, tvorba tyčinek s grampozitivní stavbou buněčné stěny a produkce endospor. Taxonomické studie postavené na analýze dostupných genomů a 16S rRNA ale ukazují, že se jedná o rod zahrnující mnohé, jen vzdáleně příbuzné organismy<sup>14–16</sup>, které pravděpodobně čeká v dohledné době reklasifikace. V současnosti je rod rozdělen do sedmi hlavních klastrů a největší z nich, klastř I, je jako jediný označován jako „pravá klostridia“<sup>16</sup>. Do tohoto klastru spadají všechna dosud popsaná solventogenní klostridia spolu s celou řadou dalších, mnohdy známějších a prostudovanějších patogenních zástupců, jako jsou *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* či *Clostridium perfringens*. Nicméně, jak se zdá, schopnost produkovat toxiny není

charakteristickým taxonomickým znakem a mezi jednotlivými druhy byla předávána pravděpodobně pomocí horizontálního přenosu genů<sup>16</sup>, což je předání genetické informace mimo standardní (vertikální) přenos z rodičovské generace na její potomky. Průmyslově uvažované druhy a kmeny pro produkci rozpouštědel jsou tedy sice blízkými příbuznými klostridiálních patogenů, ale geny pro produkci známých toxinů neobsahují.

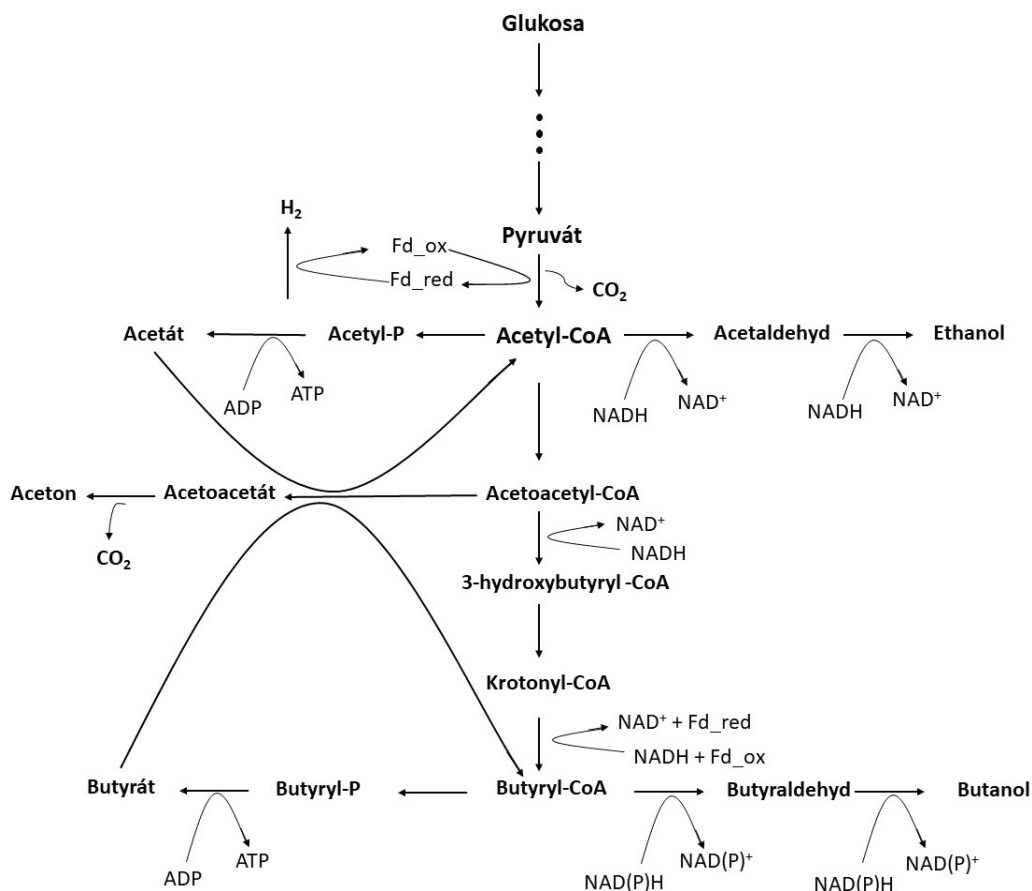
Mezi nejvýznamnější průmyslově uvažované druhy patří *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* a *C. saccharobutylicum*. Do těchto druhů byly mnohé kmeny zařazeny až v roce 2001, kdy Keis a spol.<sup>17</sup> navrhli toto třídění na základě fenotypových projevů a s využitím molekulárně genetických přístupů včetně analýzy 16S rRNA. Ve starší literatuře jsou tak některé druhy uvedeny pod jinými názvy a naopak, některým druhům byl navržen název nový. Fenotypová charakteristika jednotlivých druhů je dodnes v mnohých případech matoucí. Z porovnání dostupných genomů vyplývá, že jejich evoluce není přímočará a přiřazení jednotlivých kmenů konkrétním druhům vyžaduje spíše srovnání na celogenomové úrovni než pouze na základě přítomnosti některých genů či fenotypových znaků<sup>18</sup>.

### 2.1. Centrální metabolismus solventogenních klostridií a tvorba cílových produktů

Hlavní intermediáty a enzymy centrálního metabolismu u solventogenních klostridií jsou poměrně dobře známy a popsány, nicméně nevyřešenou otázkou zůstává, jak je regulován tok těchto látek a jejich redistribuce do rozvětveného schématu ABE fermentace. Metabolické schéma vycházející z glukosy začíná glykolýzou a poté se rozděluje do dvou hlavních směrů, viz obr. 1. Prvním je tvorba kyselin a druhým je tvorba rozpouštědel. Nejedná se ale o separátní metabolické cesty, nýbrž o propojený systém, do kterého vstupuje ještě další proměnná a tou je regenerace ferredoxinu a redukovaných kofaktorů NADH a NADPH a efektivní využití energie s tím spojené. V neposlední řadě pak podíl dvou možných transportních mechanismů pro glukosu, fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferasový systém (PTS) a ATP-dependentní přenos využívající enzym glukokinasu.

#### 2.1.1. Klasická teorie ABE fermentace a její regulace

Obecně přijímaná klasická teorie vychází ze studia nejprostudovanějšího kmene solventogenních klostridií *C. acetobutylicum* ATCC 824. Uvádí, že v první, exponenciální fázi růstu, dochází k tvorbě kyselin octové a máselné (v menším množství se může tvořit i kyselina mléčná z pyruvátu, ta ale nepatří mezi hlavní metabolity). Tím dochází k rychlému okyselování růstového média, což v určitém bodě znamená pro buňky značnou zátěž, neboť se vlivem nízkého pH zvyšuje koncentrace nedisociovaných kyselin, které mohou přecházet přes membrány, kde v intracelulárním prostoru s vyšším pH opět disociují a tím okyselují intracelulární kompartment. K udržení vitální hodnoty intracelulárního pH pak buňky musí proto-

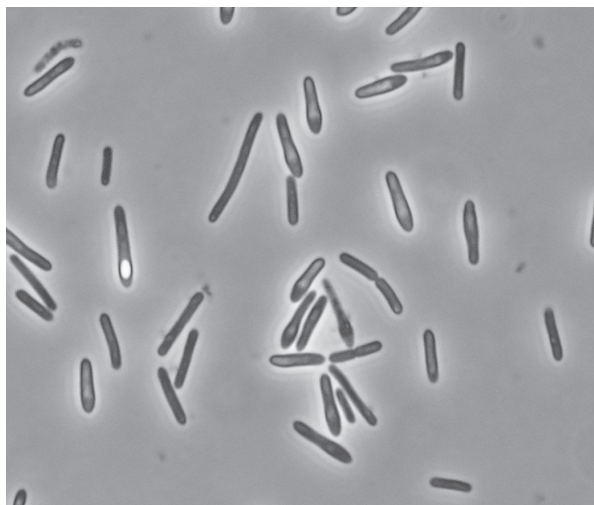


Obr. 1. Obecné metabolické schéma Aceton-Butanol-Ethanolové fermentace

ny za vynaložení velkého množství energie pumpovat ven<sup>19</sup> a hrozí nedostatek ATP i kolaps protonmotivní síly. Aby se buňky vyrovnaly s touto nežádoucí situací, „zapínají“ druhou část svého centrálního metabolismu, kterou je tvorba rozpouštědel a reutilizace vzniklých kyselin, čímž dochází k opětovnému růstu pH (cit.<sup>20</sup>). Produkovaná rozpouštědla představují ale jen dočasné řešení, neboť jejich toxicita vůči produkčním buňkám je vysoká a s dosažením poměrně nízké koncentrace buňky odumírají. Z toho důvodu v tom samém okamžiku, kdy přechází kultura z tzv. acidogeneze do solventogeneze je nastartován další záchranný mechanismus, kterým je tvorba endospor, které předchází akumulace polysacharidu granulosity. Akumulace granulosity vede k viditelnému rozšiřování buněk, jejichž tvar, typický pro klostridia, pak připomíná „doutníčky“ (angl. cigar shape). Endospory jsou zpravidla širší než vegetativní buňky a je pozorován tvar podobný vřetenu (angl. spindle like), viz obr. 2. Obě klíčové událos-

ti v životním cyklu klostridií, tedy přepnutí z acidogeneze do solventogeneze a nastartování sporulačního cyklu by měl řídit globální transkripční regulátor Spo0A (cit.<sup>21</sup>). Pravdou ale je, že skutečný impuls a regulační mechanismus jak přechodu z acidogeneze do solventogeneze, tak zahájení sporulace nebyl zatím odhalen a jejich vzájemné propojení je otázkou názoru té či oné vědecké skupiny. Poslední výzkumy poukazují na roli malých nekódujících RNA (cit.<sup>22</sup>) či mezibuněčné komunikace pomocí quorum sensing (QS)<sup>23</sup>.

Většina dostupných experimentálních dat je pro kmeny *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 a *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. Oba druhy *C. acetobutylicum* i *C. beijerinckii* patří do prvního klastru klostridií, tj. *Clostridium sensu stricto*, a uvedené metabolické schéma (obr. 1) je pro oba zástupce víceméně společné, nicméně u obou druhů mohou být do metabolismu glukosy zapojeny jiné geny, alternativní dráhy a jejich regulace je



Obr. 2. Zobrazení různých morfologických forem bakterie *C. beijerinckii* v různých stádiích životního cyklu

v mnoha případech také odlišná<sup>24</sup>. Zásadní rozdíl je i v lokalizaci genů pro solventogenezi. *C. beijerinckii* i většina průmyslově uvažovaných producentů má celou dráhu pro produkci rozpouštědel kódovanou v chromosomální DNA, zatímco u *C. acetobutylicum* se tato dráha nachází na megaplasmidu. Toto je pravděpodobně také důvod, proč si mnohé studie neodpovídají a jedna vyvrací tvrzení druhé. Mnohé poznatky získané pro kmen ATCC 824 jsou brány jako obecně platné, ale ve skutečnosti se ukazuje, že jde o kmen, který stojí poněkud stranou<sup>25</sup> a svými fenotypovými projevy se odlišuje od ostatních druhů uvažovaných pro průmyslovou výrobu rozpouštědel. V genomech obou druhů je často kódováno několik izoenzymů pro vybrané reakce fermentační dráhy, přičemž se aktivně zapojuje jen jeden, případně dochází k jejich výměně během různých fází životního cyklu<sup>26</sup>.

I přes přetrvávající drobné neznámé v zapojení jednotlivých enzymů do ABE fermentace je proces poměrně dobře popsán a poznán. Je tedy s podivem, že se přes všechny pokročilé nástroje a poznatky zatím nikomu nepodařilo odhalit, co skutečně leží za zmiňovaným přepnutím metabolismu. Klasická teorie nízkého pH (cit.<sup>27</sup>) spolu s akumulací kyselin staví na jednom z potenciálních regulačních pilířů, ale ten sám o sobě určitě nestačí. Jednak prosté přidání kyselin do média a snížení pH nestačí pro iniciaci solventogeneze a za druhé vedení kultivace za neutrálního pH vede taktéž k nezanedbatelné produkci rozpouštědel<sup>28</sup>. Dalšími kandidáty na regulační funkci jsou v tomto případě redoxní potenciál a množství či poměr  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ ,  $\text{ADP}/\text{ATP}$ , případně další.

### 2.1.2. Úloha redoxního potenciálu v regulaci solventogeneze, tvorba $\text{H}_2$

Redukční potenciál ve formě redukovaných pyridinových kofaktorů NADH a NADPH spolu s určitou hladinou ATP hraje roli nejen v regulaci metabolické změny, ale i v řadě dalších životních fází vegetativního i sporulačního cyklu klostridií. Z hlediska produkce žádaných metabolitů se ukázalo, že zvýšení intracelulární hladiny NADH zlepšilo růst a produkci rozpouštědel<sup>29</sup>. Podobně tomu bylo i v mnoha dalších studiích, kde bylo zvýšení redukčního potenciálu dosaženo s využitím přidavku aditivních složek<sup>30</sup>, přímou dodávkou elektronů<sup>31</sup> nebo přidávkem elektronových mediátorů (typicky neutrální červeň, benzyl či metyl viologen)<sup>31–33</sup>, jejichž přítomnost vede k odlišné redistribuci elektronů mezi redukované kofaktory, ferredoxin a vodík.

Jedním z primárních akceptorů elektronů v centrální metabolické dráze je ferredoxin. Typickou cestou jeho regenerace je tvorba vodíku, který patří (vedle  $\text{CO}_2$ ) k hlavním plynným produktům ABE fermentace. Vzhledem k současné vizi budoucí energetické udržitelnosti a bezemisních biopaliv je vodík skloňován jako jedna z majoritních komodit uvažovaných jako alternativní biopalivo. Fermentačně vyráběný vodík se proto dostává do popředí zájmu mnohých výzkumných skupin. Přestože takto vyrobený  $\text{H}_2$  skýtá řadu nevýhod a omezení pro využití ve stávajících palivových člancích (zejména vzhledem k požadavku na jeho čistotu), je dnes další žádanou komoditou. Díky tomu je zvýšena i pozornost na regulaci jeho produkce, identifikaci a charakterizaci vybraných hydrogenas, přičemž právě zástupci rodu *Clostridium* patří mezi mikroorganismy se širokým spektrem těchto enzymů<sup>34</sup>. Podobně jako v regulaci centrální metabolické dráhy, i v regeneraci ferredoxinu a produkci vodíku existují poměrně zásadní rozdíly mezi druhy *C. acetobutylicum* a *C. beijerinckii*. Tím nejzásadnějším je přítomnost membránově vázaného komplexu Rnf u druhu *C. beijerinckii*, který u *C. acetobutylicum* zcela chybí.

Rnf komplex je proteinová struktura, jejíž název vychází z první popsané podobné struktury u *Rhodobacter – Rhodobacter nitrogen fixation*<sup>35</sup>. Jde o elektronový transportní systém asociovaný s membránou, který neslouží pouze k fixaci plynného dusíku, jak by se z názvu mohlo zdát, ale je přítomen i v genomech bakterií, které nejsou schopny dusík fixovat. Rnf je  $\text{Na}^+$  (případně  $\text{H}^+$ ) translokasa, která využívá zbylou energii získanou z oxidace ferredoxinu při redukcí  $\text{NAD}^+$  na přenos iontu přes cytoplasmatickou membránu proti jeho koncentračnímu gradientu<sup>36,37</sup>. *C. beijerinckii* a řada dalších solventogenních klostridií<sup>25</sup> takto využívá energie uvolněné při regeneraci ferredoxinu k tvorbě elektrochemického gradientu na cytoplasmatické membráně. Tento gradient je pak možné využít na tvorbu ATP za účasti  $\text{H}^+$  nebo  $\text{Na}^+$ -dependentní  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP synthasy. Celý proces může probíhat i opačným směrem, kdy je naopak endergonická redukce ferredoxinu pomocí NADH poháněna energií získanou transportem protonů<sup>38</sup>. Naopak u *C. acetobutylicum*, který Rnf komplex nemá, existují jen dvě hlavní cesty regenerace ferre-

doxinu a redukováných kofaktorů, a to přes produkci vodíku a redukováných produktů metabolismu.

## 2.2. Sporulace jako stresová odpověď?

Produkce rozpouštědel je tradičně spojována se sporulací. Buňky, které tvoří spory, vždy tvoří i rozpouštědla, přičemž ale rozpouštědla mohou být tvořena i buňkami, které nesporelují<sup>39</sup>. Co však přesně leží za spuštěním i dokončením sporulačního cyklu u solventogenních klostridií je prozatím neznámo.

Sporulace je program asymetrického buněčného dělení, který je spuštěn v reakci na signály z vnějšího prostředí a jeho výsledkem je vznik diferencované podoby bakteriální buňky – spory. Spora je většinou vysoce rezistentním, dormantním stádiem, schopným přežít desítky let a možná i mnohonásobně více. Buňka původní, mateřská, po ukončení své role ve sporulačním cyklu zaniká. U bakterií se spory tvoří uvnitř buňky a správně se tedy označují jako endospory, nicméně běžně jsou označovány jen jako spory. Morfologické znaky sporulace jsou podobné všem známým sporulujícím bakteriím a z pohledu pozorovatelných a odlišitelných znaků je lze rozdělit do 7 stádií, jejichž popis je součástí mnohých mikrobiologických učebnic a pohled na tuto část se již desítky let nemění. To, co je zajímavé a je předmětem výzkumu, je genetické zázemí sporulace, její regulace a iniciace. Modelovým organismem pro studium sporulace je *Bacillus subtilis* a tudíž se většina poznatků o bakteriální sporulaci opírá o studium tohoto druhu a i v případě studia klostridiální sporulace se vychází z nastaveného modelu. Soubor genů souvisejících se sporulací se mezi rody liší, přičemž ve většině sporotvorných rodů je přítomno jen několik desítek hlavních genů. I v případě, kdy se jedná o homology, nemusí mít u zástupců klostridií a bacilů jejich produkty stejnou funkci<sup>40,41</sup>. U obou druhů se pak nachází řada genů souvisejících se sporulací, ale postrádající homology v jiných rodech či druzích, u těchto se předpokládá, že zastávají převážně funkci regulační<sup>42</sup>. Z dostupných materiálů je zřejmé, že zejména regulace iniciace sporulace se diametrálně liší mezi zástupci rodu *Bacillus* a *Clostridium*<sup>40,43,44</sup>.

Pochopení mechanismu iniciace sporulace by jistě napomohlo i odhalení spouštěcích mechanismů tohoto děje. Řada vědců akceptuje dlouho známou teorii, že sporulace je stresová odpověď vyvolaná zejména nedostatkem živin, která buňkám pomáhá překonat období nepřízně až do znovunalezení vhodného, na živiny bohatého prostředí. V případě klostridií je pak tím stresujícím faktorem stoupající koncentrace rozpouštědel, která, byť jsou buňce vlastní, působí na ni toxicky<sup>45</sup> a v závěrečných fázích letálně. Pravdivost těchto teorií je minimálně diskutabilní a ukazuje se, že stres může naopak sporulaci potlačit<sup>46</sup> a že jednu z klíčových regulačních rolí by mohla mít mezibuněčná komunikace v podobě quorum sensing<sup>47,48</sup>. Klostridia jsou pleomorfní organismy a reagují na změny prostředí mnoha morfologickými projevy, kdy sporulace je jedním z limitních projevů a další vizuálně pozorovatelnou reakcí na stres je například prodloužení buněk<sup>49,50</sup>.

## 3. Využití alternativních surovin k produkci rozpouštědel

Původní biotechnologické výroby ABE stavěly na snadno užitelných substrátech, jako jsou bramborový škrob, řepná melasa či šťáva z cukrové třtiny<sup>20</sup>. Žádný z těchto substrátů už ale nelze v dnešní době považovat za přijatelný, neboť jejich zpracování na nepotravinářské komodity přímo konkuruje výrobě potravinářské a přesto, že se jedná o zdroj obnovitelný, jen těžko lze jeho masivní zpracování na rozpouštědla považovat za udržitelné. V bio-palivářské terminologii se jedná o suroviny tzv. první generace a přesto, že za ně stále nemáme žádnou adekvátní náhradu, veřejná i politická vůle jasně vyjadřuje odklon od jejich využívání a budoucí technologie musí stavět na surovinách jiných. Zde se sice nabízí celá řada možností, ale všechny mají svá omezení.

Materiálem tzv. druhé generace, do které je vkládána velká naděje, je odpadní lignocelulosa biomasa. Její využití v biotechnologiích ale není zdaleka triviální, stejně jako využití surovin dalších.

### 3.1. Využití lignocelulosy

Lignocelulosa biomasa, jak název sám napovídá, je složena převážně z celulosy a ligninu. Další významnou složkou jsou tzv. hemicelulosy, což jsou heteropolysacharidy sestávající z různých druhů monomerních jednotek a jejich složení i zastoupení je závislé na zdrojovém organismu. Všechny tyto komponenty jsou spolu vzájemně velmi úzce provázány a vytvářejí strukturu, která je základní složkou sekundární buněčné stěny rostlin<sup>51</sup>. Jako taková je tedy téměř neomezeným obnovitelným zdrojem, který v sobě navíc nese záporný příspěvek k bilanci oxidu uhličitého spotřebovaného pro vlastní tvorbu rostlinné hmoty. V součtu se tedy právě lignocelulosa jeví jako jasný klíč k uhlíkové neutralitě, ale... sekundární buněčná stěna slouží rostlinám nejen jako strukturální komponenta, ale také jako funkční struktura k ochraně před působením vnějších vlivů, a to jak biotických, tak i abiotických. Komplex těchto tří polymerů je natolik odolný, že je nejprve nutné celý komplex rozvolnit za podmínek, se kterými rostlina během svého dlouhého vývoje nepočítala – tj. za vysoké teploty, tlaku, působení alkalického či kyselého prostředí, ozónu, rozpouštědel, iontových kapalin a dalších<sup>52</sup>. Tento, teprve první krok, je často natolik energeticky náročný, že významně posouvá dosud neutrální bilanci CO<sub>2</sub> a neobnovitelných zdrojů, směrem ke kladným hodnotám. Těchto fyzikálních a fyzikálně chemických předúprav je dnes známá a popsána celá řada a jejich volba ovlivňuje vlastnosti výstupního materiálu, který je pak dále zpracováván.

Jsou-li formy předúpravy šetrné, je výsledkem takového ošetření většinou pevná složka bohatá na celulosu s nižším obsahem hemicelulosy a ligninu, přičemž v kapalném podílu jsou přítomny rozpustné frakce hemicelulosy, případně ligninu. V naprosté většině všech vědeckých prací se setkáváme s tím, že je kapalná fáze v tomto



roku odfiltrována, pevná část promyta a přelita vhodným pufrům, který má optimální pH pro působení následně aplikované směsi celulólytických enzymů<sup>53</sup>.

Přídavek celulólytických enzymů je vnímán negativně, protože jako jedna z nejdražších položek, značně znevýhodňuje ekonomickou bilanci. Enzymový krok lze obejít chemickým rozkladem a nejlevnější a současně asi i nejvíce používanou metodou je rozklad kyselinou sírovou<sup>52</sup>. Nešetrný přístup ovšem vede ke vzniku mnoha rozkladných produktů, které mají inhibiční charakter ve vztahu k produkčním organismům.

Ve skutečnosti se ani šetrné metody neobejdou bez tvorby tzv. inhibitorů, ale samozřejmě v menší míře. I tak se jedná o koncentrace, které zhoršují kultivační podmínky, a tím i celkové výtěžnosti, produktivity apod.<sup>54</sup> Nespočet vědeckých publikací je tedy zaměřen na možnosti, jak se s těmito inhibitory v biotechnologiích vypořádat.

### 3.1.1. Inhibitory z lignocelulosity a jejich působení na produkční organismy

Inhibitory vznikající během zpracování lignocelulosity je možné rozdělit na základě jejich chemické struktury do tří skupin, jsou to jednak alifatické organické kyseliny, dále fenolové sloučeniny a nakonec furanové deriváty. Furanové deriváty vznikají dehydratací pentos a hexos, přičemž z pentos vzniká 2-furaldehyd (furfural) a z hexos 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd (HMF)<sup>55,56</sup>. Jejich koncentrace v hydrolyzátech může být poměrně vysoká a v mnohých studiích jsou právě tyto látky označovány za původce zhoršených růstových a produkčních parametrů<sup>57,58</sup>. Působení furfuralu a jeho derivátů na buňku je komplexní, vyvolává stresovou odpověď v podobě syntézy proteinů tepelného šoku (HSP), změny v syntéze proteinů mnoha klíčových drah včetně centrálního metabolismu, ovlivnění intracelulární hladiny NADH a NAD(P)H (cit.<sup>59,60</sup>), motility a dalších<sup>61</sup>. Během zpracování lignocelulosity mohou být furfural i HMF dále degradovány na kyselinu mravenčí a HMF pak také na kyselinu levulovou. Jedná se o alifatické organické kyseliny, které v hydrolyzátech doprovází ještě kyselina octová, která ovšem nevzniká jako degradační produkt, ale hydrolyzou acetylových skupin přítomných v hemicelulose<sup>52</sup>.

Inhibiční efekt kyselin je připisován schopnosti nedisociovaných kyselin procházet cytoplasmatickou membránou, kde v intracelulárním prostoru vlivem vyššího pH opět disociují a přispívají k okyselování intracelulárního kompartmentu, což pak klade vyšší energetické nároky na pumpování H<sup>+</sup> iontů opět ven z buňky ve snaze udržet si optimální vnitřní pH (cit.<sup>27</sup>). Efekt je tedy stejný, jaký je připisován kyselinám máselné a octové, které jsou produkovány v acidogenní fázi primárního metabolismu klostridií a v tomto spojení může být tedy poměrně významný aditivní efekt.

Poslední skupinou inhibitorů vznikajících přímo z lignocelulosity jsou látky na bázi fenolu, které vznikají z ligninu. Na rozdíl od předchozích, poměrně úzkých skupin, se zde jedná o velmi širokou škálu aromatických kyselin, aldehydů a ketonů. Prozatím nejpodrobnější výčet je

dostupný v publikaci Klinke a spol. z roku 2004 (cit.<sup>62</sup>).

Lignin je heteropolymer jehož základními stavebními jednotkami jsou *p*-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol, jejichž poměr, množství i míra polymerace jsou závislé na druhu rostlinného materiálu. Během zpracování lignocelulosity dochází v závislosti na zvolených podmínkách k rozkladu ligninu, jeho převodu do kapalné frakce a vzniku řady degradačních produktů, přičemž nejčastější jsou 4-hydroxybenzaldehyd, 4-hydroxybenzoová kyselina, vanilin, dihydrokoniferylalkohol, koniferylaldehyd, syringaldehyd a syringová kyselina<sup>62</sup>. U bylinné biomasy, a to zejména obilovin a trav, je přítomno značné množství kyseliny ferulové a *p*-kumarové.

Jak přesně skupina fenolických inhibitorů na buňku působí, není uspokojivě popsáno, ale na základě jejich vyšší hydrofobity se předpokládá zejména narušení biologických membrán, destabilizace a tím i ovlivnění funkčnosti<sup>63</sup>. Studie postavené na transkriptomice a proteomice ukazují, že každá skupina látek ovlivňuje trochu jinou sadu genů a jejich produktů<sup>64,65</sup>, i tak se ale podobně jako u předchozích typů inhibitorů ukazuje, že odpověď buňky na jejich přítomnost je komplexní.

Zajímavé je, že přítomnost výše zmíněných inhibitorů v subletálních koncentracích často nevede k ovlivnění růstu klostridiální populace jako takové<sup>65</sup>, ale zásadně ovlivňuje produkční profil, a to bohužel často právě směrem k nechtěnému efektu, kterým je zvýšená produkce kyselin a snížená produkce rozpouštědel. Limitní situací je pak úplná absence solventogeneze, přičemž vlastní produkce kyselin vede v závěru k překyselení extracelulárního prostředí a buněčné smrti.

### 3.2. Nelignocelulosové substráty

Generace třetí počítá s produkcí a zpracováním biomasy z řas: jednobuněčných i velkých mořských<sup>66,67</sup>. (Poznámka: Od druhé generace dále je oficiálně používán souhrnný název – „Advanced biofuels“, tj. pokročilá biopaliva. V evropské legislativě je tato skupina definována jako ...“*biopaliva vyrobená ze surovin uvedených v příloze IX části A*“... ve Směrnici Evropského parlamentu a rady EU 2018/2001 – RED II, cit.<sup>68</sup>.)

Obrovský potenciál řas spočívá v jejich schopnosti tvořit organickou hmotu z oxidu uhličitého a sluneční energie s minimálními požadavky na živiny, tj. zdánlivě ideální volba. Ta se ale komplikuje tím, že schopnost využitelného záření procházet vodním prostředím je značně omezena. Jednobuněčné řasy tak lze efektivně produkovat jen ve velmi tenké vrstvě nebo specializovaných reaktorech, což zásadně zvyšuje požadavky na kultivační plochu a venkovní pěstování je zase omezeno jen na určité klimatické podmínky. Tyto řasy navíc dorůstají do poměrně nízkých buněčných koncentrací<sup>69</sup> a jejich efektivní sklizeň je předmětem intenzivního výzkumu<sup>70</sup>. Některé slibné projekty na pěstování tzv. makrořas, které nabízí větší koncentraci biomasy, probíhají i u evropských břehů<sup>71</sup>, ale snaha o jejich využití k výrobě biobutanolu či biolihu zatím naráží na problémy s vysokým zasolením a poněkud

atypickým složením biopolymerů<sup>72</sup>. V neposlední řadě je pak zásadní otázkou, společnou všem těmto substrátům i lignocelulose, jak z komplexní biomasy uvolnit a zpřístupnit jednotlivé složky využitelné v biotechnologiích, aniž by náklady na vstupy a energie několikrát nepřevýšily výsledný zisk.

Dalším alternativním substrátem je glycerol<sup>73</sup>, které ho je zatím nadbytek díky tomu, že se jedná o vedlejší výstupní proud z produkce bionafty. Kvůli této úzké spojitosti s diskutabilní oblastí produkce biopaliv na bázi esterů mastných kyselin z rostlinné výroby (v ČR zejména řepky) je i dostupnost glycerolu v budoucnu nejistá. Nicméně, mezi solventogenními klostridii existují druhy, které glycerol poměrně dobře využívají a hlavními primárními produkty jsou v závislosti na kultivačních podmínkách hlavně butanol a 1,3-propandiol<sup>74,75</sup>. Nejznámějším kmenem schopným využít glycerolu je *Clostridium pasteurianum* DSM 525 (cit.<sup>76</sup>). Dalším typickým zástupcem solventogenních klostridií využívajícím glycerol je druh *Clostridium diolis*<sup>77</sup>, který dostal své jméno právě podle schopnosti produkovat výše uvedený diol<sup>78</sup>.

Další variantou, která zažívá velký rozmach, je využití tzv. syntézního plynu neboli syngasu acetogeny – mikroorganismy schopnými využívat H<sub>2</sub> spolu s CO<sub>2</sub> či CO na tvorbu acetátu. Takových mikroorganismů je celá řada a má zastoupení v obou doménách prokaryotních organismů. Prvním objeveným a popsáným acetogenem byla právě bakterie rodu *Clostridium*, konkrétně *Clostridium acetivum*<sup>79</sup>. Některé acetogeny tvoří výhradně acetát, ale jiné jsou schopné vedle acetátu produkovat také ethanol, např. *Clostridium ljungdahlii*<sup>80</sup> a *Clostridium autoethanogenum*<sup>81</sup>, či při vhodné transformaci kmene také butyrát a butanol<sup>82</sup>.

Biotechnologii na podobné bázi využívá firma LanzaTech a její provozy již běží v Číně, kde jsou jako zdroj uhlíku využívány výstupní plyny z provozu oceláren. Nově byl v květnu 2023 zahájen provoz i na evropské půdě v belgickém Ghentu, projekt Steelanol<sup>83</sup>.

#### 4. Závěr

Biotechnologická produkce butanolu, případně dalších zmiňovaných rozpouštědel, představuje historicky prověřenou průmyslovou velkovýrobu chemikálií, které jsou dnes získávány výhradně z neobnovitelných zdrojů. Hlavní překážka leží zejména v ekonomice procesu využívajícího biologického činitele, který zůstává i přes obrovské pokroky v našich znalostech a dovednostech obtížně ovladatelným prvkem. Lepší pochopení regulačních mechanismů a fyziologických důsledků vnějších zásahů by mohlo vést ke zlepšení rentability biotechnologické výroby, kde solventogenní klostridia představují velmi slibné zpracovatele alternativních substrátů na bázi různých odpadních proudů. Tímto by mohly přispět k současným snahám o ekologičtější, dlouhodobě udržitelné technologie v rámci oběhového hospodářství v souladu s plněním cílů Zelené dohody pro Evropu.

Vypracováno s finanční podporou Grantové agentury České republiky v rámci projektu 23-06941S.

#### LITERATURA

1. Patáková P., Toure S. S. M., Šimáček P., Čížková H., Lipovský J., Linhová M., Fribert P., Rychtera M., Melzoch K.: Listy Cukrov. Řepař. 127, 46 (2011).
2. Jin C., Yao M., Liu H., Lee C. F. F., Ji J.: Renew. Sustain. Energy Rev. 15, 4080 (2011).
3. <https://cen.acs.org/articles/84/i26/BP-DuPont-Plan-Biobutanol.html>, staženo 31. 5. 2023.
4. Tracy B. P., Jones S. W., Fast A. G., Indurthi D. C., Papoutsakis E. T.: Curr. Opin. Biotechnol. 23, 364 (2012).
5. Servinsky M. D., Liu S., Gerlach E. S., Germane K. L., Sund C. J.: Microb. Cell Fact. 13, 139 (2014).
6. Branska B., Fořtová L., Dvořáková M., Liu H., Patakova P., Zhang J., Melzoch K.: Renew. Energy 145, 1941 (2020).
7. Xue C., Zhao J., Lu C., Yang S. T., Bai F., Tang I. C.: Biotechnol. Bioeng. 109, 2746 (2012).
8. Chen C. K., Blaschek H. P.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 170 (1999).
9. Veas C. A., Neuendorf C. S., Pflügl S.: J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 47, 753 (2020).
10. Davies E. T.: Green Process. Synth. 2, 273 (2013).
11. <https://www.celtic-renewables.com/production-facility/>, staženo 31. 5. 2023.
12. Jones D. T., Keis S., v knize: *Handbook on Clostridia* (Durre P., ed.), kap. 3, str. 37. CRC Press, USA 2005.
13. <https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/2021/12/10/ncbi-taxonomy-prokaryote-phylo-added/>, staženo 20. 6. 2023.
14. Yutin N., Galperin M. Y.: Environ. Microbiol. 15, 2631 (2013).
15. Lawson P. A., Rainey F. A.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 1009 (2016).
16. Cruz-Morales P., Orellana C. A., Moutafis G., Moonen G., Rincon G., Nielsen L. K., Marcellin E., Bapteste E.: Genome Biol. Evol. 11, 2035 (2019).
17. Keis S., Shaheen R., Jones D. T.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 2095 (2001).
18. Sedlar K., Nykrynova M., Bezdicek M., Branska B., Lengerova M., Patakova P., Skutkova H.: Processes 9, 1196 (2021).
19. Branska B., Vasyukivska M., Raschmanova H., Jurekova K., Sedlar K., Provaznik I., Patakova P.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 105, 877 (2021).
20. Jones D. T., Woods D. R.: Microbiol. Rev. 50, 484 (1986).
21. Harris L. M., Welker N. E., Papoutsakis E. T.: J. Bacteriol. 184, 3586 (2002).
22. Jones A. J., Fast A. G., Clupper M., Papoutsakis E. T.: Appl. Environ. Microbiol. 84, 597 (2018).
23. Kotte A. K., Severn O., Bean Z., Schwarz K., Minton

- N. P., Winzer K.: *Microbiology* 166, 579 (2020).
24. Siemerink M. A. J., Schwarz K., Grimm C., Kuit W., Ehrenreich A., Kengen S. W. M., v knize: *Systems Biology of Clostridium* (Durre P., ed.), kap. 8, str. 193. Imperial College Press, Singapore 2014.
  25. Poehlein A., Solano J. D. M., Flitsch S. K., Krabben P., Winzer K., Reid S. J., Jones D. T., Green E., Minton N. P., Daniel R., Durre P.: *Biotechnol. Biofuels* 10, 15 (2017).
  26. Wang Y., Li X., Mao Y., Blaschek H. P.: *BMC Genomics* 13, 102 (2012).
  27. Russell J. B., Diez-Gonzalez F.: *Adv. Microb. Physiol.* 39, 205 (1997).
  28. Drahoukoupil M., Patáková P.: *Czech J. Food Sci.* 38, 185 (2020).
  29. Liu J., Guo T., Wang D., Shen X., Liu D., Niu H., Liang L., Ying H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 4985 (2016).
  30. Xia M., Wang D., Xia Y., Shi H., Tian Z., Zheng Y., Wang M.: *Microb. Cell Fact.* 21, 1 (2022).
  31. Li J., Zhang Y., Sun K., Liu W., Yan H., Meng J.: *Energy Convers. Manage.* 251, 114987 (2022).
  32. Jiang Y., Xu C., Dong F., Yang Y., Jiang W., Yang S.: *Metab. Eng.* 11, 284 (2009).
  33. Bao T., Hou W., Wu X., Lu L., Zhang X., Yang S. T.: *Biotechnol. Bioeng.* 118, 2703 (2021).
  34. Calusinska M., Happe T., Joris B., Willemotte A.: *Microbiology* 156, 1575 (2010).
  35. Schmehl M., Jahn A., Meyer zu Vilsendorf A., Hennecke S., Masepohl B., Schuppler M., Marxer M., Oelze J., Klipp W.: *Mol. Gen. Genet.* 241, 602 (1993).
  36. Buckel W., Thauer R. K.: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1827, 94 (2013).
  37. Buckel W.: *Front. Microbiol.* 12, 2400 (2021).
  38. Westphal L., Wiechmann A., Baker J., Minton N. P., Müller V.: *J. Bacteriol.* 200, e00357-18 (2018).
  39. Branska B., Pechacova Z., Kolek J., Vasylykivska M., Patakova P.: *Biotechnol. Biofuels* 11, 99 (2018).
  40. Fimlaid K. A., Shen A.: *Curr. Opin. Microbiol.* 24, 88 (2015).
  41. Diallo M., Kengen S. W. M., López-Contreras A. M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 3533 (2021).
  42. Galperin M. Y., Mekhedov S. L., Puigbo P., Smirnov S., Wolf Y. I., Rigden D. J.: *Environ. Microbiol.* 14, 2870 (2012).
  43. Zhu D., Sorg J. A., Sun X.: *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 29 (2018).
  44. Al-Hinai M. A., Jones S. W., Papoutsakis E. T.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 19 (2015).
  45. Sedlar K., Kolek J., Gruber M., Jureckova K., Branska B., Csaba G., Vasylykivska M., Zimmer R., Patakova P., Provaznik I.: *Biotechnol. Biofuels* 12, 243 (2019).
  46. Luo H., Zheng P., Bilal M., Xie F., Zeng Q., Zhu C., Yang R., Wang Z.: *Sci. Total Environ.* 710, 136399 (2020).
  47. Steiner E., Scott J., Minton N. P., Winzer K.: *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1113 (2012).
  48. Martin-Verstraete I., Peltier J., Dupuy B.: *Toxins* 8, 153 (2016).
  49. Jiao S., Zhang Y., Wan C., Lv J., Du R., Zhang R., Han B.: *Sci. Rep.* 6, 38818 (2016).
  50. Zhang Y., Jiao S. Y., Lv J., Du R. J., Yan X. N., Wan C. X., Zhang R. J., Han B.: *Front. Microbiol.* 8, 12 (2017).
  51. Bidlack J., Malone M., Benson R.: *Proc. Okla. Acad. Sci.* 72, 51 (1992).
  52. Jönsson L. J., Martín C.: *Bioresour. Technol.* 199, 103 (2016).
  53. Paulova L., Patakova P., Branska B., Rychtera M., Melzoch K.: *Biotechnol. Adv.* 33, 1091 (2015).
  54. Baral N. R., Shah A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9151 (2014).
  55. Paulová L., Kačaba J., Patáková P., Rychtera M., Melzoch K.: *Chem. Listy* 106, 626 (2012).
  56. Jönsson L. J., Alriksson B., Nilvebrant N. O.: *Biotechnol. Biofuels* 6, 16 (2013).
  57. Liu J., Jiang Y., Chen T., Dong W., Zhang W., Ma J., Jiang M., Xin F.: *3 Biotech* 8, 406 (2018).
  58. Ujor V., Agu C. V., Gopalan V., Ezeji T. C.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6511 (2014).
  59. Ask M., Bettiga M., Mapelli V., Olsson L.: *Biotechnol. Biofuels* 6, 22 (2013).
  60. Ujor V., Bharathidasan A. K., Cornish K., Ezeji T. C.: *Appl. Energy* 136, 590 (2014).
  61. Liu H., Zhang J., Yuan J., Jiang X., Jiang L., Zhao G., Huang D., Liu B.: *Biotechnol. Biofuels* 12, 101 (2019).
  62. Klinke H. B., Thomsen A. B., Ahring B. K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 10 (2004).
  63. Liu J., Guo T., Yang T., Xu J., Tang C., Liu D., Ying H.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 86, 14 (2017).
  64. Liu H., Zhang J., Yuan J., Jiang X., Jiang L., Li Z., Yin Z., Du Y., Zhao G., Liu B., Huang D.: *Biotechnol. Biofuels* 13, 163 (2020).
  65. Patakova P., Branska B., Vasylykivska M., Jureckova K., Musilova J., Provaznik I., Sedlar K.: *Biotechnol. Adv.* 58, 107889 (2022).
  66. Hou X., From N., Angelidaki I., Huijgen W. J. J., Bjerre A. B.: *Bioresour. Technol.* 238, 16 (2017).
  67. Sunwoo I. Y., Hau N. T., Ra C. H., Jeong G. T., Kim S. K.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 185, 1075 (2018).
  68. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32018L2001>, staženo 21. 6. 2023.
  69. Day J. G.: *Biofuels* 4, 459 (2014).
  70. Milledge J. J., Heaven S.: *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 165 (2013).
  71. <https://www.wur.nl/en/project/MACROFUELS-Macro-algae-as-a-sustainable-source-for-biofuels.htm>, staženo 30. 5. 2023.
  72. Schultze-Jena A., Vroon R. C., Macleod A. K. A., Hreggviðsson G., Adalsteinsson B. T., Engelen-Smit N. P. E., de Vrije T., Budde M. A. W., van der Wal H., López-Contreras A. M., Boon M. A.: *Algal Res.* 62, 102618 (2022).

73. Almeida J. R. M., Fávoro L. C. L., Quirino B. F.: *Biotechnol. Biofuels* 5, 48 (2012).
74. Biebl H.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 18 (2001).
75. Biebl H., Marten S., Hippe H., Deckwer W. D.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 592 (1992).
76. Gallazzi A., Branska B., Marinelli F., Patakova P.: *J. Biotechnol.* 216, 29 (2015).
77. Sedlar K., Vasytkivska M., Musilova J., Branska B., Provaznik I., Patakova P.: *Genomics* 113, 1109 (2021).
78. Biebl H., Spröer C.: *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 491 (2002).
79. Wieringa K. T.: *Antonie van Leeuwenhoek* 6, 251 (1939).
80. Richter H., Molitor B., Wei H., Chen W., Aristilde L., Angenent L. T.: *Energy Environ. Sci.* 9, 2392 (2016).
81. Heffernan J. K., Valgepea K., de Souza Pinto Lemgruber R., Casini I., Plan M., Tappel R., Simpson S. D., Köpke M., Nielsen L. K., Marcellin E.: *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 204 (2020).
82. Köpke M., Held C., Hujer S., Liesegang H., Wiezer A., Wollherr A., Ehrenreich A., Liebl W., Gottschalk G., Dürre P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13087 (2010).
83. <http://www.steelanol.eu/en/news/steelanol-produces-first-ethanol>, staženo 20. 11. 2023.

**B. Branská** (*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*): **Biotechnological Production of Butanol**

The biotechnological production of butanol and other accompanying solvents has a history of more than a century and currently represents an alternative to produce desirable chemicals from various waste streams, in accordance with the concept of the circular economy. This review article summarizes the current state of potential industrial production, introduces the main solvent producers, solventogenic clostridia and their metabolism, together with the main aspects that influence physiological and production characteristics. The last part is devoted to substrates that can be used for biobutanol production, in particular lignocellulose, a ubiquitous waste plant matter, with great potential in connection with the large-scale biotechnological production of many commodities.

**Keywords:** butanol, ABE fermentation, *Clostridium*, lignocellulose, alternative substrates

*Acknowledgement*

*This work was supported by grants from the Czech Science Foundation (GACR) (Grant number: 23-06941S).*



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.

## VÝSKUM A VÝVOJ NOVÝCH PROCESOV IZOLÁCIE PRCHAVÝCH AROMATICKÝCH LÁTOK Z PRÍRODNÝCH MATERIÁLOV

JUSTÍNA ČUCHOROVÁ<sup>a,b</sup> a JAROSLAV BLAŠKO<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, <sup>b</sup> Axxence Slovakia s.r.o., Mickiewiczova 9, 811 07 Bratislava, Slovensko  
justina.cuchorova@axxence.sk, jaroslav.blasko@uniba.sk

Došlo 18.4.23, prijate 14.12.23.

Tento prehľad predstavuje dostupné a používané techniky na separáciu a následnú identifikáciu prchavých organických zlúčenín (VOC) z komplexných rastlinných matric. Prvá časť definuje VOC a ich využitie v potravinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle s konkrétnymi príkladmi. Nasledujúca časť sa týka najpoužívanejších techník separácie VOC z komplexných matric, pričom opísané výhody, nevýhody a porovnania sa líšia podľa ich základného princípu. Spomínajú sa klasické extrakčné, destilačné alebo adsorpčné metódy ako aj „zelené“ membránové metódy. V poslednej časti je popísaná metóda identifikácie separovaných aromatických VOC pomocou plynovej chromatografie, komplexnej plynovej chromatografie, olfaktometrie a menej známeho elektronického nosa. Prehľad poskytuje komplexné informácie o dostupných metodológiách na získanie aromatických VOC od úpravy vzorky až po analýzu a identifikáciu.

Kľúčové slová: prchavé organické látky, extrakcia, destilácia, membránové separačné procesy, plynová chromatografia, olfaktometria, E-nos

### Obsah

1. Úvod
2. Prchavé organické látky
  - 2.1. Prchavé organické látky v priemysle
3. Separácia prchavých organických látok
  - 3.1. Extrakčné techniky
  - 3.2. Membránové separačné techniky
4. Izolácia prchavých organických látok
5. Analýza prchavých organických látok
6. Záver a vyhladky do budúcnosti

### 1. Úvod

Aromatické prchavé organické látky (VOC – volatile organic compounds) zohrávajú významnú rolu v mnohých odvetviach priemyslu. Typickú arómu, ktorá je tvorená práve aromatickými prchavými látkami možno považovať za kľúčovú pri výbere konečného produktu spotrebiteľom. Taktiež dodávajú produktom a rastlinám vzácne špecifické vlastnosti (antioxidačné, antiparazitické, antimikrobiálne) využiteľné v širokom spektre potravinárskych, farmaceutických a kozmetických výrobkov. V súčasnosti je vysoký dopyt po prírodných prchavých aromatických látkach získavaných z rastlinných materiálov. Dôležitou úlohou je vývoj metodiky na ich separáciu a následnú identifikáciu. Používané sú rôzne metódy extrakcie, najmä kvapalinová

extrakcia, extrakcia na tuhej fáze a superkritická fluidná extrakcia. Medzi ďalšie rozšírené metodiky možno zaradiť destiláciu, a tiež membránové separačné techniky ako pervaporáciu alebo rôzne druhy osmózy. Po získaní aromatických VOC je dôležitým krokom identifikácia. Medzi najviac používané metódy patrí plynová chromatografia s rôznymi typmi detekcie, kvapalinová chromatografia a olfaktometria. Cena prírodných VOC je významne vyššia ako ich chemicky syntetizovaných náhrad, a preto je prehľad dostupných techník na separáciu a identifikáciu dôležitý pre výber najvhodnejšej metódy. Je potrebné optimalizovanie procesu ich získavania s čo najvyšším výťažkom a najnižšími nákladmi.

### 2. Prchavé organické látky

Prchavé organické látky (VOC) sú chemické zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou (v rozmedzí 50–200 Da), ktorých tlak nasýtených pár je 101,3 kPa pri 20 °C, a bodom varu v rozmedzí 50–250 °C. Patria sem skupiny zlúčenín, ako sú terpenoidy, sírne zlúčeniny, alkány, alkeny, uhľovodíky, arómáty, alkoholy, aldehydy, kyseliny, estery, ketóny a iné<sup>1</sup>. Môžu byť emitované ľuďmi, rastlinami, okolím, či priemyselnými procesmi. Listy rastlín sú považované za hlavný zdroj VOC emitovaných do atmosféry. V rastline sú považované za signálne molekuly, ktoré umožňujú špecifickú komunikáciu vo vnútor-

nom systéme rastliny, ako aj komunikáciu s vonkajším prostredím – chráni rastlinu pred bylinožravcami, hmyzom, parazitmi a hubami, vplyvmi prostredia, konkurujú iným rastlinám, priťahujú opeľovačov<sup>2</sup>. Takisto bolo preukázané, že VOC produkované rastlinami, alebo ich symbiotickými baktériami dokážu modulovať fyziologické a hormonálne časti rastlín. Toto zabezpečuje mohutný rast koreňa, väčší počet listov či kvetov, čo vedie k bohatšej produkcii plodov<sup>3</sup>. Týmito vlastnosťami sú VOC považované za významné zlúčeniny potrebné pre rozvoj agropríemyslu, najmä ako ekologické riešenie na ochranu pred škodcami<sup>4</sup>. Príkladom je indol, ktorý stimuluje rast Čínskej kapusty *Brassica rapa subsp. pekinensis* a chráni rastlinu pred napadnutím hlístovcami *Nematoda*<sup>5</sup>. Na podporu rastu je rastlinou rajčiaku jedlého *Solanum lycopersicum* využívaný 1,3-propándiol<sup>6</sup> a rastlinou divokého tabaku *Nicotiana attenuata* dimetyl-disulfid<sup>7</sup>.

Okrem funkcií prospešných pre samotnú rastlinu majú VOC mnoho iných významných úloh a sú tiež využívané ako aditíva vo viacerých druhoch priemyslu.

### 2.1. Prchavé organické látky v priemysle

Množstvo spotrebiteľov v súčasnej dobe uprednostňuje potravinárske, kozmetické a farmaceutické produkty s obsahom prírodných aromatických látok. Tieto sú schopné produktom dodať výhodné vlastnosti, ktorými môžu konkurovať syntetickým látkam. Chemické alternatívy tiež môžu častokrát spôsobovať podráždenie pokožky, vznik alergií či defektov kože<sup>8</sup>.

Antimalarický účinok esenciálneho oleja získaného hydrodestiláciou z čerstvých listov citrónovej trávy *Cymbopogon citratus* a bazalky *Ocimum gratissimum* bol skúmaný po dobu 4 dní *in vitro* na myšiach infikovaných parazitom rodu *Plasmodium berghei*, spôsobujúcim maláriu. Hlavné zložky esenciálneho oleja z citrónovej trávy boli tvorené aromatickými prchavými zlúčeninami. Výrazná antimalarická aktivita bola preukázaná u oboch olejov pri dávkovaní 200, 300 a 500 mg kg<sup>-1</sup> (cit.<sup>9</sup>).

VOC z rastlín sú považované tiež za perspektívne aditíva na zlepšenie výživovej hodnoty potravín. Vylepšenie nutričného profilu chleba bolo testované prídavkom aromatických rastlinných materiálov ako napr. zeleného čaju, paradajkového pretlaku či koriandra do receptúry, čím boli výrazne zvýšené antioxidačné a výživové hodnoty tohto produktu. Všetky prídavky boli uskutočnené v rozmedzí od 0,5 do 8 % tak, aby nebola negatívne ovplyvnená aróma chleba. Chlieb po týchto prídavkoch vykazoval navýšené antioxidačné vlastnosti takmer lineárne s množstvom pridaného rastlinného aditíva. Prídavkom rastlinného materiálu bola tiež pozmenená chuť, farba aj aróma chleba, čím sa môže stať atraktívnejším pre spotrebiteľa<sup>10</sup>.

Nie vždy sa však aromatické VOC, vyskytujúce sa priamo v rastline, dostanú až do koncového potravinárskeho produktu. V prípade ovocia kiwi *Actinidia deliciosa* bolo v čerstvo pripravenej šťave identifikovaných 15 hlavných VOC tvoriacich čerstvú, trávnatú arómu so

zelenými tónmi dotvorenú kvetinovo-ovocným podtónom. Čerstvá šťava z kiwi bola sterilizovaná dvoma spôsobmi – tepelne a bez tepelnej úpravy. Vo vzorkách po sterilizácii bola koncentrácia všetkých VOC výrazne nižšia v porovnaní s čerstvo pripravenou šťavou. Najväčší pokles VOC bol práve v tepelne sterilizovanej šťave, čo poukazuje na termickú nestabilitu aromatických VOC (cit.<sup>11</sup>).

Celosvetová spotreba prchavých aromatických látok každým rokom rastie. V roku 2022 bola spotreba potravinárskych aditív (prírodných aj chemicky syntetizovaných) v hodnote 38 miliárd USD a do roku 2028 je očakávaná spotreba v hodnote 56 miliárd USD (cit.<sup>12</sup>). Prírodné prchavé aromatické látky sa väčšinou získavajú z častí rastlinných matric, ako sú korene, kvety, listy či plody. So zvýšeným dopytom, narastá aj dopyt po nových, ekologických a ekonomicky výhodných prostriedkoch na ich separáciu a izoláciu z rastlinných materiálov.

## 3. Separácia prchavých organických látok

Separácia prírodných aromatických látok sa stala v posledných rokoch dôležitou úlohou. Prírodné VOC sú v rastlinách prítomné častokrát v nízkej koncentrácii a môžu byť chemicky či termicky nestabilné. Samotná analýza VOC z komplexných matric pozostáva z viacerých krokov – odber vzorky, predúprava vzorky, detekcia a analýza údajov. Vzorkovanie a predúprava vzorky sa radia medzi najviac časovo náročné kroky. Správnym výberom metódy na tieto kroky je znížená možnosť straty významných analytov. V súčasnosti je k dispozícii celý rad extrakčných metód na zachytávanie aromatických VOC z komplexných matric a následnú analýzu. Ich princíp je založený na prchavosti, sorpčnej kapacite a rozpustnosti daných zlúčenín<sup>13</sup>.

### 3.1. Extrakčné techniky

Medzi tradične používané postupy extrakcie v systéme tuhá fáza – kvapalina sú zaradené: macerácia, digestia a perkolácia, ktorá je vykonávaná najčastejšie vo forme Soxhletovej extrakcie (klasická, ultrazvukovo/mikrovlnne urýchlená, vysokotlaková). Pri týchto metódach je však spotrebované veľké množstvo organických rozpúšťadiel, sú náročné na čas a výťažky VOC z rastlín sú neuspokojivé<sup>13</sup>. Preto boli vyvinuté novšie metodiky na extrakciu VOC z komplexných matric.

Metóda SPME (mikroextrakcia na tuhej fáze) patrí medzi najrozšírenejšie metodiky na úpravu vzorky a následnú analýzu VOC. Táto technika bola použitá aj pri sledovaní nákazy lista viniča škodcami. Listom viniča pri napadnutí plesňou *Plasmopara viticola* sú produkované špecifické VOC, ktoré slúžia na ochranu rastliny. Pri včasnom zistení prítomnosti týchto VOC je možné vinič pred nákazou ochrániť. List viniča bol upravený homogenizáciou s tekutým dusíkom a následne extrahovaný metódou SPME. V infikovaných listoch boli obsiahnuté špecifické VOC, zatiaľ čo v neinfikovaných listoch neboli prítom-

né<sup>14</sup>. Porovnaním metód predúpravy vzorky HS-SPME (head-space mikroextrakcia tuhou fázou z priestoru nad vzorkou), SFE (superkritická fluidná extrakcia) s použitím CO<sub>2</sub> a SDE (simultánna destilácia – extrakcia) pri extrakcii aromatických VOC z bôbov fazule tonka *Dipteryx odorata* boli tiež zistené rozdiely. Pri použití metódy HD-SPME na predúpravu vzorky a následnou GC analýzou bolo identifikovaných až 156 VOC, použitím SDE 77 VOC a SFE len 36 VOC. Problémom pri SDE bola hydrolýza esterov a tiež rozpustnosť niektorých kyslíkatých zlúčenín vo vode. Pri SFE dochádzalo pri použití vyšších teplôt a tlakov ku koextrakcii väčších molekúl s vysokou retenciou. Preto bola metóda SPME vyhodnotená ako najvhovujúcejšia na extrakciu menších aromatických VOC pred GC analýzou<sup>15</sup>.

Na extrakciu SFE je možné použiť tiež freón R134a – 1,1,1,2-tetrafluóretán. Podmienky použitia freónu na extrakciu sú stanovené smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2009/32/S (cit.<sup>16</sup>). Extrakcia freónom poskytuje viaceré výhody oproti bežným extrakčným rozpúšťadlám. Freón je vysoko selektívny voči prírodným zlúčeninám najmä terpénom a ich derivátom, je chemicky odolný, získané extrakty sú vysoko čisté, má nízku viskozitu a povrchové napätie, je bez špecifickej chuti a zápachu, je ľahko odstrániteľný z extraktu vďaka jeho nízkej teplote varu (–47,6 °C) a extrakty sú získavané s vysokou účinnosťou za krátky čas pri nízkych teplotách, takže nedochádza k termickému rozkladu VOC (cit.<sup>17</sup>).

SFE freónom bola použitá na extrakciu aromatických látok z rôznych odrôd rastliny ruže. 103 jednotlivých zlúčenín bolo identifikovaných s celkovým obsahom od 89,7 % do 93,7 % v štyroch odrodách ruže. Najviac zastúpenými zlúčeninami boli 2-fenyletanol, nonadekán, nonadekén a geraniol. Metódou SFE freónom bol získaný vysokokvalitný a čistý extrakt v porovnaní so superkritickou extrakciou CO<sub>2</sub> a horúcou stlačenou vodou, pri ktorých dochádza k strate analytov v dôsledku použitia vysokých teplôt<sup>17</sup>.

### 3.2. Membránové separačné techniky

Membránové procesy sa v súčasnosti považujú za moderné, vysoko účinné separačné metódy založené na molekulárnych vlastnostiach oddeľovaných zložiek. Vo všeobecnosti je očakávané čo najlepšie oddelenie cieľového produktu od prímies matrice za čo najefektívnejších podmienok. Membrány sú charakteristické účinnosťou rozdelenia transportovaných častíc – selektivitou a množstvom pretransformovanej hmoty – permeabilitou. Selektivita býva určená najmä charakterom použitého materiálu<sup>18</sup>.

Osmóza je vo všeobecnosti označovaná za migráciu molekúl vody z hypotonického do hypertonického prostredia cez selektívne priepustnú membránu. Metóda priamej osmózy predstavuje jednoduchý a energeticky nenáročný proces s využitím prirodzenej sily osmotického tlaku. Táto metóda je široko využívaná pri príprave ovocných džúsov s mnohými výhodami, ako napríklad zachovanie čerstvej ovocnej chuti a bioaktívnych zložiek, minimálna degradá-

cia farieb, znížené zanášanie membrány, lepšia kvalita produktu bez tepelného namáhania, v porovnaní s reverznou osmózou, nanofiltráciou a ultrafiltráciou<sup>19</sup>.

Metódy osmotického odparovania (osmotic evaporation OE) a membránovej destilácie (MD) boli porovnávané z hľadiska odstránenia vody a separácie prchavých VOC citralu a etylbutyrátu z pomarančového džúsu, za účelom vytvorenia ovocného koncentráту. Ovocný koncentrát zo štiav sa považuje za výhodnejší produkt z hľadiska nákladov na dopravu a skladovanie, stabilitu produktu a väčšej mikrobiálnej rezistencie. Procesom koncentrácie by mala byť odstránená voda. Bežne sa na tento účel používa vákuové odparovanie, pri ktorom však v dôsledku vysokých teplôt dochádza k zmene aromatického profilu výsledného koncentrátu. Procesom MD bolo odseparované len polovičné množstvo vody z pomarančového džúsu, pričom transport aromatických VOC bol vyšší – pre citral 51 % a pre etylbutyrát 49 %. Pri metóde OE bol transport VOC len na úrovni 12 % pre obe zlúčeniny. Z tohto pohľadu možno OE určiť ako účinnejšiu metódu na tvorbu ovocného koncentrátu so zachovaním aromatických vlastností výsledného produktu<sup>20</sup>.

Pervaporácia (PV) býva často používaná na separáciu azeotropov, organických zmesí a organicko-vodných zmesí a tiež na separáciu VOC z ovocia, ovocných štiav, kávových a alkoholických nápojov. Výhodami PV sú nízke energetické náklady, vysoká selektivita, jednoduchosť procesu a šetrnosť k životnému prostrediu<sup>21</sup>. Účinnosť PV bola sledovaná pri získavaní izoamyl-acetátu, etyl-acetátu, izoamylalkoholu a etylalkoholu z fermentačného média kvasiniek *Pichia fermentans* cukrovej trstiny. Bola použitá polymérna membrána PERVAP™ 4060 na báze polydimetylsiloxánu (PDMS). Procesom PV bol získaný koncentrovaný produkt zmesi významných VOC v jednom kroku. Obzvlášť vhodný bol na izoláciu izoamylacetátu, ktorý tvorí typickú banánovú arómu. Výsledným produktom z tmavého kultivačného média bola bezfarebná kvapalina – pervaporácia bola účinná aj na odstránenie zafarbenia matrice<sup>22</sup>. Medzi novšie typy membrán pri procese PV sa radia viacstenné uhlíkové nanotrúbice (MWCNT/PDMS), ktoré výrazne zlepšujú separačnú účinnosť pre aromatické látky. Tieto boli sledované v porovnaní s klasickými PDMS membránami v procese separácie linaloolu, β-ionónu a metyl-salicylátu z vareného čierneho čaju. Pri výrobnom procese instantného čierneho čaju sú často používané technológie využívajúce vysoké teploty, napr. sterilizácia či sušenie. Vplyvom vysokých teplôt sú prchavé VOC s nízkou teplotou varu zničené, čo výrazne vplyva na zoslabenie typickej arómy pri príprave čaju. Preto bola metóda PV s MWCNT/PDMS membránou navrhnutá na zachytávanie týchto zlúčenín pred spracovaním čaju a ich následné navrátenie do koncového produktu. Miera obnovenia linaloolu, metyl-salicylátu a β-ionónu bola 85,8 %, 90,8 % a 83,4 %, čo bolo niekoľkonásobne vyššie v porovnaní s klasickou PDMS membránou. Tento proces bol určený za vhodný pre návratnosť aromatických VOC do koncového produktu<sup>23</sup>.

#### 4. Izolácia prchavých organických látok

Izolačné a čistiace metódy slúžia na získavanie prchavých aromatických látok, najmä pre potreby priemyselnej výroby a ich ďalšieho použitia. Mnohé z nich však majú značné obmedzenia, často sú energeticky a časovo náročné, avšak vo väčšom meradle poskytujú stále výhodné výťažky aromatických VOC z rastlinných materiálov<sup>24</sup>.

Jedným z tradičných spôsobov izolácie a čistenia aromatických VOC je destilácia, najčastejšie vykonávaná ako HD (hydrodestilácia). Táto dobre známa technika je použiteľná na veľké množstvo rastlinných matric a zabezpečuje oddelenie prchavých zložiek od neprchavých. Medzi významné limitácie tejto techniky patria nízke výťažky a tiež vysoké teploty, ktoré môžu spôsobovať rozklad termicky labilných VOC (cit.<sup>24</sup>). Výťažok HD je možné zvýšiť použitím sonikácie rastlinného materiálu pred procesom. Pri narušení semien mrkvy obcej *Daucus carota* sonikáciou bol výťažok esenciálneho oleja získaného procesom HD vyšší o 33 %. Hlavnými zložkami esenciálneho oleja boli karotol, sabinen,  $\alpha$ -pinén a daukol. Procesom sonikácie bol získaný esenciálny olej podobného kvantitatívneho aj kvalitatívneho zloženia (korelačný koeficient – 94,2 %) s rovnakými antibakteriálnymi účinkami proti niektorým druhom baktérií<sup>25</sup>. Medzi ďalšie novšie metódy na podporu účinnosti a skrátenie času klasickú HD sa radí HD podporená mikrovlnným žiarením (MAHD). Táto metóda bola testovaná napríklad pri získavaní esenciálneho oleja zo zeleru voňavého *Apium graveolens*. Medzi hlavné zložky tohto oleja sa radia limonén, *cis*- $\beta$ -ocimén,  $\gamma$ -terpinén, karvakrol a pulegonén. Použitím MAHD bol čas destilácie skrátený z 3 h na 25 min. Výťažok z procesu HD bol 1,1 % a z procesu MAHD bol 1,4 % (w/w). Kvantitatívne a kvalitatívne zloženie oboch olejov nevykazovalo významné rozdiely<sup>26</sup>.

Na obmedzenie rozkladu a straty najpolárnejších prchavých zlúčenín sa používa destilácia vodnou parou (SD). Pri tejto technike však môže dochádzať k hydrolyze VOC. Priemerný výťažok pri destilácii vodnou parou z rastlín predstavuje len 5 % (w/w). Veľké množstvo vo vode rozpustných VOC (alkoholy, ketóny, aldehydy) sa môže rozpúšťať v kondenzovanej vode. Opätovné získavanie týchto zlúčenín sa stáva významnou úlohou z ekonomického a environmentálneho hľadiska<sup>27</sup>.

Ďalšou metódou na získavanie VOC je adsorpcia, ktorá sa radí medzi najpoužívanejšie techniky zachytávania VOC rozpustených vo vodnom odpade po destilácii<sup>28</sup>. Metóda HD v kombinácii so statickou/dynamickou adsorpciou na deviatich druhoch makroporéznych živíc bola sledovaná za účelom získavania perilaldehydu z rastliny perily krovitej *Perilla frutescens*. Perilaldehyd sa radí medzi hlavné aromatické látky rastliny a je vo veľkej miere používaný v potravinárskom, parfumérskom a farmaceutickom priemysle. HD bola použitá ako metóda predbežnej izolácie VOC a následná adsorpcia vodného kondenzátu ako metóda na získanie produktu s vyšším obsahom tohto aldehydu. Adsorbenty SP-207 a XAD-4

(modifikovaný, pórovitý styrén-divinylbenzén) vykazovali najlepšiu adsorpčnú kapacitu. Ako elučné činidlo bol použitý etanol, nakoľko bola zamedzená tvorba emulzie voda-perilaldehyd<sup>29</sup>. Metódou SD je získavaný aj gerániový esenciálny olej z rastliny pelargonie vonnej *Pelargonium graveolens*. Vo vodnej frakcii bola zistená prítomnosť významných VOC, ako geraniolu, nerolu, citranelolu, linaloolu, mentónu a izomentónu. Polymérny adsorbent INDION 1014 MN-2 (styrén-divinylbenzén) bol použitý na zachytávanie týchto VOC. Po procese adsorpcie bola zistená tiež prítomnosť významných zložiek tvoriacich arómu gerániového esenciálneho oleja –  $\beta$ -damascenónu, mentolu a  $\alpha$ -terpinolu, ktoré neboli identifikované v esenciálnom oleji po SD z dôvodu nízkej koncentrácie<sup>30</sup>. Metódu adsorpcie a hydrodestilácie je možné uskutočniť aj v jednom kroku zostavením vhodnej aparatúry. Porovnávaná bola metóda hydrodestilácie v spojení s adsorpciou (HDA) v jednom kroku a klasickú HD bez kroku adsorpcie na separáciu vo vode rozpustných a nerozpustných zlúčenín a tiež VOC, predovšetkým kyselín, monoterpenov a izotiokyanátov. Ako rastlinné matrice boli použité rohovník obyčajný *Cerantonia siliqua*, rozmarín lekárske *Rosmarinus officinalis* L. a ruketa siata *Eruca sativa* (rukola). V prípade HDA boli VOC rozdelené do troch frakcií, čo umožňovalo dôkladnejšiu detekciu – vo vode nerozpustné zlúčeniny, vo vode rozpustné zlúčeniny boli adsorbované na uhlíkovom separátore a vysoko prchavé zlúčeniny boli adsorbované na uhlíkovom lapači v hornej



Obr. 1. Aparatúra na hydrodestiláciu v spojení s adsorpciou; a) kolóna s aktívnym uhlím, b) vodná vrstva, c) frakcia vo vode nerozpustných zlúčenín, d) zachytávač s aktívnym uhlím (upravený podľa cit.<sup>31</sup>)



časti aparatury na obr. 1. Adsorbované zlúčeniny boli extrahované v tej istej aparatúre dietyléterom po dobu 8 h. Metóda HDA bola u bôbov rohovníka obyčajného účinnejšia o 88,2 % na separáciu VOC ako HD, o 12 % účinnejšia u listov rozmarínu lekárskeho, u kvetov rokety siatej o 104,7 % účinnejšia a u listov rokety siatej bola účinnosť zvýšená o 27,9 % (cit.<sup>31</sup>).

## 5. Analýza prchavých organických látok

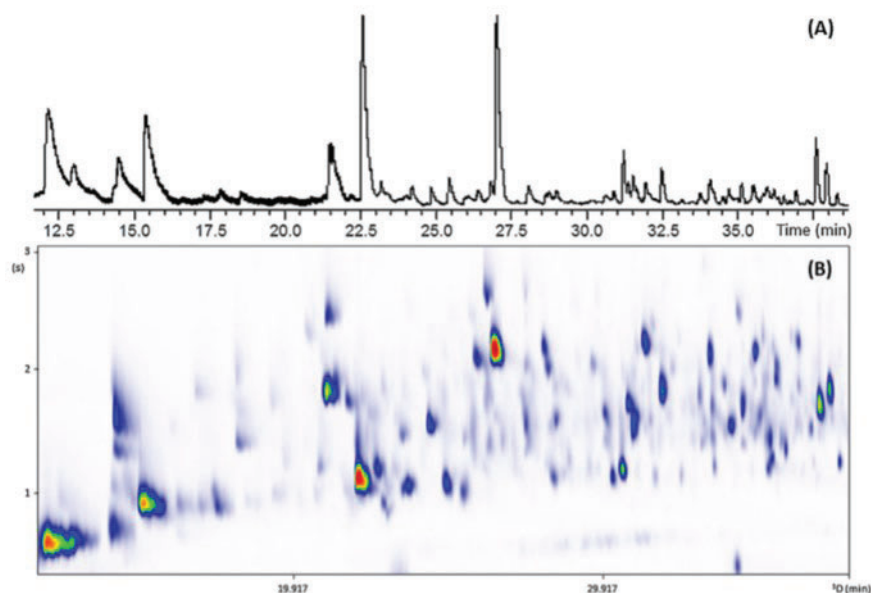
Plynovú chromatografiu možno považovať za najvhodnejšiu a najrozšírenejšiu metódu na analýzu rastlinných VOC práve z dôvodu ich prchavosti. Vývojom nových typov kolón, spôsobov detekcie, usporiadania a zavedenia vzorky je táto metóda použiteľná pre široké spektrum zlúčenín<sup>4</sup>.

Často používanou metódou na identifikáciu, separáciu a kvantifikáciu rastlinných VOC je plynová chromatografia s termálnou desorpciou s hmotnostným detektorom (TD-GC-MS). Táto metóda umožňuje aj separáciu veľmi podobných chemických zlúčenín a izomérov s vysokou citlivosťou vďaka počiatočnému predkoncentrovaniu vzorky. Ďalšou používanou alternatívou na priame monitorovanie rastlinných VOC v čase (on-line) je hmotnostná spektrometria v prúdovej trubici s vybranými iónmi (SIFT-MS). Táto mäkká ionizačná technika využíva chemickú ionizáciu VOC pomocou iónov  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{NO}^+$  a  $\text{O}_2^+$ . Ide o metódu s vysokou citlivosťou vhodnú tiež na priamu kvantitatívnu analýzu<sup>4</sup>.

Na získanie podrobnejších informácií o zložení vzorky a prekonanie limitácií jednorozmernej GC sa v súčasnosti dostáva do popredia dvojrozmerná plynová chromatografia (GC  $\times$  GC) v spojení s rôznymi typmi detekcie a predúpravy vzorky pre čo najkomplexnejšie výsledky<sup>32</sup>.

Porovnanie jedno a dvojrozmernej GC bolo sledované na vzorkách esenciálneho oleja z dvoch druhov rastliny mäty *Mentha spicata* a *Mentha piperita*. Použitá bola jednorozmerná GC v spojení s hmotnostnou spektrometriou MS s kvadrupólovým analyzátorom a dvojrozmerný systém GC  $\times$  GC s plameňovo-ionizačným FID detektorom. V esenciálnom oleji z rastliny *Mentha piperita* bolo metódou GC  $\times$  GC identifikovaných 89 VOC v porovnaní s 30 VOC pri GC. V rastline *Mentha spicata* bolo identifikovaných metódou GC  $\times$  GC 68 VOC oproti 28 VOC metódou GC. Dvojrozmerný systém bol vyhodnotený ako efektívnejší na získanie aromatického profilu z komplexnej matrice<sup>33</sup>. Metóda GC  $\times$  GC/MS bola tiež vyhodnotená ako efektívnejšia pri analýze VOC v rastline artičoku zeleninového *Cynara scolymus* L. Pomocou 2D GC bolo identifikovaných až 130 aromatických VOC v rastline artičoku, čo predstavovalo štyrikrát viac identifikovaných VOC v porovnaní s jednorozmernou GC. Na obr. 2 sú porovnané chromatogramy z analýzy listov artičoku z jednorozmernej a dvojrozmernej GC s MS detektorom<sup>34</sup>.

Rozšíreným spôsobom detekcie aromaticky aktívnych látok na hodnotenie aróm, potravín a environmentálnych vzoriek sa tiež stáva olfaktometria. Detekciu aróma-aktívnych látok zabezpečuje olfaktometer, najčastejšie



Obr. 2. Porovnanie chromatogramov z analýzy listov Artičoku jedlého; A) chromatogram z jednorozmernej plynovej chromatografie, B) chromatogram z komprehenzívnej plynovej chromatografie (upravený podľa cit.<sup>34</sup>). Farebná verzia obrázku je k dispozícii na webovej stránke časopisu Chemické listy.

ľudský element – nos, táto detekcia je však veľmi individuálna a ohraničená schopnosťami ľudskeho faktora, pričom na detekciu vplyva veľké množstvo podnetov<sup>35</sup>.

Spojením olfaktometrie s tradičnou plynovou chromatografiou (GC-O) je vytvorený vhodný nástroj na identifikáciu aróma-aktívnych látok. GC-O bola napríklad použitá ako doplnková metóda na zistenie aróma-aktívnych látok vo vzorkách vína druhu Merlot. Metódou GC-MS bolo identifikovaných 43 prchavých VOC a metódou GC × GC-MS až 142 VOC v rovnakej vzorke vína. Následne doplnkovou metódou GC-O-MS/FID (FID -flame ionization detector/plameňovo ionizačný detektor) bolo identifikovaných 38 aróma-aktívnych látok, ktoré pri klasickom 1D systéme koeluovali s inými VOC (cit.<sup>36</sup>). Ľudský nos je možné nahradiť E-nosom, systémom heterogénnych elektrochemických plynových senzorov so špecifickým rozpoznávaním analytu<sup>35</sup>.

E-nos spoľahlivo eliminuje individuálne faktory ľudskeho nosa. Na výrobu senzorov sú bežne používané oxidy kovov alebo rôzne typy vodivých polymérov. Okrem vodivých materiálov sú používané aj optické senzory, senzory povrchovo aktívnych vln, tranzistory a mikro-mechanické systémy<sup>35</sup>. Ďalšia dôležitá súčasť systému E-nosa je tvorená algoritmami rozpoznávania, ktoré sú stále vo vývoji buď v samostatnom móde učenia alebo učením s dohľadom. Rozlišovací systém E-nosu bol napríklad použitý na hodnotenie kvality ryže. Procesom nesprávneho alebo príliš dlhého skladovania sa aróma ryže nepriaznivo mení. Vznikajúce aldehydy, ketóny, alkoholy a iné prchavé zlúčeniny boli detegované systémom chemických senzorov počas celého procesu skladovania ryže, čím sa stali vhodným nástrojom na kontrolu kvality tohto produktu<sup>37</sup>. Pri vývoji technológie E-nosa je kladený veľký dôraz na miniaturizáciu, v súčasnosti je však použitie limitované najmä algoritmami rozpoznávania a samotnými senzormi, ktorých vývoj napreduje<sup>35</sup>.

## 6. Záver a vyhlídky do budúcnosti

Práca predstavuje využitie aromatických látok v rôznych odvetviach priemyslu a ich dôležitosť. Keďže sú ceny prírodných VOC vyššie v porovnaní so syntetickými náhradami a dopyt neustále narastá, je nutné predkladať účinné, rýchle, jednoduché a lacné metódy na ich získavanie. V práci sú stručne zhrnuté najbežnejšie používané metódy pre získavanie prírodných aromatických látok z rastlinných materiálov so zahrnutím membránových procesov. Taktiež sú popísané niektoré novšie a účinnejšie postupy predúpravy vzorky, ako napríklad superkritická fluidná extrakcia freónom.

Práca tiež poukazuje na nutnosť využívať podporné postupy, ktorými je možné zvýšiť účinnosť zaužívaných metód, ako sú napríklad hydrodestilácia. A to použitím sonikácie rastlinného materiálu pred procesom, podporou mikrovlnným žiarením či spájaním s inými metodikami ako napríklad s adsorpciou.

Implementovanie týchto postupov do praxe však vyžaduje vyššie počiatkové investície, ďalšie štúdium a optimalizáciu podmienok. Pokrok môže predstavovať najmä zavádzanie membránových separačných procesov, ktoré sú vysoko energeticky efektívne a umožňujú izoláciu VOC bez nutnosti teplotného namáhania.

*Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmlúv č. APVV-17-0281, APVV-18-0282 a APVV-20-0317, a vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt Zvýšenie kapacít a kompetencií Univerzity Komenského vo výskume, vývoji a inováciách, ITMS2014+: 313021BUZ3, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.*

### Zoznam skratiek a značiek

FID	plameňovo-ionizačný detektor (flame-ionization detector)
FO	priama osmóza (forward osmotic)
GC-O	plynová chromatografia v spojení s olfaktometriou
HD	hydrodestilácia
HDA	hydrodestilácia v spojení s adsorpciou
HS	priestor nad vzorkou (head space)
MAHD	hydrodestilácia podporená mikrovlnným žiarením
MD	membránová destilácia
ME	membránová elektrolyza
MF	mikrofiltrácia
MWCNT	mnohostenno uhlíkové nanorúrky
OF	olfaktometria
NF	nanofiltrácia
OE	osmotické odparovanie (osmotic evaporation)
PDMS	polydimetylsiloxán
PET	polyetyléntereftalát
PV	pervaporácia
RO	reverzná osmóza
SD	destilácia vodnou parou
SDE	simultánna destilácia – extrakcia
SFE	superkritická fluidná extrakcia
SIFT-MS	hmotnostná spektrometria v prúdovej trubici s vybranými iónmi
SPE	extrakcia na tuhej fáze
SPME	mikroextrakcia na tuhej fáze
TD-GC	plynová chromatografia s termálnou desorpciou
TF-SPME	mikroextrakcia tenkou vrstvou tuhej fázy
UF	ultrafiltrácia
VOC	prchavá organická látka

### LITERATÚRA

1. Pozzer A. C., Gómez P. A., Weiss J.: *Sci. Total Environ.* 838, 156155 (2022).

2. Cordovez V., Carrion V. J., Etalo D. W., Mumm R., Zhu H., van Wezel G. P., Raaijmakers J. M.: *Front. Microbiol.* 6, 1081 (2015).
3. Poveda J.: *Appl. Soil Ecol.* 168, 104118 (2021).
4. Materić D., Bruhn D., Turner C., Morgan G., Mason N., Gauci V.: *Appl. Plant Sci.* 3, 1500044 (2015).
5. Yu S. M., Lee Y. H.: *Plant Soil* 370, 485 (2013).
6. Has T., Gu Q., Wu H., Raza W., Hanif A., Wu L., Colman M. V., Gao X.: *Front. Microbiol.* 8, 171 (2017).
7. Meldau G. D., Meldau S., Hoang H. L., Underberg S., Wünsche H., Baldwin T. I.: *Plant Cell* 25, 2731 (2013).
8. Goncalves S., Mansinhos I., Romano A., v knihe: *Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases* (Colin R. M., Preedy R. V., ed.), kap. 11, str. 155. Elsevier Inc., Londýn 2020.
9. Tchoumboungang F., Amvam Zollo P. H., Dagne E., Mekonnen Y.: *Planta Med* 71, 20 (2005).
10. Filipčev B., v knihe: *Feed Additives* (Florou-Paneri P., Christaki E., Giannenas I., ed.), kap. 16, str. 279. Elsevier Inc., Londýn 2020.
11. Zhao Y., Wang P., Zhan P., Tian H., Lu C., Tian P.: *Food Res. Int.* 139, 109841 (2020).
12. <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/global-food-additives-market>, stažené 18. 4. 2023.
13. Labuda J., Špánik I., Tarapčík P., Hrouzková S., Vrábek V., Benická E., Hroboňová K., Sádecká J., Beinrohr E., Liptaj T., v knihe: *Analytická chémia*, str. 81. Slovenská technická univerzita, Bratislava 2014.
14. Ricciardi V. a 11 spoluautorov: *Plant Physiol. Biochem.* 160, 294 (2021).
15. Bajer T., Surmová S., Eisner A., Ventura K., Bajerová P.: *Ind. Crop Prod.* 119, 313 (2018).
16. Smernica európskeho parlamentu a rady 2009/32/ES o aproximácii právnych predpisov členských štátov o extrakčných rozpúšťadlách používaných pri výrobe potravín a zložiek potravín. Úradný vestník Európskej únie 141/3. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:141:0003:0011:SK:PDF>
17. Dobrevá A., Nedeltcheva-Antonova D., Nenov N., Getchovska K., Antonov L.: *Molecules* 26, 4991 (2021).
18. Boyona J. M., Pawliszyn J., Dugo P., Le X. Ch., Lee H. K., Li X.-F., Lord H., v knihe: *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 2. vyd, kap. 2.22, str. 461. Elsevier, Londýn 2012.
19. Cath T. Y., Childress A. E., Elimelech M.: *J. Membr. Sci.* 281, 70 (2006).
20. Alves V. D., Coelho I. M.: *J. Food Eng.* 74, 125 (2006).
21. Maji S., Banerjee S.: *J. Membr. Sci.* 349, 145 (2010).
22. Rossi S. C., Medeiros A. B. P., Weschemfelder T. A., Scheer A. P., Soccol C. R.: *Bioproc. Biosystems Eng.* 40, 959 (2017).
23. Li J., Liao H., Sun Y., Li R., Zhu B., Zhong Z., Yao Z.: *Sep. Purif. Technol.* 259, 118101 (2021).
24. Kumar R., Tripathi Y. C., v knihe: *Training Manual on Extraction Technology of Natural Dyes & Aroma Therapy and Cultivation Value Addition of Medicinal Plants*, 1. vyd, str. 77, Dehradun 2011.
25. Smigielsky K. B., Majewska M., Kunicka-Styczynska A., Gruska R.: *J. Essent. Oil Bear. Plant* 17, 1075 (2014).
26. Moradalizadeh M., Akhgar M. R., Faghihi-Zarandi A.: *Asian J. Chem.* 25, 79 (2013).
27. Sánchez-Vioquea R., Polissiouc M., Astrakac K., de los Mozos-Pascual M., Tarantilis P., Herraiz-Penalver D., Santana-Méridas O.: *Ind. Crops Prod.* 49, 150 (2013).
28. Machale K. W., Niranjana K., Pangarkar W. G.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69, 362 (1997).
29. Chang X., Xu H., Wang D., Feng Y., Zhan P.: *Sep. Sci. Technol.* 48, 1226 (2013).
30. Amin L. P., Pangarkar V. G., Beenackers A.: *Sep. Sci. Technol.* 36, 3639 (2001).
31. Mastelic J., Jerkovic I., Blazevic I., Radoni A., Krstulovic L.: *Talanta* 76, 885 (2008).
32. Kamatou G., Sandasi M., Tankeu S., van Vuuren S., Viljoen A.: *Rev. Bras. Pharmacogn.* 29, 351 (2019).
33. Dimandja J. M. D., Stanfill S. B., Grainger J., Patterson D. G.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 208 (2000).
34. Saucier C., Polidoro A. S., Santos A. L., Schneider J. K., Caramão E. B., Jacques R. A.: *Ind. Crops Prod.* 62, 507 (2014).
35. Loutfi A., Coradeschi S., Mani G. K., Shankar P., Rayappan J. B. B.: *J. Food Eng.* 144, 103 (2015).
36. Welke J. E., Nicolli K. P., Hernandez K. C., Camarão Telles Biasoto A., Zini C. A.: *Food Chem.* 370, 131004 (2022).
37. Xu J., Liu K., Zhang Ch.: *Trends Food Sci. Technol.* 109, 83 (2021).

**J. Čuchorová<sup>a,b</sup> and J. Blaško<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University Bratislava, Bratislava, Slovakia, <sup>b</sup> Axxence Slovakia s.r.o., Bratislava, Slovakia): **Research and Development of New Processes for the Isolation of Volatile Aromatic Substances from Natural Materials**

This review presents available techniques used for the separation and subsequent identification of volatile organic compounds (VOC) from complex plant matrices. The first part defines the plant material as well as the VOC and their using in the food, pharmaceutical and cosmetic industries with specific examples. The next section relates to the most widely used techniques to separate VOCs from complex matrices, where the advantages, disadvantages and comparisons described differ according to their basic principles. Classical extraction, distillation or

adsorption methods, as well as "green" membrane procedures are mentioned. The last part describes the method of identification of separated aromatic VOCs by gas chromatography, comprehensive gas chromatography, olfactometry, and the lesser-known electronic nose. The review provides comprehensive information about available methodologies for obtaining aromatic VOCs from sample pretreatment to analyses and identification.

Keywords: volatile organic compounds, extraction, distillation, membrane separation, gas chromatography, olfactometry, E-nose

#### *Acknowledgements*

*This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract numbers APVV-17-0281, APVV-18-0282 and APVV-20-0317. This work was also supported by the Operation Program of Integrated Infrastructure for the project, UpScale of Comenius University Capacities and Competence in Research, Development and Innovation, ITMS2014+: 313021BUZ3, co-financed by the European Regional Development Fund.*



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.

## VYUŽITÍ MODERNÍCH VÝPOČTOVÝCH METOD A NEURONOVÝCH SÍTÍ K OPTIMALIZACI METODY PRO LC/MS/MS ANALÝZU VOJENSKY VÝZNAMNÝCH ORGANOFOSFOROVÝCH LÁTEK

**DUŠAN TREFILÍK**

Ústav ochrany proti zbraním hromadného ničení, Víta Nejedlého, 682 01 Vyškov, Česká republika  
dusan.trefilik@unob.cz

Došlo 1.6.23, přepracováno 30.10.23, přijato 13.11.23.

Hledání optimálního nastavení podmínek chemické analýzy je zpravidla zdoluhavý proces. Tento článek k tomuto účelu navrhuje využití neuronových sítí, zejména ve vztahu k určení optimální podmínek pro analýzu zkoumaných látek s využitím technologie LC/MS/MS a ESI ionizací, a to na základě znalosti jejich základních vlastností, označených jako univerzální deskriptory. Práce se soustředí na nalezení takových podmínek analýzy, kdy dochází k maximalizaci signálu iontu prekursoru. Práce se zabývá zejména otázkou, zda lze výsledky zjištěné na jednom typu analytu použít k neurální interpolační predikci optimálních podmínek analytů podobných.

**Klíčová slova:** LC/MS/MS, neuronové sítě, funkcionál elektronové hustoty, novičok, organofosfáty, kvantová chemie, optimalizace

*Prohlášení autora*

*Pracoviště je držitelem licence č.7/2012 pro nakládání s vysoce nebezpečnými látkami udělené rozhodnutím č. j.: SÚJB/OKZCHZ/27362/2012 dle §8 a 13 zákona č. 19/1997 Sb., s následnými změnami rozhodnutí o změnách licence: č. j. SÚJB/OKZCHBZ/25919/2014, a SÚJB/OKZCHBZ/7593/2020. V rámci experimentálních prací byly látky spadající pod tuto licenci zlikvidovány dle vnitřního předpisu a dle zákona č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví.*

### Úvod

Nervově paralytické látky, organofosfáty, jsou jedny z nejtoxičtějších synteticky získaných chemických sloučenin, jaké lidstvo poznalo. Jejich primárním působením je deaktivace acetylcholinesterasy (AChE), jakožto klíčového enzymu zodpovědného za udržování funkční koncentrace neurotransmiteru acetylcholinu v postsynaptické neuronové mezeře<sup>1,2</sup>. Rychlost účinku těchto látek a jejich smrtící efektivita vůči teplokrevným organismům vedla státní i nestátní aktéry k jejich vývoji s cílem zneužít těchto jejich vlastností proti člověku.

Časový a geopolitický vývoj na bojišti vedl k úvahám, zda nervově paralytické látky označované jako G-série [tabun (GA), sarin (GB), soman (GD), cyklosarin (GF)] nebo V-série (VX, VR, CVX) lze nevyhnutelně využít pouze jako bojové, nebo zda jejich potenciální modifikací nelze získat sloučeniny vhodnější, které bude možné lépe využít k diverzním účelům, k likvidaci vysoce zájmových osob<sup>3</sup>.

Tento posun lze historicky vysledovat i v současnosti, kdy se bojové využití látky GB prokázalo v Syrské občanské válce v letech 2013 (cit.<sup>4</sup>) a 2017 (cit.<sup>5</sup>), ale také k cílené likvidaci nevlastního bratra vůdce KLDK Kim

Čong-una s využitím vhodnější látky VX, a to přímo na letišti v Kuala Lumpur na začátku roku 2017 (cit.<sup>6</sup>).

Uvedené události vedly k potvrzení, že zmíněné látky jsou stále hrozbou pro mezinárodní společenství a aktivovaly zpřísnění kontrolních mechanismů definovaných OPCW (cit.<sup>7</sup>). Do seznamů látek podléhajících přísné kontrole byly následně zařazeny také látky tzv. A-série, známé pod názvem novičoky, právě na základě jejich využití při pokusu o likvidaci Sergeje Skripala a jeho dcery Julie v březnu 2018 v městě Salisbury ve Velké Británii<sup>8-10</sup> s vyjádřením nutnosti mít dostupnou identifikační instrumentaci se stopovou až ultrastopovou dispozicí. Prokázala se tak domněnka, že téměř 50 let starý sovětský projekt tzv. látek čtvrté generace<sup>11</sup>, vznikající v rámci studené války, je stále aktivní a jeho výsledky jsou využívány k pokusům o likvidaci lidských cílů.

Posledně zmiňovaný incident tak na úrovni vyšetřovatelské katalyzoval snahu o zjištění původu těchto látek a identifikaci domnělých pachatelů, ale také opodstatnil nutnost výzkumu v oblasti ochrany proti těmto hrozbám, a to zejména v oblasti analýzy, dekontaminace a výzkumu kladoucích si za cíl tyto látky strukturně a chemicky popsat, definovat jejich pravděpodobné vlastnosti a toxicitu.

Absence dostatečných analytických dat v souvislosti s látkami A-série a různorodost v uniklých informacích z přísně utajovaného sovětského projektu vedla výzkumná pracoviště k syntézám všech jejich předpokládaných struktur. Následné studium těchto látek tak umožnilo zhodnotit, zda jsou skutečně nositeli predikovaných vlastností a nakolik jsou jejich analytická data v souladu se vzorky získanými v již zmiňovaném Salisbury. Vedle struktur popisovaných Hoenigem<sup>12</sup> a Ellisonem<sup>13</sup> se jako nejpravděpodobnější ukázala struktura Mirzyanovova<sup>14,15</sup>.

Význam látek A-série, ať už do bojového či diverzního použití, je tak neoddiskutovatelný. Pro vývoj účinné ochrany proti nim je třeba je podrobně studovat a následně zefektivňovat proces jejich chemické analýzy různými metodami a z rozličných matic, nejlépe jej pak následně unifikovat do přehledné metodiky.

#### Využití teorie funkcionálu elektronové hustoty (DFT)

Teorie funkcionálu elektronové hustoty je metoda stavějící na mechanismech kvantové chemie, která na základě znalosti chemické struktury organických látek a prostředí, ve kterém se nacházejí, dokáže optimalizovat studovanou molekulu co do délky vazeb, jejich vibračních stavů, vazebných úhlů, mohutnosti elektrického potenciálu, aj.<sup>16–19</sup> Na základě vypočítaných dat lze pak efektivně odhadovat lokaci a robustnost HOMO a LUMO orbitalů, vytvořit 3-D pravděpodobnostní mapu hustoty elektronů, vektorovat na molekule dipólový moment a na těchto kvantovaných fyzikálně-chemických veličinách provádět relativně přesné odhady v rozličných aplikacích<sup>20</sup>.

Carlsen<sup>15</sup> využil široké řady softwarových prostředků využívajících také DFT jako PASS, T.E.S.T., ACD/iLab, F.D.S.P.C., ACD/Percepta a QSAR Toolbox k výpočtům popisujícím pravděpodobnost konkrétní biologické aktivity vybraných sloučenin a na základě těchto odhadů uzavírá, že je zde patrný zjevný rozdíl mezi biologickou aktivitou látek z V-série oproti A-sérii, a co do bojového použití jejich výsledky mluví v neprospěch A-série. Autoři sami v dílčím závěru označují nízkou pravděpodobnost blokace cholinergního přenosu vzruchu látkami z A-série za překvapující.

Khafa a spol.<sup>21</sup> ve své práci graficky vyjádřili elektronovou hustotu vybraných zástupců bojových chemických látek a na tomto základě následně posoudili jejich dispoziční k chemickým reakcím dle vizualizací dislokace elektrostatického náboje na molekule.

Bhakhoa a spol.<sup>20</sup> metodou M06-2X/6-311+G(d,p) vyčíslili veličiny, které mají enormní význam na úvahy týkající se reaktivity, stability a dispoziční k reakcím. Tyto veličiny označují za deskriptory reaktivity. Na základě vypočítaných energetických bilancí na molekule autoři tyto deskriptory dále konkretizovali s tvrzením, že rozvíjejí představu o ionizačních a elektronově afinitních vlastnostech molekuly. Tvrdí, že tyto deskriptory reaktivity umožňují objektivně zhodnotit celkovou stabilitu molekul zkoumaných látek. Rozdíl mezi energiemi hraničních or-

bitalů označují za ukazatel stability a konstatují, že tento roste následovně:  $VX < VR < A-234 < GB$ .

Autoři Wang a spol.<sup>22</sup> dále rozvíjejí úvahu, že velká HOMO-LUMO energetická mezera je ve zřejmém vztahu s dipólovým momentem, a ve své studii se věnují diskusi korelace energetické bariéry s dipólovým momentem a dalších veličin souvisejících s mapováním elektronové hustoty molekuly.

Na základě těchto zjištění lze usuzovat, že nervově paralytické látky jsou obecně silně elektrofilní a jsou tedy ochotné akceptovat příchozí elektronovou hustotu od nukleofilních ložisek jako kyslík, dusík a síra, které jsou z toho pohledu donorovými atomy přednostně působící jako elektropozitivní centra nervově paralytických látek.

DFT analýza zkoumaných molekul, resp. její výstupy ve formě rozličně interpretovatelných energetických veličin, tak vnáší zajímavý pohled na hodnocení dispoziční molekuly k reakcím, k hodnocení její polarity, ionizačního potenciálu a elektronové afinity, a umožňuje analytikovi předpokládat případné komplikace, a hledat na ně řešení již v části plánování experimentu. Otázkou zůstává kontroverznost využití těchto moderních metod např. pro vývoj nových bojových chemických látek, kdy lze modelovat jejich hypotetické vlastnosti, zkoumat dispoziční k reakcím a jejich biologickou aktivitu.

#### LC/MS/MS analýza vysoce nebezpečných organofosforových látek

V otázce využití těchto poznatků v oblasti LC/MS/MS analýzy jsou, v případě LC části, využitelné úvahy týkající se přípravy vzorků, vhodného zvolení příslušné kolony a vhodné kombinace mobilních fází a pro vhodnou volbu jejich modifikátorů. Vliv zmiňovaných deskriptorů pro hmotově identifikační část je neoddiskutovatelná z hlediska určení vhodnosti zkoumané látky pro ESI techniku a nese s sebou informaci o volbě velikosti ionizačního napětí z důvodu možné nežádoucí fragmentace zkoumané molekuly již v této předčásti MS/MS systému.

Využití LC metody pro analýzu organofosforových bojových chemických látek (BCHL) bez tandemem s další identifikační metodou nelze považovat za využívaný postup. Je to dáno zejména hydrolytickými predispozičními těchto látek, a tak přímá analýza, navíc s velkými kvantitativně analytickými ambicemi, zde nedává příliš smysl. Také možnosti derivatizace rozkladných produktů tohoto typu vzorku, toliko pro GC/MS využívanými silylačními činidly, je u tohoto typu instrumentace principiálně nemožná.

Naprosto běžně se ovšem s výhodou a vysokou citlivostí využívá tandemem LC/MS/MS k analýze rozkladných produktů či vysokomolekulárních aduktů organofosforových BCHL s afinitními proteiny. Oudejans<sup>23</sup> metodou LC/MS/MS analyzoval látku VX v souvislosti s její stálostí v porézních materiálech po dekontaminaci. OPCW a Lee<sup>24</sup> označují metodu LC/MS/MS jako efektivní nástroj k forenzní analýze environmentálních a biomedicinských vzorků, kde se dá s úspěchem dosahovat v identifikaci

rozkladných a metabolických produktů citlivosti řádově  $1 \text{ ng ml}^{-1}$ , resp.  $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$  při práci v módu iontové selekce (SIM). Tsuchihashi<sup>25</sup> nebo Katagi<sup>26</sup> zdůrazňují význam metody LC/MS/MS při možném zneužití látky VX, kdy stavějí na své historicky stále nepříliš vzdálené analytické zkušenosti se zneužitím sarinu v tokijském metru.

Bryant<sup>27</sup> ve své studii využíval LC/MS/MS a zjistil, že degradační metabolické produkty těchto látek jsou mnohem stabilnější, nežli jejich „rodiče“. Jejich množství v biologickém vzorku je tak vhodným měřítkem intenzity intoxikace jedince.

GC/MS je pro analýzu organofosfátů velmi efektivní metoda, nicméně má své limity pro analýzu jejich rozkladných produktů, kdy je nelze stanovovat přímo a je třeba vhodně derivatizovat a tudíž komplikovaně převádět rozkladné produkty do organického rozpouštědla<sup>28–30</sup>.

Mirbabaee při studiu<sup>31</sup> biodegradace A-234 použil triplkvadrupól Agilent 6410B. Výsledkem studie bylo zjištění, že A-234 je významným urinálním markerem intoxikace touto látkou a byla prokázána přítomnost aduktů A-234 s aminokyselinou tyrosinem a enzymem AChE.

LC/MS/MS metoda se tak stala poměrně atraktivní formou určování degradačních produktů bojových chemických látek využívajíc jejich stálosti, relativní polarizability, která umožňuje přímou analýzu vodných vzorků nebo vodných extraktů s jejich nevýznamnou nebo žádnou další úpravou.

Neuronové sítě jako nástroj pro zpracování objemného množství dat

Pokusy transformovat neurální propojení v lidském mozku do matematického modelu, který by byl schopen složité nelinearity postihnout, jsou známé již v počátcích 40. let 20. století. Zjistilo se, že navrhnout strukturu modelu nebude nikterak složité, neboť jde jen o to zkopírovat analogii fungování neuronové sítě v mozku a vhodně ji modifikovat. Donald Hebb<sup>32</sup> v roce 1949 ve své přelomové monografii tak na základě svého studia této biologické analogie a podmíněných reflexů definoval algoritmus, který umožňoval učit neuron změnou vah jeho vstupů. Vyšel tak z jednoduché myšlenky, že pokud je neuron excitován korektně, pak se posílí spoje, které k excitaci vedly. Naopak pokud bude excitován nesprávně, je třeba tyto spoje oslabit. Metoda ve svých počátcích neumožňovala realizovat složitější aplikace, neboť by vyžadovaly daleko rozsáhlejší topologii neuronové sítě, a tím i řádově vyšší náročnost na výpočetní výkon. Vývoj neuronových sítí také brzdila skutečnost, že nebyl dlouho definován algoritmus učení vícevrstvých neuronových sítí. Ten byl postaven až roku 1986 na principu zpětného šíření chyby. S postupným rozmachem informačních technologií ekvivalentně tomu rostla i složitost reálně využitelných topologií i počet aplikací, včetně těch využitelných v oboru chemie<sup>33</sup>.

Příkladem budiž klasifikace vín<sup>34</sup>, která řeší hypotetický problém, zda lze ze souboru různorodých chemických deskriptorů zjistitelných jednoduchou chemickou

analýzou odhadnout s využitím neuronové sítě jejich původ, tedy konkrétní vinařství. Byla vzata vína bez ohledu na jejich druh ze tří různých lokálně příbuzných vinařství a byla provedena chemická analýza 13 vlastností (z nejdůležitějších: obsah alkoholu, kyseliny jablečné, obsah usazenin, pH usazenin, obsah hořčiku, fenolu, intenzita zbarvení, aj.). Ke každému takto popsanému vínu bylo přiřazeno vinařství. Tento soubor dat sloužil k tomu, aby se neuronová síť o deseti skrytých vrstvách naučila s definovanou chybou rozeznávat, která vína patří jakému vinařství.

Gasteiger<sup>33</sup> popisuje využití neuronových sítí v různých oblastech chemie, konkrétně v odhadování chemické reaktivity, kde deskriptory jako totální náboj, disociační energie, elektronegativita, polarita byly vstupem do sítě a výstupem byla očekávaná reaktivita. Tento model pak Röse<sup>35</sup> realizoval na výzkumu zabývajícím se predikcí heterolyticky štěpících se vazeb a odhadu reaktivity chemických reakcí. Cílem bylo vytvořit širokou databázi elementárních reakcí ve vazbě na rozdílné fyzikálně-chemické parametry těchto reakcí. Následně pak využít strojového učení k predikci složitějších reakcí s využitím zmíněné databáze s myšlenkou, že tuto znalostní databázi lze dále doplňovat a výsledky zlepšovat.

Tusar<sup>36</sup> při HPLC analýze komponentů vín španělského původu sledoval závislosti pH na obsahu alkoholu. Podle schopnosti dělit jednotlivé charakteristické komponenty vína spočítal faktor selektivity SF. S pomocí modelovacího nástroje publikovaného Zupanem<sup>37</sup> založeném na metodě nejmenších čtverců promítl 3-D graf do půdorysné roviny a interpoloval závislost faktoru selektivity SF na již zmíněných veličinách.

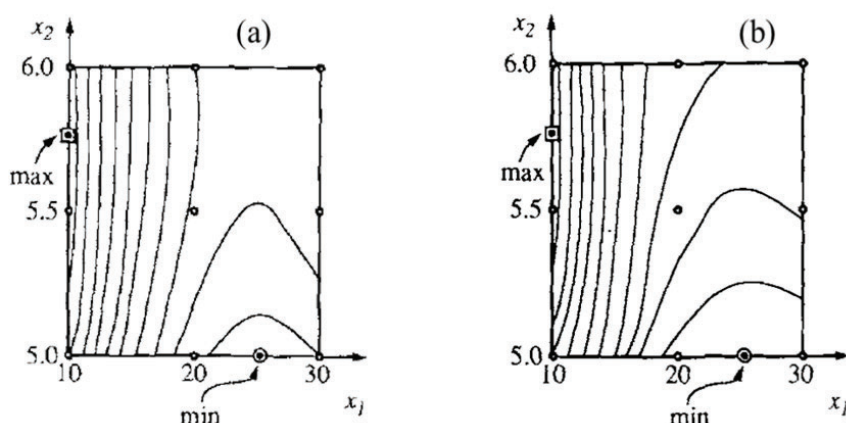
Ten samý problém následně modeloval s pomocí neuronové sítě, která se skládala ze dvou stejných vstupních deskriptorů, šesti neuronů v jedné skryté vrstvě a výstupem byl sledovaný faktor SF. Porovnání výsledků obou modelů lze nalézt v obr. 1.

Otto a spol.<sup>38</sup> studovali vliv reakčních podmínek nitrace benzenu na vznik jeho monosubstituovaného derivátu, resp. poměru paralelně vznikajícího *p*-nitrobenzenu a *o*-nitrobenzenu a také *m*-nitrobenzenu. Pro optimalizaci reakční směsi a podmínek reakce, s cílem získávat převážně jeden z derivátů, použil neuronové sítě.

Významně složitější aplikace neuronových sítí, zejména v oblasti fyzikální chemie, lze nalézt např. u Kulichenka a spol.<sup>39</sup>, kde autoři propojili teorii funkcionálu elektronové hustoty s neuronovými sítěmi zároveň porovnávají efektivitu těchto metod v aplikaci na výpočet meziatomárního potenciálu majícího vliv na stabilitu studované molekuly. Zjistili, že využití neuronových sítí, resp. strojového učení, má znatelný vliv na počet *ab initio* iterací při DFT výpočtech a tím významně redukuje výpočetní čas a eliminuje chyby.

## Experimentální část

Na základě potřeby unifikovat a akcelarovat postup nalezení optimální metodiky využitelné pro analýzu vo-

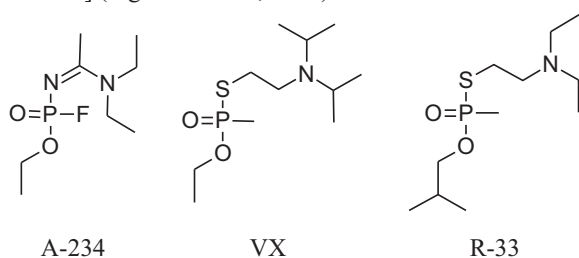


Obr. 1. Porovnání výsledků získaných polynomičnou interpolací (a) a generovaných neuronovou sítí (b)<sup>37</sup>

jensky významných organofosforových látek metodou LC/MS/MS, aplikovatelné v mobilních a stacionárních laboratorních AČR, vyvstala snaha o navázání na současné trendy v oblasti zpracování velkého množství dat neuronovými sítěmi a na současné možnosti modelování deskriptorů molekul na základě DFT.

#### Analyty

Ethyl-*N*-[1-(diethylamino)ethyliden]fosforamidofluoridát (A-234, 86 %) [CAS 2387496-06-0], *S*-[2-(diisopropylamino)ethyl]-*O*-ethyl-methylfosfonothioát (VX, 92 %) [CAS 50782-69-9], *S*-[2-(diethylamino)ethyl]-*O*-(2-methylpropyl)-*P*-methylfosfonothioát (R-33, 73 %) [CAS 159939-87-4] (vše VVÚ Brno, Česká republika), LTQ Positive calibration solution (Thermo Scientific, USA), tributylfosfát PHR1205 Pharmaceutical standard 99,8 % [CAS 126-73-8] (Sigma-Aldrich, USA).



Pro analýzu byly všechny analyty připraveny v molární koncentraci 40  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Vzhledem k nízké tenzi par zkoumaných analytů bylo k dávkování analytu zvoleno vážení na analytických vahách SAG 285 /M (Mettler Toledo, Singapur) upravených pro vážení v digestoři s vysokým tlakovým spádem.

#### Rozpouštědla

Voda (Optima, USA) [CAS 7732-18-5], acetonitril (Optima, USA) [CAS 75-05-8], methanol (Biosolve) [CAS 67-56-1], kyselina mravenčí (Optima, USA) [CAS 64-18-6], kyselina octová (Optima, USA) [CAS 64-19-7], kyselina trifluoroctová (Optima, USA) [CAS 76-05-1] vše v čistotě LCMS.

#### Instrumentace

Jako kapalinový chromatograf byl použit Ultimate 3000 v konfiguraci sestávající se z vysokotlakého modulu HPG-3200SD opatřeného dvěma bočními ventily umožňujícími měření na dvou kolonách zároveň, dále z automatického dávkovače vzorků WPS-3000TLS ANALYTICAL a UV-Vis modulu DAD-3000. Kolony byly temperovány v modulu TCC-3000SD. Konfiguraci byl představen degasser SRD-3200 (vše Thermo Scientific, USA).

Jako hmotnostní detektor zapojený v tandemu s předchozí instrumentací byl použit robustní LTQ XL (Thermo Scientific, USA) systém s lineární iontovou pastí a iontovou optikou tvořenou kvadrupólem a oktapólem, jako iontový zdroj byla použita ESI hlava.

Rozprašovací plyn byl vytvářen generátorem dusíku GENIUS XE 35 (Peak, Scotland UK) s výchozím nastavením tlaku 100 psi. Jako kolizní plyn bylo použito stlačené hélium 5.0 (Linde, Česká republika).

#### Software

K ovládání HPLC systému byl použit Chromeleon 7.2.10 [komerční licence] a k ovládání LTQ XL XCalibur 4.5, kde vzájemná komunikace mezi těmito softwarovými moduly byla zajišťována serverovým rozhraním SII for XCalibur ve verzi 1.5.0.10747 [komerční licence]. Namě-



řená chromatografická data byla interpretována v jeho toolboxu QualBrowser, včetně snímání hmotnostních spekter.

K tvorbě kvantově-chemických grafických výstupů a výpočtu bylo použito softwaru Spartan 20' (Wavefunction Inc., USA) [akademická licence]. Neuronové sítě byly stavěny s použitím modulu Deep Learning – NeuralNetwork, který je součástí balíku MATLAB 2023a (MathWorks, USA) [Campus-Wide licence]. V MATLABu byly také tvořeny programové skripty pro analýzu neuronové sítě, které umožnily optimalizovat podmínky měření vybraných analytů.

Pro vytváření a ověřování fragmentačních diagramů byl využíván robustní software Mass Frontier 8.0 SR 1, kterého bylo také využito k interpretaci hmotnostních spekter (Thermo Scientific, USA) [komerční licence].

#### Volba deskriptorů pro neuronovou síť

Na základě potřeby optimalizovat poměr vstupních parametrů LC na výstupní signál neuronové sítě byly jako „vnější“ deskriptory zvoleny složení mobilní fáze (**B**), průtok mobilní fáze (**Q**) a intenzita průtoku mlžícího plynu (**E**). Zároveň však byly, ve snaze postihnout vliv fyzikálně chemických vlastností molekuly, doplněny další intramolekulární „vnitřní“ deskriptory, vycházející z DFT analýzy analytu. Tyto vnitřní deskriptory (tab. I) zároveň plnily funkci rozlišujícího markeru, který umožňoval neuronové síti přiřadit k jí analyzovaným hodnotám tu konkrétní látku, které tyto hodnoty patří.

Pro vytváření neuronové sítě byl použit softwarový prostředek MATLAB a jeho Deep Learning Toolbox. Byla navržena topologie sítě (obr. 2) s jednou vstupní vrstvou obsahující sedm deskriptorů (B, Q, E, L, H, D, S) s následující skrytou neuronovou vrstvou obsahující vícevrstvý perceptron o 50 vrstvách. Jako aktivační funkce skryté vrstvy byla zvolena hyperbolická tangenta. Výstupní vrstva obsahovala jeden target, reprezentovaný intenzitou signálu prekurzorového iontu.

Takto navržená neuronová síť byla trénována na 396 reálně naměřených vzorcích studovaných analytů tak, že

100 % souboru měření bylo použito jako data trénovací a načež data klasifikována jako testovací (28 dat od každého analytu), byla naměřena posléze a byla použita k ověření úspěšnosti natrénované sítě. Trénování bylo prováděno do té doby, dokud úspěšnost učení sítě na trénovacích datech a validace takovéto sítě na testovacích datech nedosáhla hodnoty alespoň 98 %. Jako trénovací algoritmus byla zvolena Bayesovská regulace.

#### Získávání experimentálních dat

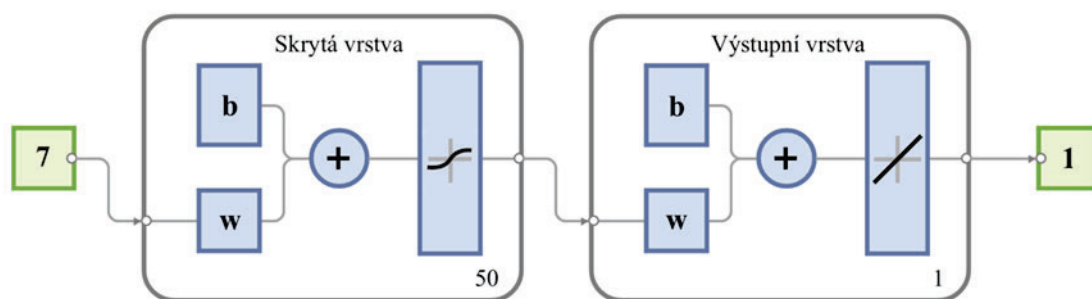
S použitím ovládacího programu XCalibur byl naprogramován proces dávkování vzorku tak, aby se měnily tři zásadní parametry měření – tedy složení mobilní fáze (**B**, [%]) reprezentované procentuálním obsahem acetonitrilu, dále průtok mobilní fáze (**Q**, [ $\mu\text{l min}^{-1}$ ]) a hodnota ShGFR (sheath gas flow rate) (**E**, [arb]). XCalibur také dával pokyn periférii hmotnostního detektoru načíst příslušný soubor obsahující ladění iontové optiky, která byla optimalizována na TBF.

Parametr **B** mohl nabývat hodnot 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 [%]. Parametr **Q** mohl nabývat hodnot 100, 200, 300 [ $\mu\text{l}$ ] a hodnota ShGFR se pohybovala v intervalu 10–40 [arb] s krokem 10 arb, tedy mohla nabývat čtyř hodnot. Celkem tak XCalibur vydal pokyn k proměření 132 možných kombinací těchto hodnot pro jeden analyt.

Pro realizaci měření tributyl-fosfátu, látky VX a látky A-235 tak bylo proměřeno 396 měření, která byla ještě třikrát reprodukována z důvodu kontroly stability sledova-

Tabulka I  
Veličiny získané DFT analýzou

	A-234	TBF	VX
LUMO, eV ( <b>L</b> )	1,77	1,9	1,61
HOMO, eV ( <b>H</b> )	-10,18	-12,51	-9,12
Dipólový moment, Debye ( <b>D</b> )	7,77	5,39	3,92
$S$ , $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ( <b>S</b> )	478,55	549,9	540,92



Obr. 2. Navržená topologie neuronové sítě určené pro učení se na experimentálních datech; **b** – bias (zesílení), **w** – weights (váhy)

ného signálu. Mobilní fáze nebyly nikterak modifikovány. Nastříkáván byl vždy objem 1  $\mu\text{l}$  analytu. Sledovaná intenzita hodnoty signálu prekurzorového iontu byla zaznamenávána do souboru.

Aby bylo možné celý proces automatizovat, byl systém nástřiku vzorku modifikován tak, aby zajistil konstantní podmínky všech měření, a to při minimální možné spotřebě analytu a mobilních fází. Toto bylo realizováno tak, že byl vzorek z autosampleru veden mimo kolonu a DAD, přímo do ESI. Dávkovací jehla byla promývána před a po nadávkování vodou o LCMS čistotě. Naměřené výsledky byly zaznamenávány do tabulky, odkud byly načteny neuronovou sítí a využity k jejímu tréninku.

## Výsledky a diskuse

Byl naprogramován skript v prostředí programu MATLAB, který umožňoval řídit natrénovanou neuronovou sítí a využít ji k interpolaci grafických dat s cílem získat vizualizace průběhu experimentu o mnohem větším rozlišení umožňujícím přesnější nalezení optima parametrů B, Q, a E. Tento posun v interpretaci je zobrazen v obr. 3.

Variací proměnné E, při všech možných kombinacích proměnných B a Q, byla získána taková její hodnota, kdy intenzita signálu prekurzorového iontu byla maximální a následně byla při této hodnotě odečtena optimální  $B_{\text{opt}}$  a  $Q_{\text{opt}}$ . V dalším kroku byla do systému zapojena kolona Accucore<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 2,1 mm  $\times$  150 mm  $\times$  2,6  $\mu\text{m}$ , která se

ukázala jako nejvhodnější pro eluci těchto skupin látek, které byly eluovány izokraticky podle jejich zjištěných optim v rámci simulace měření využitím neuronové sítě (tab. II).

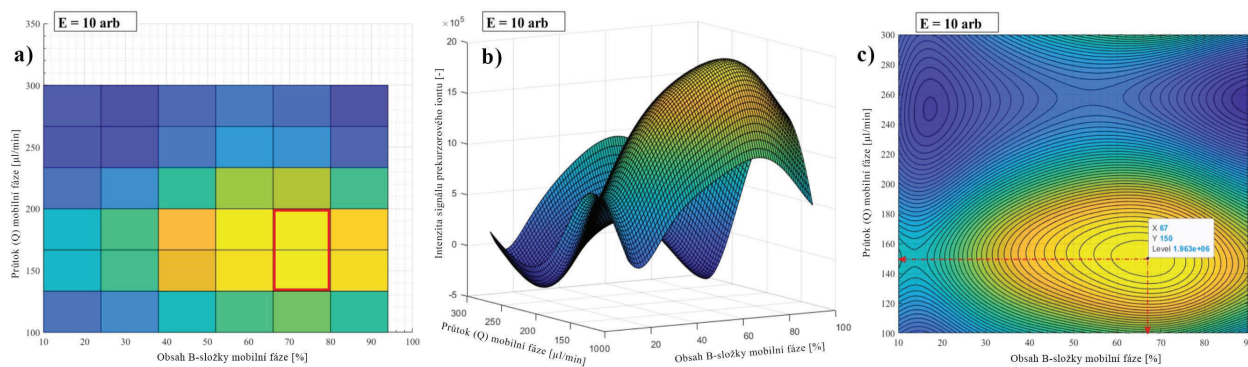
Následně byla provedena optimalizace kolizní energie tak, aby bylo možno sejmout kvalitní  $\text{ms}^2$  spektrum látky A-234 a uložit jej do knihovny.

S cílem zlepšit ionizaci vzorku a získat tím ještě větší odezvu sledovaného signálu byla vodná mobilní fáze modifikována nejprve kyselinou mravenčí, pak octovou, a nakonec kyselinou trifluoroctovou, vždy v koncentraci 0,1 %. Zisk na intenzitě signálu či jeho úbytek lze nalézt v tab. III.

Na látce A-234 byla provedena analýza fragmentačních řad s využitím softwaru MassFrontier (obr. 4), se zjištěními, která nacházejí shodu se studií jiných autorů<sup>24</sup>.

Byla ověřena možnost vlivu hydrolyzy látky A-234 při kontaktu s mobilní fází o optimálním poměru složky A a B. Za předpokladu významného nadbytku mobilní fáze vůči analytu byla sledovaná hydrolyza považována za reakci 1. řádu, z čehož byl odvozen poločas rozpadu 4 h 49 min a konstatováno, že vzhledem ke kontaktu látky A-234 s mobilní fází v průběhu eluce na koloně nepřekračující celkový čas 30 min, lze považovat vliv hydrolyzy za zanedbatelný.

V rámci studia kinetiky hydrolyzy látky A-234 bylo zjištěno, že optimalizací souboru experimentů neuronovými sítěmi došlo ke zvýšení odezvy analytického systému v celkovém úhrnu o 1080 %. Mezi detekce se pro látku A-234 stala koncentrace řádově 1  $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$ , u látky VX



Obr. 3. Původní rozlišení naměřených dat (a), projekce simulace neuronové sítě do 3D (b), průmět do plochy Q, (c) vše při  $E = 10 \text{ arb}$  u látky A-234. Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy.

### Tabulka II

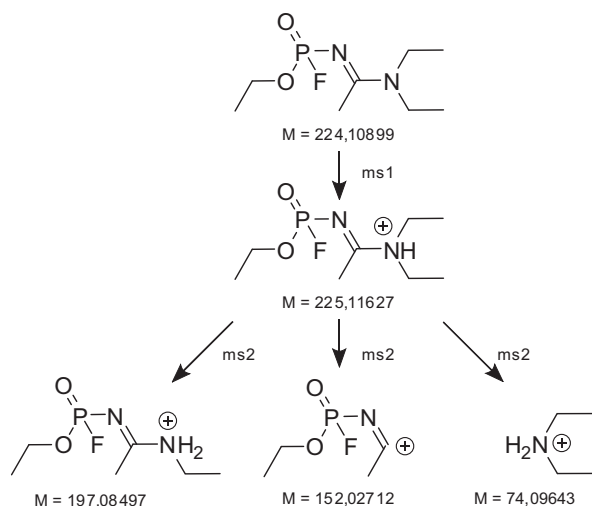
Optimální hodnoty deskriptorů pro maximalizaci hodnoty signálu iontu prekurzoru

Deskriptor	A-234	TBF	VX	R33
Obsah B-složky mobilní fáze B, %	33	51	62	38
Průtok mobilní fáze, $\mu\text{l min}^{-1}$	105	250	213	223
Hodnota ShGFR, arb	28,35	26,66	29,6	34,2

Tabulka III

Číselné vyjádření vlivu modifikátoru mobilní fáze na ionizaci analytu

Mobilní fáze	A-234	TBF	VX	R33
Mravenčí kyselina	+ 23 %	+ 15 %	+ 28 %	+29 %
Octová kyselina	+ 36 %	+ 12 %	+ 32 %	+30 %
Trifluoroctová kyselina	– 37 %	– 28 %	–35 %	–36 %

Obr. 4. Evoluce prekurzorového a produktových iontů v  $ms^2$  spektru látky A-234

10  $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$  a u látky R-33 taktéž 1  $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$ , přičemž kritériem byl poměr signálu iontu použitého ke kvantifikaci ku pozadí v hodnotě velmi štědrých 10:1. Mez stanovitelnosti takto optimalizované metody lze tak předpokládat u poměru S/N 5:1 v řádu desítek  $\text{fg } \mu\text{l}^{-1}$ , což je dostatečná citlivost pro tolik potřebná stanovení ultrastopových množství sledovaných analytů.

## Závěr

Analytická a vědecká pracoviště se často potýkají s množstvím výsledků, kde vzájemnou provázanost nastavitelných podmínek měření a výstupních dat lze klasifikovat jako nelineární multidimenzionální problém. S rozmachem výpočetního výkonu se stávají popisované technologie stále více přístupnější a využitelné na rozličné oblasti výzkumu. Tato práce je návrhem aplikace neuronových sítí a DFT teorie na problém optimalizace podmínek měření tak, aby sledovaný výstupní signál byl co nejintenzivnější, což v důsledku umožňuje především zvyšovat citlivost identifikační metody. Tento soubor postupů umožňuje pro daný analyt vypracovat metodiku měření, která bude svou citlivostí využitelná nejen pro práci specialistů chemického vojska, ale i v jiných oborech vědeckého poznání.

## LITERATURA

- Bajgar J.: *Adv. Clin. Chem.* 38, 151 (2004).
- Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*. Grada Publishing, Praha 2002.
- Středa L.: *Fenomén jménem Novičok*. Tribun EU, Praha 2022.
- UN General Assembly Security Council: Report of the United Nations Mission to investigate allegations of the use of chemical weapons in the Syrian Arab Republic on the alleged use of chemical weapons in the Ghouta area of Damascus on 21 August 2013, A/67/997–S/2013/553 (2013).
- OPCW: Report of the OPCW fact-finding mission in Syria regarding alleged incidents in Ltamenah, the Ayrian Arab Republic 24 and 25 march 2017, S/1636/2018 (2018).
- OPCW: Decision: Chemical Weapons Incident in Kuala Lumpur, Malaysia, EC-84/DEC.8 (2017).
- Crowley M., Dando M., Shang L.: *Preventing Chemical Weapons: Arms Control and Disarmament as the Sciences Converge*. RSC, London 2018.
- Stone R.: *Science* 359, 1314 (2018).
- Vale J., Marrs A. T. C., Manynard R. L.: *Clin. Toxicol.* 56, 1093 (2018).
- Nepovidomova E., Kuča K.: *Arch. Toxicol.* 93, 11 (2019).
- Haláček E., Koblíha Z.: *Chem. Listy* 105, 323 (2011).
- Hoenig S.: *Compendium of Chemical Warfare Agents*. Springer, New York 2007.
- Ellison D. H.: *Handbook of chemical and biological warfare agents*, 2 vyd. CRC Press, Florida 2007.
- Mirzayanov V. S.: *Russian Chemical Weapons Program: An Insider's Chronicle of the Russian Chemical Weapons Program*. Outskirts Press, Denver 2009.
- Carlsen L.: *Mol. Inf.* 38, 8 (2019).
- Husaini M. A. B.: *Int. J. Recent Technol. Engineering* 8, 3706 (2019).
- Üstün E., Koc S., Demir S., Özdemir I.: *J. Organomet. Chem.* 815, 16 (2016).
- Pach C., Berger T. C., Bonte T., Trentesaux D.: *Comput. Ind.* 65, 706 (2014).
- Atilgan A., Yurdakul S., Erdogdu Y., Güllüoğlu M. T.: *J. Mol. Struct.* 1161, 55 (2018).
- Bhakhua H., Rhyman L., Ramasami P.: *R. Soc. Open Sci.* 6, 2054 (2019).
- Khalfa A., Ferrari M., Fournet R., Sirjevan B., Verdier L., Glaude P. A.: *J. Phys. Chem. A* 119,

- 10527 (2015).
22. Li X., Wang H., Lv R., Wu W., Luo J., Tang Y.: *J. Phys. Chem. A* 113, 10335 (2015).
  23. Oudejans L.: EPA/600/S-19/074. US EPA, Washington DC 2019.
  24. Lee J. Y., Lee Y. H.: *J. Anal. Chem.* 69, 909 (2014).
  25. Tsuchihashi H., Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M.: *J. Anal. Toxicol.* 22, 383 (1998).
  26. Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M., Tsuchihashi H.: *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 698, 81 (1997).
  27. Bryant P. J. R., Ford-More A. H., Perry B. J., Wardrop W. H., Watkins T. F.: *J. Chem. Soc.* 312, 1553 (1960).
  28. Sega G. A., Tomkins B. A., Griest W. H.: *J. Chromatogr. A* 790, 143 (1997).
  29. Miki A., Katagi M., Tsuchihashi H., Yamashita M.: *J. Anal. Toxicol.* 32, 86 (1999).
  30. Hook G. L., Kimm G., Koch D., Savage P. B., Ding B., Smith P. A.: *J. Chromatogr. A* 992, 1 (2003).
  31. Mirbabaei F., Ali M. K., Taghi M., Babri N. M., Faraz S. M., Hosseini S. E., Ashrafi D.: *Anal. Bioanal. Chem.* 414, 3429 (2022).
  32. Hebb D. O.: *The organization of behavior: a neuropsychological theory*, 2 vyd. J. Wiley, New York 1957.
  33. Gasteiger J., Zupan J.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 32, 503 (1993).
  34. <https://uk.mathworks.com/help/deeplearning/ug/wine-classification.html>, staženo 8. 11. 2023.
  35. Röse P., Gasteiger J.: *Anal. Chim. Acta* 235, 163 (1990).
  36. Tusar M., Rius F. X., Zupan J.: *Mitteilungsbl. - Ges. Dtsch. Chem., Fachgruppe Chem.-Inf.-Comput.* 19, 72 (1991).
  37. Zupan J., Rius F. X.: *Anal. Chim. Acta* 239, 311 (1990).
  38. Otto M., Horcher U., Gasteiger J.: *Software Dev. Chem.* 4, 377 (1989).
  39. Kulichenko M., Smith J. S., Nebgen B.: *J. Phys. Chem. Lett.* 12, 6227 (2021).

**D. Trefilík** (*NBC Defence Institute, Vyškov, Czech Republic*): **Use of Modern Computational Methods and Neural Networks to Optimize Methods for LC/MS/MS Analysis of Military-Relevant Organophosphorus Compounds**

The search for the optimal instrumental settings of conditions in chemical analysis is typically a lengthy process. This article proposes the use of neural networks for this purpose, particularly in relation to determining the optimal conditions for the analysis of substances under study using LC/MS/MS and ESI technologies, based on the knowledge of their fundamental properties, referred to as universal descriptors. The work focuses on finding such analysis conditions that maximize the precursor ion signal. The paper specifically addresses the question of whether the results obtained from one type of analyte can be used for neural-interpolated prediction of optimal conditions for similar analytes.

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

Keywords: LC/MS/MS, neural networks, electron density functional theory, novichok, organophosphates, quantum chemistry, optimization



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.

## MOŽNOSTI SPEKTROSKOPICKÉ ANALÝZY MODELOVÝCH VZORKŮ MODERNÍCH PIGMENTŮ

EVA SVOBODOVÁ a IVANA KOPECKÁ

Národní technické muzeum, Kostelní 1320/42, 170 78 Praha 7, Česká republika  
eduscho@seznam.cz, ivana.kopecka@ntm.cz

Došlo 25.8.23, přijato 19.10.23.

Identifikace složení barevných vrstev (pojiv, plniv a pigmentů) je zásadní pro práci restaurátorů a v řadě případů ji lze také využít pro upřesnění datace vzniku děl moderního umění. K analýze moderních pigmentů se nejčastěji využívají spektroskopické metody, jmenovitě FTIR a Ramanova spektroskopie. Obě tyto metody jsou navzájem komplementární a společně poskytují celistvý přehled o složení barevné vrstvy. Možnosti obou spektroskopických technik pro identifikaci pigmentů v barevné vrstvě byly studovány na sadě 24 modelových vzorků směsí pigmentu, běloby a pojiva a následně byly ověřeny analýzou reálného vzorku.

Klíčová slova: FTIR spektroskopie, Ramanova spektroskopie, moderní pigmenty, modelové vzorky

### Úvod

V současné době byla řada přírodních pigmentů a barviv nahrazena průmyslově vyráběnými pigmenty<sup>1</sup>. Syntézy prvních organických pigmentů se datují do 2. poloviny 19. století a jsou spojeny se jmény významných chemiků – W. H. Perkina, L. Pasteura a P. Ehrlicha. Perkin syntetizoval první syntetické organické barvivo na textil – mauveine<sup>2</sup> a první anilínové barvy, Pasteur a Ehrlich syntetizovali (původně pro histologické účely) organická barviva<sup>3</sup>. Mnoho z moderních pigmentů našlo uplatnění v umělecké tvorbě, přičemž jejich rozšíření mezi umělce zajistila především komerční výroba uměleckých barev v tubách. Tyto barvy sice obvykle nesly název některého z klasických minerálních pigmentů, ve skutečnosti však byly směsí více pigmentů (minerálních i syntetických) s bělobami, pojivem a dalšími složkami, které zlepšují kryvost, daný barevný tón, a především snižují cenu. V průběhu 20. století byla syntetizována řada nových typů moderních pigmentů (azo, polycyklické, quinakridonové, pyrrollové, benzimidazolové atd.)<sup>1,4</sup> a také moderních pojiv, které lze velmi dobře datovat, existují-li literární prameny o datech výroby a jejich uvedení na trh (především patenty a katalogy výrobců). Moderní pigmenty a pojiva lze identifikovat řadou analytických metod, přičemž jednotlivé typy moderních pigmentů lze určit klasickými vybarvovacími reakcemi<sup>5</sup>. Přesnější specifické identifikace pak mohou zajistit metody GC/MS (cit.<sup>6</sup>), laserové ablace<sup>7</sup> či rentgenové difrakce<sup>8</sup>. Častěji jsou v důsledku své neinvazivnosti využívány spektrální metody, např. FTIR, Ramanova spektroskopie a rentgen-fluorescenční analýza<sup>9</sup>. Jelikož syntetické pigmenty mohou poskytovat výrazná

Ramanova spektra, je Ramanova spektroskopie k jejich identifikaci využívána nejčastěji<sup>10,11</sup>. Analýza uměleckých barev, resp. barevné vrstvy má řadu specifik. Jedná se o směsi pigmentů a pojiv, které po určité době stárly za neznámých podmínek, za kterých probíhala, či mohla probíhat, řada různých degradačních procesů<sup>12</sup>.

### Experimentální část

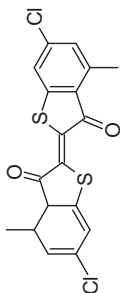
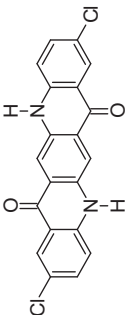
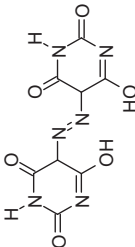
#### Příprava modelových vzorků

Pro tvorbu modelových vzorků byly vybrány pro nás dostupné moderní pigmenty a nejběžnější běloby, jejichž specifikace je uvedena v tab. I. Jako pojivo byly použity polymerovaný lněný olej (HB-LAK, s.r.o.) a akrylátová disperze Acrykleber 498 HV Lascaux (Kremer Pigmente GmbH & Co. KG). S každým z pigmentů byla vytvořena sada šesti směsí podle těchto vzorů: 1) pigment + pojivo, 2) pigment + křída + pojivo a 3) pigment + zinková běloba + pojivo. Jednotlivé pigmenty a běloby byly nejprve roztřeny v daném pojivu a poté smíchány do požadovaných směsí v přibližném poměru 1:1 (v/v). Připravené směsi byly skleněnou tyčinkou nanášeny na skleněné podložní sklíčko a za laboratorních podmínek ponechány k vyschnutí po dobu tří týdnů.

#### Přístroje a podmínky měření

Jednotlivá FTIR spektra byla naměřena na FTIR spektrometru Nicolet iZ10 (Thermo Scientific, USA) technikou ATR (ATR krystal – diamant) s DTGS detektorem

Tabulka I  
Přehled pigmentů a bělob, použitých pro tvorbu modelových vzorků

Pigmenty a běloby (zdroj)	Složení / typ pigmentu	Barva	Označení	Datum	Chemická struktura
Oracet pink RF (firma Ciba)	thioindigo	růžová	PR181; C.I. 73360	po roce 1930 (cit. <sup>13</sup> )	
RT-143-D Cinquasia magenta (firma Ciba)	quinakridon	fialová	PR202; C.I. 73907	1958 (cit. <sup>14</sup> )	
Grünspan, synthetisch (firma Kremer Pigmente)	syntetická měděnka (octan/hydroxid měďnatý)	modrozelená	PG20; C.I. 77408	asi od poloviny 19. století <sup>15</sup>	$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot [\text{Cu}(\text{OH})_2]_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$
Cromophthal Yellow D 1085 (firma Basf)	pyrimidin azoskupina komplex niklu	žlutá	PY150; C.I. 12764	1970 (cit. <sup>15</sup> )	
Plavená křída (AVU Praha) <sup>a</sup>	uhlíčitán vápenatý (příměs hořčíku)	bílá	PW18; C.I. 77220	–	$\text{CaCO}_3(+\text{MgCO}_3)$
Zinková běloba (AVU Praha) <sup>a</sup>	oxid zinečnatý	bílá	PW4; C.I. 77947	1834 (cit. <sup>15</sup> )	ZnO

<sup>a</sup> Zkratka označuje Akademií výtvarných umění v Praze

(detektor na bázi triglycinsulfátu) a rozlišením  $4\text{ cm}^{-1}$ . Rozsah vlnočtů byl  $525\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  a počet scanů 32. Průměr měřené plochy byl přibližně  $2\text{ mm}$ . Rozlišení bylo zvoleno s ohledem na běžnou praxi a na rozlišení knihovnických spekter.

Ramanova spektra byla naměřena na Ramanově mikroskopu Nicolet DXR2 (Thermo Scientific, USA) s CCD detektorem, s diodovými lasery o vlnové délce  $532\text{ nm}$  a  $785\text{ nm}$ , objektivem  $50\times$ , mřížkou full range o rozsahu Ramanovského posunu  $50\text{--}3380\text{ cm}^{-1}$ , rozlišení  $\sim 5\text{ cm}^{-1}$  a aperturou o velikosti  $25\text{ }\mu\text{m}$  či  $50\text{ }\mu\text{m}$  pro typ pinhole. Výkon laserů byl dle potřeby nastavován v rozsazích  $0,1\text{--}10\text{ mW}$  pro laser  $532\text{ nm}$  (zelený) a  $0,1\text{--}30\text{ mW}$  pro laser  $785\text{ nm}$  (červený). Doba jednoho pulzu se pohybovala v rozmezí  $0,5\text{--}15\text{ s}$  a počet scanů v rozsahu  $20\text{--}1000$ . Průměr měřeného bodu se pohyboval kolem  $1\text{ }\mu\text{m}$ . Jednotlivé pigmenty a běloby byly rozváleny a měřeny na hliníkové podložce, pojiva pak byla na této podložce analyzována ve formě tenkých filmů.

Urychlené stárnutí modelových vzorků probíhalo v laboratoři SVÚOM s.r.o. v klimatické komoře Binder MKF 240 při teplotě  $55\text{ }^\circ\text{C}$  a relativní vlhkosti  $50\%$  po dobu  $36\text{ dnů}$ . Během urychleného stárnutí byla u modelových vzorků kontrolována jejich celková barevná změna pomocí kolorimetru X-Rite RM 200 QC (X-Rite Pantone, USA). Tato měření probíhala vždy ve třech místech a v každém místě jako průměr ze tří měření za těchto podmínek: denní světlo (D65),  $10^\circ$  úhel měření, vyhodnocení v hodnotách CIELab a výpočet celkové barevné změny  $\Delta E$  dle rovnice (1) (cit.<sup>16</sup>).

$$\Delta E_{ab}^* = [(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}] = [(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2]^{1/2} \quad (1)$$

CIELab je barevný prostor definovaný Mezinárodní komisí pro osvětlení (zkráceně CIE) v roce 1976. Veškerý barevný prostor je promítnut do barevné koule a jednotlivé body v kouli (o souřadnicích  $[x,y,z]$ , resp.  $[a^*,b^*,L^*]$ ) představují konkrétní barevné odstíny. Hodnota  $L^*$  popisuje světlost ( $L^* = 0$  černá až  $L^* = 100$  bílá), souřadnice  $a^*$  představuje barevnost ve škále zelená ( $-a^*$ ) a červená ( $+a^*$ ), souřadnice  $b^*$  popisuje barevnost ve škále modrá ( $-b^*$ ) a žlutá ( $+b^*$ ). Aktuální celková barevná změna  $\Delta E$  jednotlivého modelového vzorku byla vztažena k barevnosti téhož vzorku před urychleným stárnutím (hodnoty  $L_1^*$ ,  $a_1^*$  a  $b_1^*$ ).

## Výsledky a diskuse

Specifika analýzy moderních pigmentů metodami molekulové spektroskopie byla studována na souboru  $24$  modelových vzorků směsi pigmentu, běloby a pojiva.

Nejprve byly samostatně analyzovány jednotlivé studované pigmenty, běloby a obě pojiva, a to oběma metodami vibrační spektroskopie.

## Charakterizace pigmentů, bělob a pojiv

Pozice jednotlivých FTIR a Ramanových (pro oba typy budících laserů) spektrálních pásů použitých pojiv, bělob a pigmentů shrnuje tab. II.

Olej i akrylátová disperze jsou složené z uhlíkatých řetězců bohatých na karbonylové skupiny ( $\text{C}=\text{O}$ ), jejichž intenzivní pás valenční vibrace karbonylu (Doplněk obr. 1) odpovídá vlnočtu  $1743\text{ cm}^{-1}$  (olej) a  $1726\text{ cm}^{-1}$  (akrylát). V případě oleje jsou majoritní i pásy valenčních vibrací  $\text{C-H}$  vazeb v oblasti  $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ . Obě pojiva vykazují na pásy bohatá Ramanova spektra (Doplněk obr. 1).

Ramanova spektra bělob (Doplněk obr. 2) jsou chudší než spektra pojiv a jsou podobná po excitaci oběma lasery. Pro vyvolání Ramanova spektra zinkové běloby je potřeba u obou laserů vyšších výkonů, které by však mohly spálit ostatní analyzované organické látky. V Ramanových spektrech tak bývá zinková běloba identifikována pouze jako „příměs“ málo intenzivními pásy o vlnočtu  $\sim 438$  a  $\sim 99\text{ cm}^{-1}$ .

Ve FTIR spektru (Doplněk obr. 2), v měřeném rozsahu vlnočtů, nevykazuje zinková běloba žádnou specifickou vibraci, obsahuje pouze rostoucí základní linii pod  $800\text{ cm}^{-1}$ . Křída obsahuje uhličitánové aniony, jejichž majoritní spektrální pás odpovídá vlnočtům okolo  $1390\text{ cm}^{-1}$ . Dále obsahuje navíc čtyři ostré pásy, které lze dobře využít k její identifikaci: je to především pás  $\sim 872\text{ cm}^{-1}$ , a dále pásy  $\sim 712$ ,  $\sim 1796$  a  $\sim 2513\text{ cm}^{-1}$  (Doplněk obr. 2).

Všechny pigmenty vykazují ve svých FTIR spektrech (Doplněk obr. 3) řadu vibračních pásů jak v oblasti pod  $1800\text{ cm}^{-1}$ , tak při vyšších vlnočtech nad  $3000\text{ cm}^{-1}$ ; nejchudší z naměřených spekter je pak spektrum anorganické syntetické měděnky (pigment grüspan).

Ramanovo spektrum syntetické měděnky (Doplněk obr. 3) bylo získáno pouze po excitaci zeleným laserem ( $\lambda = 532\text{ nm}$ ) o nižším výkonu ( $1\text{--}2\text{ mW}$ ). Červená barviva poskytovala lepší Ramanova spektra (Doplněk obr. 3) při měření energeticky slabším červeným laserem ( $\lambda = 785\text{ nm}$ ). Ramanova spektra červeného barviva Oracet pink RF (thioindigo) byla zakryta fluorescencí samotného barviva, a to i při minimálním výkonu obou laserů ( $0,01\text{ mW}$ ). Přesto bylo možné při excitaci červeným laserem nalézt tyto spektrální pásy daného barviva:  $1435$ ,  $1416$ ,  $1329$ ,  $1281$ ,  $649$  a  $241\text{ cm}^{-1}$  (Doplněk obr. 3). Metalické azobarvivo Cromophtal Yellow D 1085 a quinakridonové barvivo RT-143-D Cinquasia magenta vykazovala Ramanova spektra po excitaci oběma lasery (Doplněk obr. 3).

## Modelové vzorky

Připravené modelové vzorky byly podrobeny urychlenému stárnutí. Celková barevná změna organických barviv nepřesáhla hodnotu  $\Delta E \sim 10$  (Doplněk obr. 4), zato syntetická měděnka (vyjma směsi se zinkovou bělobou, pojené akrylátovou disperzí) dosahovala celkové barevné změny v rozmezí  $\Delta E \sim 20\text{--}35$ , přičemž celková barevná

Tabulka II

Pozice spektrálních pásů pojiv, bělob a pigmentů, použitých pro tvorbu modelových vzorků

Vzorek	Metoda	Spektrální pásy [ $\text{cm}^{-1}$ ] <sup>a</sup>
Olej poly- merovaný	FTIR	3010vw, 2923s, 2853m, 1743vs, 1653vw, 1462w, 1376vw, 1237w, 1160s, 1098w, 1027vw, 967vw, 914vw, 866vw, 721m
	Raman 532 nm	3014m, 2932vs, 2905vs, 2851vs, 2726vw, 1743vw, 1655s, 1444w, 1302w, 1264w, 1167vw, 1080vw, 1026vw, 971vw, 868vw
	Raman 785 nm	2905vs, 2851vs, 1743w, 1655w, 1444s, 1302m, 1264sh, 1080w, 868w
Acrykleber 498 HV Lascaux	FTIR	3434vw, 2956w, 2874w, 1726vs, 1449w, 1385w, 1236m, 1144s, 1066w, 990w, 961w, 843w, 755w
	Raman 532 nm	2948vs, 2882m, 2737vw, 1733w, 1455w, 1305vw, 1233vw, 1122vw, 1061vw, 994vw, 967vw, 911vw, 844vw, 811w, 600vw, 362vw, 295vw
	Raman 785 nm	2948vs, 2882s, 1733w, 1455s, 1305w, 1233vw, 1122vw, 1061vw, 994w, 967w, 911vw, 844m, 811m, 750vw, 600w, 484vw, 362w, 295vw
Křída plavená	FTIR	2513vw, 1796vw, 1391vs, 1170sh, 1090vw, 872s, 712w
	Raman 532 nm	1750vw, 1435vw, 1087vs, 713w, 281s, 155m
	Raman 785 nm	1435vw, 1286w, 1205vw, 1087vs, 713w, 281m, 155m
Zinková běloba	FTIR	–
	Raman 532 nm	1148w, 659vw, 585vw, 538vw, 438vs, 380vw, 332w, 204vw, 99vs
	Raman 785 nm	585vw, 438m, 380vw, 332vw, 278vw, 204vw, 99vs
Oracet pink RF	FTIR	3450w, 3299w, 3055vw, 1617m, 1585s, 1563m, 1525s, 1488m, 1467m, 1415m, 1368vw, 1331w, 1265s, 1212vs, 1174s, 1147m, 1072m, 1004m, 955m, 879m, 846s, 797s, 759m, 725vs, 691vs, 622m
	Raman 532 nm	– (silná fluorescence)
	Raman 785 nm	1435s, 1416m, 1329m, 1281m, 649m, 241vs (silná fluorescence)
RT-143-D Cinquasia magenta	FTIR	3260w, 3159w, 3115vw, 3076sh, 3037vw, 3017vw, 2973vw, 2864vw, 1625m, 1599s, 1575vs, 1553vs, 1495m, 1465vs, 1419w, 1335vs, 1288m, 1255m, 1177w, 1131m, 1070w, 1025vw, 959vw, 893m, 805s, 746m, 682s, 607m
	Raman 532 nm	1593s, 1567vs, 1407w, 1311s, 1233w, 1199w, 1138vw, 293w, 154vw
	Raman 785 nm	1654w, 1593m, 1567m, 1506vw, 1468vw, 1407vw, 1311m, 1233vw, 1199vw, 1138vw, 1030vw, 935vw, 878vw, 748vw, 709m, 627vw, 553vw, 505w, 462vw, 414vw, 354vw, 293w, 236vw, 210vw, 154w, 98vs
Grünspan, synthetisch	FTIR	3464w, 3367w, 3269w, 2990vw, 2942vw, 2461vw, 1650vw, 1595vs, 1442vs, 1418vs, 1354w, 1050w, 1033w, 687vs, 626s
	Raman 532 nm	3023vw, 2981vw, 2940w, 1641vw, 1441vw, 1417vw, 1361vw, 949m, 704w, 632vw, 323vs, 254w, 226w, 184w, 107s
	Raman 785 nm	–
Cromophtal Yellow D 1085	FTIR	3465vw, 3413vw, 3339w, 3230vw, 3109vw, 2891br,vw, 2733br,vw, 1712w, 1582m, 1547m, 1461w, 1403vs, 1307w, 1269m, 1172w, 1054w, 884w, 810w, 776w, 750w, 680vw, 624vw, 593w
	Raman 532 nm	2896vw, 1457vs, 1305vw, 1223vw, 1164vw, 1057vw, 1750vw, 936vw, 623vw, 556vw, 514vw, 465vw, 304vw, 268vw, 107vw
	Raman 785 nm	1457vs, 1305vw, 1223vw, 936w, 514vw, 387vw, 304vw, 268vw, 227vw, 107w, 67w

<sup>a</sup> Intenzita a tvar pásů je označena ustálenými zkratkami – vs (velmi silná), s (silná), m (střední), w (slabá), vw (velmi slabá), sh (raménko), br (široký pás)

změna postřehnutelná lidským okem je pro rovnici (1) o hodnotě  $\Delta E \sim 2,3$  (cit.<sup>16</sup>).

Ve FTIR a Ramanových spektrech modelových vzorků před i po urychleném stárnutí byly hledány specifické

vibrační pásy, příslušející danému pigmentu či barvivu, které nejsou překryty vibračními pásy pojiv a bělob a podle nichž lze daný pigment ve směsi identifikovat.



## Oracet pink RF

Ve všech modelových vzorcích, pojených olejem i akrylátovou disperzí, byly FTIR spektroskopii identifikovány všechny vibrační pásy barviva Oracet pink RF (Doplněk obr. 5). Nejnižší intenzitu spektrálních pásů barviva Oracet pink RF vykazuje FTIR spektrum směsi barviva a křídly, jejíž vibrační pásy jsou ve spektru majoritní a překrývají pásy barviva. Barvivo je lépe identifikovatelné v čerstvých vzorcích, ale je možné je identifikovat i v urychleně stárnutých vzorcích, především v oblastech vlnočtů mimo vibrační pásy akrylátového pojiva a křídly, a to v oblastech 3000–3500, 1500–1650 a v oblasti otisku prstu pod 800  $\text{cm}^{-1}$ . V Ramanově spektroskopii vykazuje barvivo Oracet pink RF vysokou fluorescenci (Doplněk obr. 3), nicméně lze jej identifikovat při excitaci červeným laserem při nejnižším výkonu laseru, a to málo intenzivními pásy (1435 a 1329  $\text{cm}^{-1}$ ).

## RT-143-D Cinquasia magenta

Barvivo RT-143-D Cinquasia magenta lze identifikovat ve všech připravených směsích FTIR spektroskopii na základě vibračních pásů v oblastech vlnočtů 3000–3300, 1550–1650 a v oblasti otisku prstu pod 900  $\text{cm}^{-1}$  (Doplněk obr. 6). V modelových vzorcích pojených akrylovým pojivem byly tyto pásy barviva méně intenzivní a spíše se projevíly spektrální pásy samotného pojiva a křídly. Ramanovou spektroskopii bylo toto barvivo identifikováno ve všech modelových vzorcích bez ohledu na použité pojivo a dobu stárnutí. Ve spektrech byly nalezeny pásy 1593, 1567, 1311, 1233 a 1199  $\text{cm}^{-1}$ , které mohou sloužit k jeho identifikaci.

## Syntetická měděnka (pigment grüspan synthetisch)

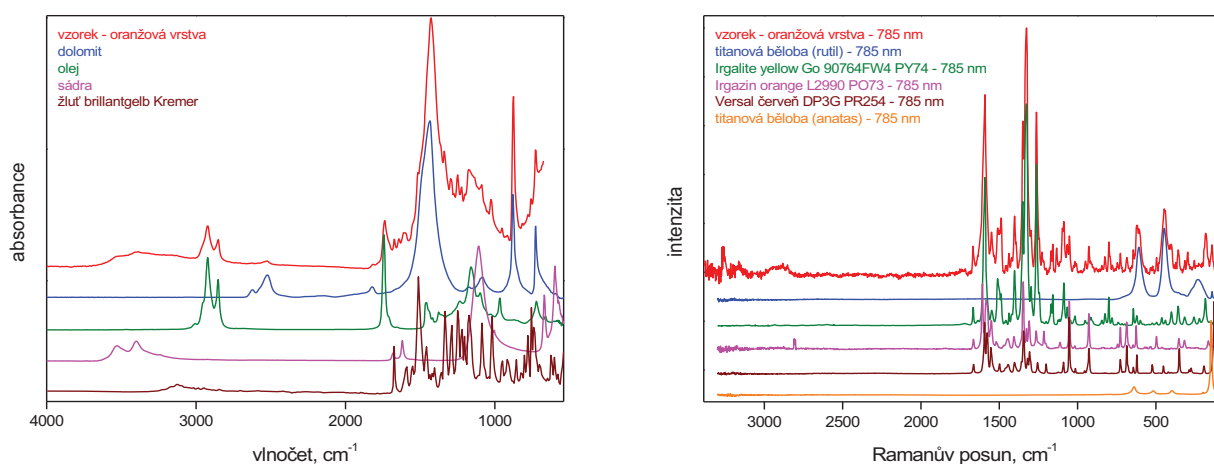
Po excitaci zeleným laserem byly v Ramanových spektrech nalezeny všechny spektrální pásy měděnky ve všech modelových vzorcích bez ohledu na použité pojivo a stupeň degradace, lokálně pak byly identifikovány i jeho degradační produkty – acetáty. Ve FTIR spektru (Doplněk obr. 7) byly nalezeny především spektrální pásy 3464, 3367, 3269, 1354, 1050, 1033, 687 a 626  $\text{cm}^{-1}$ . Ve FTIR spektrech stárnutých vzorků (Doplněk obr. 7) přibýly pásy degradačních produktů zeleně a pojiv. Identifikovány byly acetáty vápenaté a zinečnaté, lokálně byl nalezen i stearat vápenatý.

## Cromophtal Yellow D 1085

Jelikož nejintenzivnější pás barviva Cromophtal Yellow D 1085 o vlnočtu 1403  $\text{cm}^{-1}$  byl ve FTIR spektru v přítomnosti křídly překryt pásem uhličitanů (Doplněk obr. 8), za signifikantní pásy barviva bylo možné považovat vibrační pásy v oblastech 3000–3500, 1500–1650, 550–850 a pás 1307  $\text{cm}^{-1}$ . Tyto pásy byly nalezeny ve FTIR spektrech všech modelových vzorků bez ohledu na použité pojivo a stupeň degradace (Doplněk obr. 8). V Ramanově spektrech byly nalezeny všechny spektrální pásy barviva ve všech modelových vzorcích bez ohledu na použité pojivo a stupeň degradace.

## Reálný vzorek

Metody FTIR a Ramanovy spektroskopie lze využít v určitých případech také pro ověření datace uměleckých děl. Na obr. 1 jsou uvedena FTIR a Ramanova spektra pohledové oranžové barevné vrstvy moderní olejomalby



Obr. 1. Ukázka možností FTIR a Ramanovy analýzy souvrství z olejomalby na plátně. Vlevo je FTIR spektrum oranžové vrstvy vzorku, která byla pojena olejem. Ve spektru lze identifikovat dolomitickou křídou, boloňskou křídou (sádra) a syntetické organické barvivo (spektru nejvíce vyhovuje standard brilantní žlutě od Kremera = Hansa žlut PY74). Vpravo je Ramanovo spektrum téže vrstvy, ve spektru lze identifikovat arylidové monoazobarvivo Irgalite yellow Go od firmy Ciba (= Hansa žlut PY74), pyrrolová barviva (PR254+PO73) a titanovou bělobu (rutilového i anatasového typu). Spektra byla normalizována, Ramanova spektra též linearizována

na plátně (souvrství bylo tvořeno čtyřmi vrstvami – světlý podklad, světle okrová vrstva, žlutohnědá vrstva a pohledová oranžová vrstva), která byla datována do první poloviny 20. století. Pomocí FTIR spektroskopie bylo ve všech vrstvách odebraného souvrství analyzováno pojivo, kterým byl, vyjma pohledové oranžové vrstvy, vinylacetát. Pohledová oranžová vrstva byla pojena olejem a obsahuje směs dolomitické křídly, boloňské křídly (sádry) a syntetického organického barviva. Pravděpodobně se jedná o žluť brilliantgel od firmy Kremer (arylidové azobarvivo PY74), která byla pod názvem Hansa brilliant yellow uvedena na trh kolem roku 1940 (cit.<sup>15</sup>). V Ramanově spektru téže vrstvy (obr. 1) byla přítomnost barviva PY74 potvrzena (ve spektru je zobrazen standard PY74 pod názvem Irgalite yellow Go od firmy Ciba). Dále byla identifikována titanová běloba (anatasového i rutilového typu) a další syntetická pyrrolová barviva – PO73 a PR254. Ta byla vyráběna až v 80. letech 20. století<sup>5,15</sup>. Titanová běloba anatasového typu se vyráběla po roce 1924 a rutilového typu až po druhé světové válce<sup>17</sup>. Kombinace obou spektrálních technik tak pomohla odhalit falzum, které pochází až z druhé poloviny, resp. z konce 20. století.

## Závěr

Metodou FTIR spektroskopie lze v ideálním případě identifikovat v jednom kroku pojivo barevné vrstvy, jeho degradační produkty a řadu pigmentů a plniv. Spektrální vibrační pásy organických barviv, která mívají vysokou kryvost a v barevné vrstvě jsou zastoupena pouze v malém množství, bývají velmi často překryty vibračními pásy bělob a pojiv. Obsahuje-li FTIR spektrum vzorku zvýšenou základní linii v oblasti vlnočtů pod  $800\text{ cm}^{-1}$ , měl by být vzorek analyzován i pomocí Ramanovy spektroskopie či pomocí FTIR spektrometru, který umožní analýzu při nižších vlnočtech (v oblasti blízkého infračerveného záření).

Pomocí Ramanovy mikroskopie se podařilo identifikovat v modelových vzorcích všechny pigmenty. Kvalitnější Ramanova spektra byla pozorována u vzorků, které byly dokonale planární a v nichž byla nalezena odhalená zrna pigmentu. Zelené pigmenty jsou lépe identifikovatelné při použití zeleného laseru, červená barviva poskytují lepší Ramanův signál po excitaci červeným laserem (již při nízkém počtu scanů vykazují vibrační pásy vyšší poměr signálu k šumu pozadí). Jelikož Ramanova spektroskopie je v daném uspořádání schopná fokusovat paprsek laseru na plochu o průměru  $\sim 1\ \mu\text{m}$ , lze analyzovat pouze samotná zrna pigmentu a jeho spektrální pásy nebývají překryty spektrálními pásy pojiva či ostatních pigmentů a plniv. Oproti FTIR analýze je v Ramanově spektroskopii nezbytné hledání optimálních podmínek měření pro získání co nejintenzivnějšího Ramanova spektra s co nejnižší fluorescencí. Jestliže barevná vrstva obsahuje více pigmentů, pak je třeba analyzovat každé barevné zrno zvlášť.

Obě metody jsou navzájem komplementární a společně poskytují celistvý přehled o složení jednotlivých barevných vrstev vzorků, které byly odebrány z uměleckých předmětů.

Internetová verze této práce obsahuje navíc doplňující část. Pro vyhledání plné verze článku včetně příslušného *Doplňku* je třeba otevřít aktuální webovou stránku Chemických listů.

*Autorky děkují kolegům z firmy SVÚOM s.r.o. za provedení urychleného stárnutí modelových vzorků. Článek vznikl za finanční podpory Ministerstva kultury v rámci institucionálního financování na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace Národního technického muzea (DKRVO, MK000023299).*

## LITERATURA

- Hunger K. (ed.): *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications*. Wiley-VCH, Weinheim 2003.
- Meth-Cohn O., Smith M.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 5 (1994).
- Travis A.: *J. Comput. Biol.* 26, 726 (2019).
- Lomax S. Q., Learner T.: *J. Am. Inst. Conserv.* 45, 107 (2006).
- Kalsbeek N.: *Stud. Conserv.* 50, 205 (2005).
- Russell J., Singer B. W., Perry J. J., Bacon A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1473 (2011).
- Stachura S., Desiderio V. J., Allison J.: *J. Forensic Sci.* 52, 595 (2007).
- Brostoff L. B., Centeno S. A., Ropret P., Bythrow P., Pottier F.: *Anal. Chem.* 81, 6096 (2009).
- Rosi F. a 10 spoluautorů: *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* 100, 613 (2010).
- Scherrer N. C., Zumbühl S., Delavy F., Fritsch A., Kühnen R.: *Spectrochim. Acta, Part A* 73, 505 (2009).
- Schulte F., Brzezinka K.-W., Lutzenberger K., Stege H., Panne U.: *J. Raman Spectrosc.* 39, 1455 (2008).
- Anghelone M., Stoyschew V., Jembrih-Simbürger D., Schreiner M.: *Microchem. J.* 139, 155 (2018).
- Pereira R. C., Pineiro M., Galvão A. M., Seixas de Melo J. S.: *Dyes Pigm.* 158, 259 (2018).
- Lomax S. Q.: *Stud. Conserv.* 50, suppl 19 (2005).
- MacEvoy B.: <https://www.handprint.com/HP/WCL/>, staženo 27. 7. 2023.
- Druzik J., Pesme C.: *Postprints of the Textile Specialty Group (TSG) of the American Institute of Conservation (AIC). 38th Annual Meeting in Milwaukee*, str. 14. 2010.
- Eastaugh N., Walsh V., Chaplin T., Siddall R.: *Pigment Compendium. A Dictionary and Optical Microscopy of Historical Pigments*, 1. vyd. Butterworth-Heinemann, London 2008.

**E. Svobodová and I. Kopecká** (*National Technical Museum, Prague, Czech Republic*): **The Possibility of Spectroscopic Analysis of Model Samples of Modern Pigments**

The identification of the composition of the paint layers (binders, additives, and pigments) is essential for the work of conservators and can also be used in many cases to determine the date of creation of works of modern art. Spectroscopic methods, specifically FTIR and Raman spectroscopy, are most commonly used to analyse modern pigments. These two methods complement each other and together provide a comprehensive view of the composition of the paint layer. The abilities of both spectroscopic techniques to identify pigments in the paint layer were investigated on a set of 24 model samples of pigment, the white, and binder mixtures and then verified by an analysis of a real sample.

Keywords: FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy, modern pigments, model samples

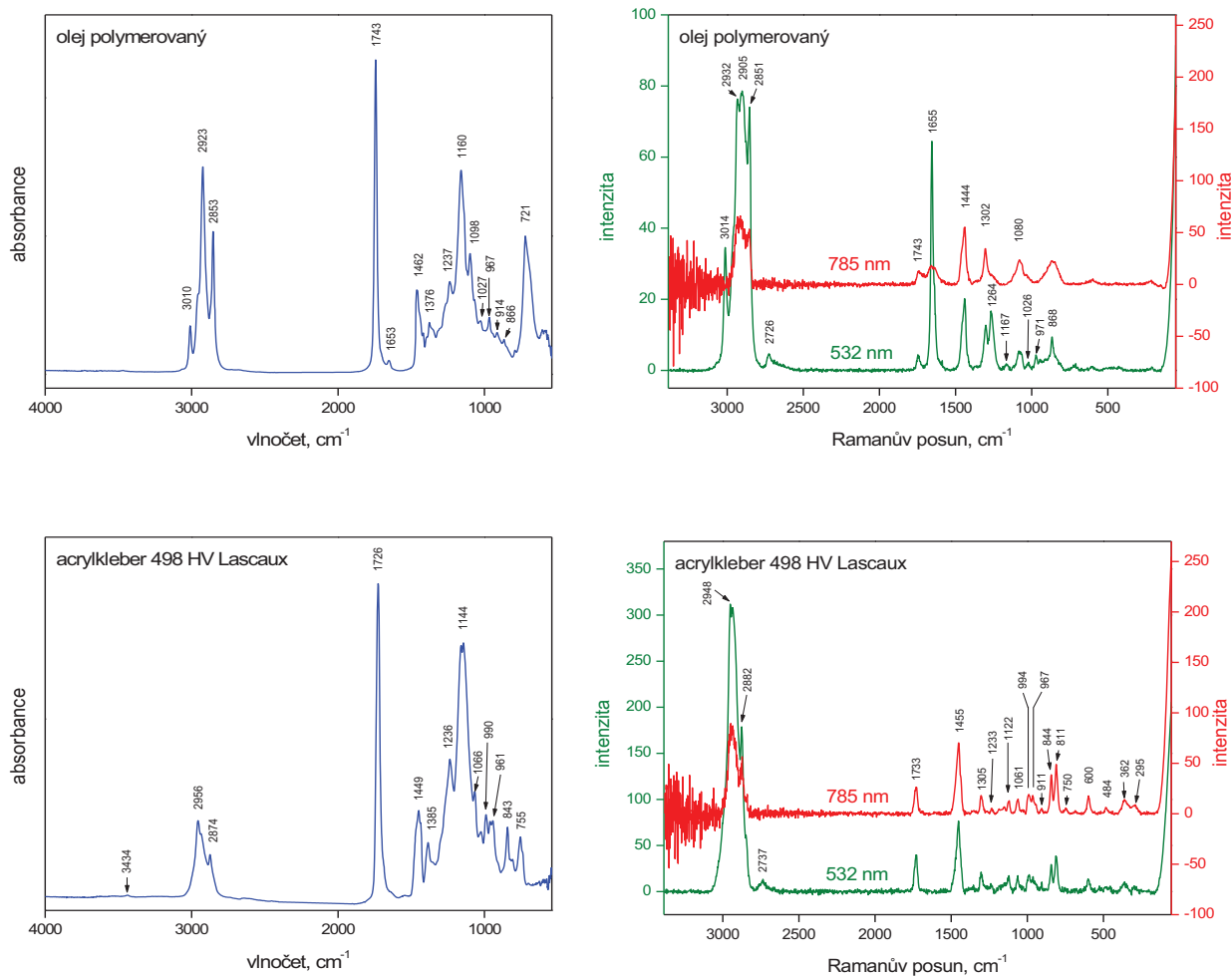
*Acknowledgements*

*The authors wish to thank colleagues from SVÚOM s.r.o. for performing accelerated aging of model samples. This work was financially supported by the Ministry of Culture of the Czech Republic by institutional financing of long-term conceptual development of the research institution (National Technical Museum, MK000023299).*

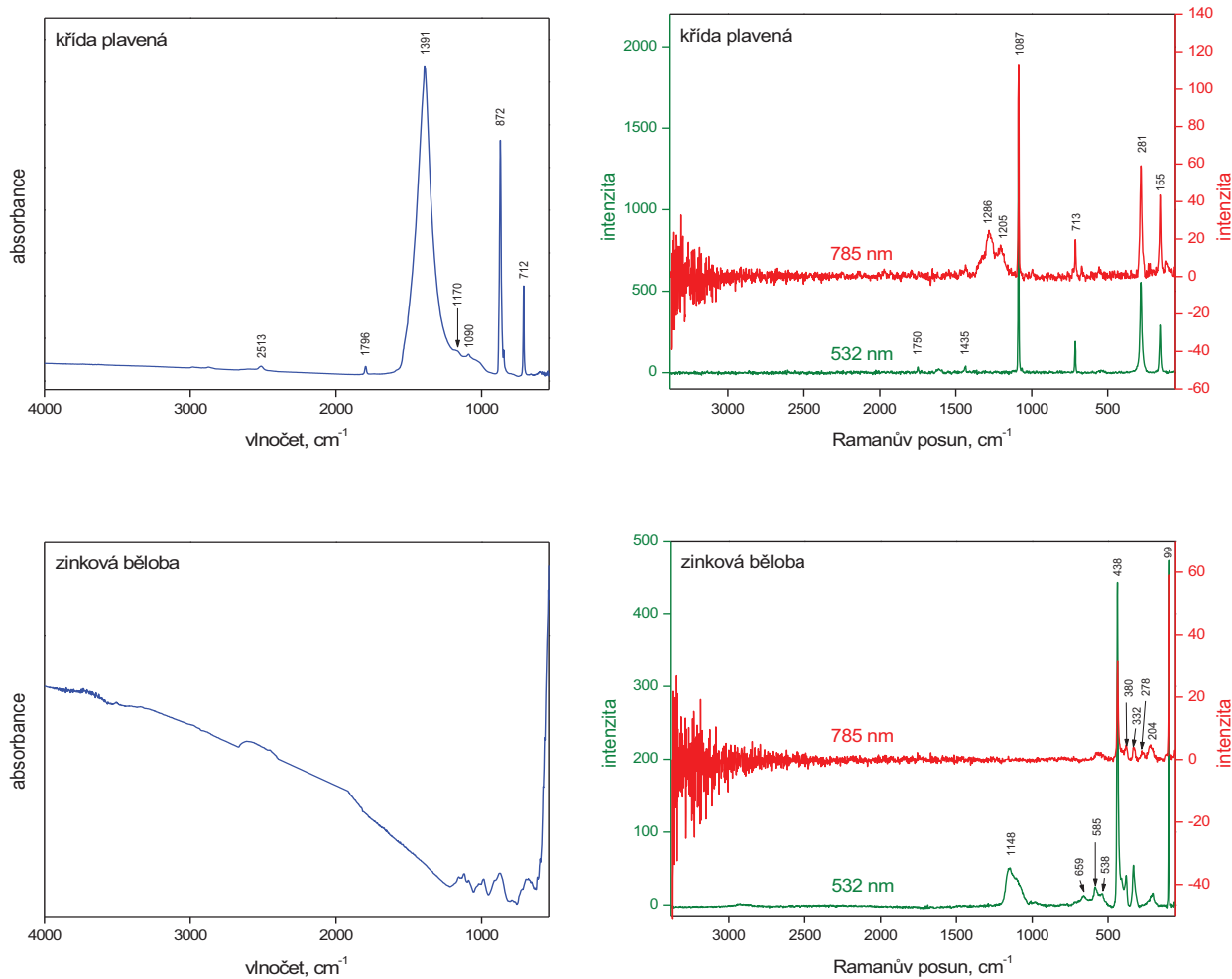


Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.

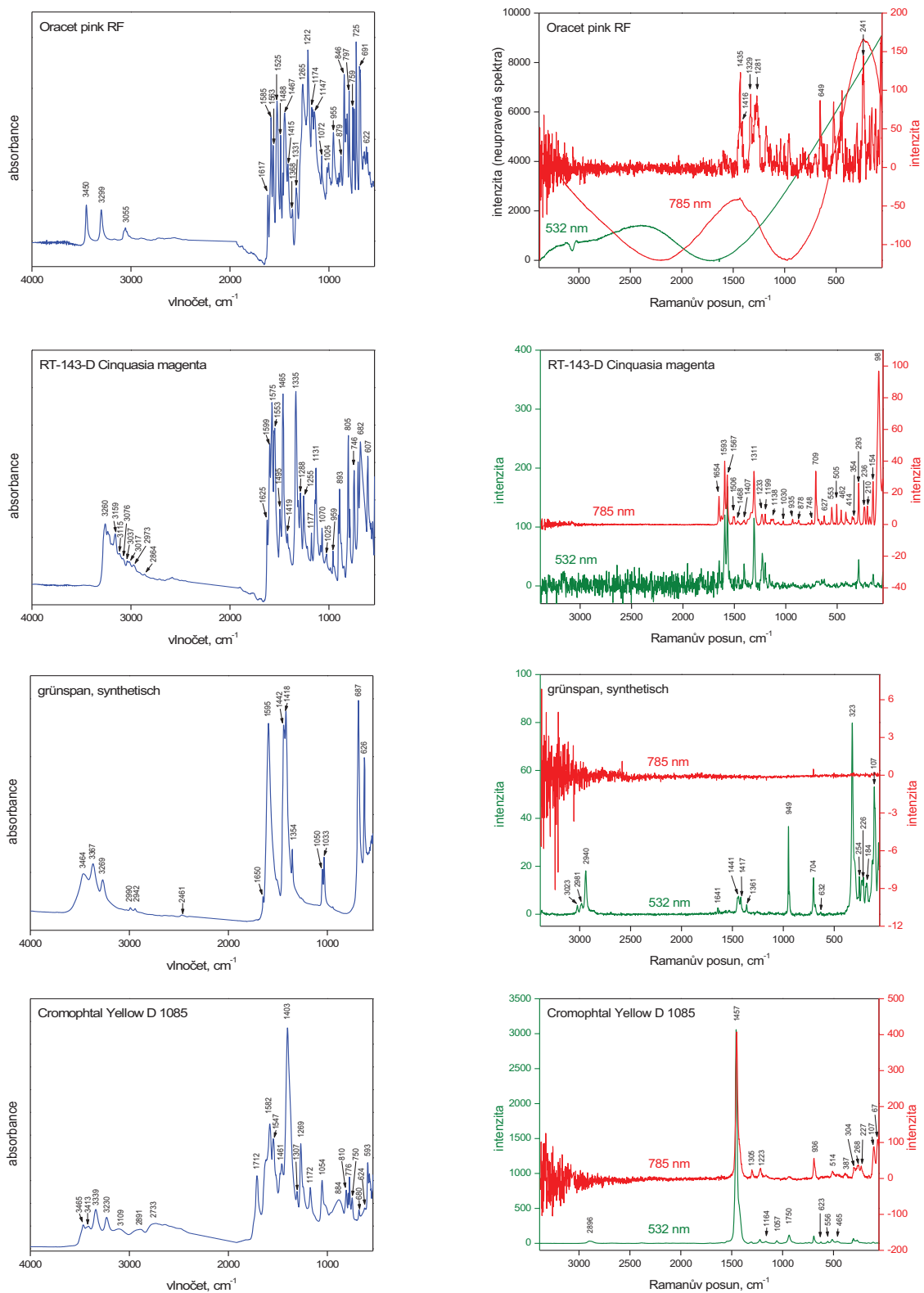
## DOPLNĚK



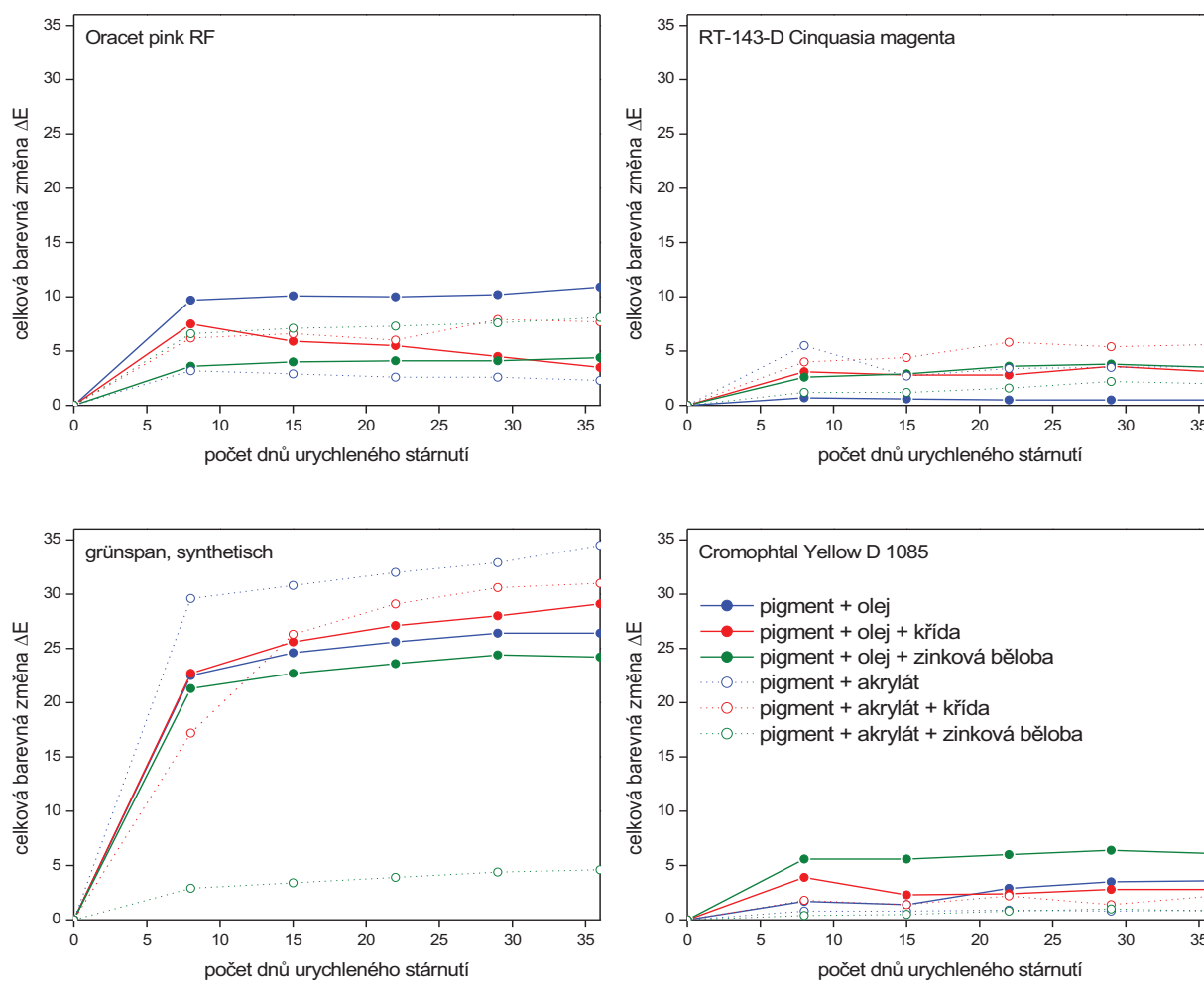
Obr. 1. FTIR a Ramanova spektra použitých pojiv. FTIR spektra (vlevo) a Ramanova spektra (vpravo) při použití dvou budících laserů: 532 nm – zelená linie (levá zelená osa y), a 785 nm – červená linie (pravá červená osa y). Ve spektrech jsou zobrazeny i vlnočty a Ramanovy posuny maxim jednotlivých pásů. FTIR spektra byla normalizována, Ramanova spektra linearizována



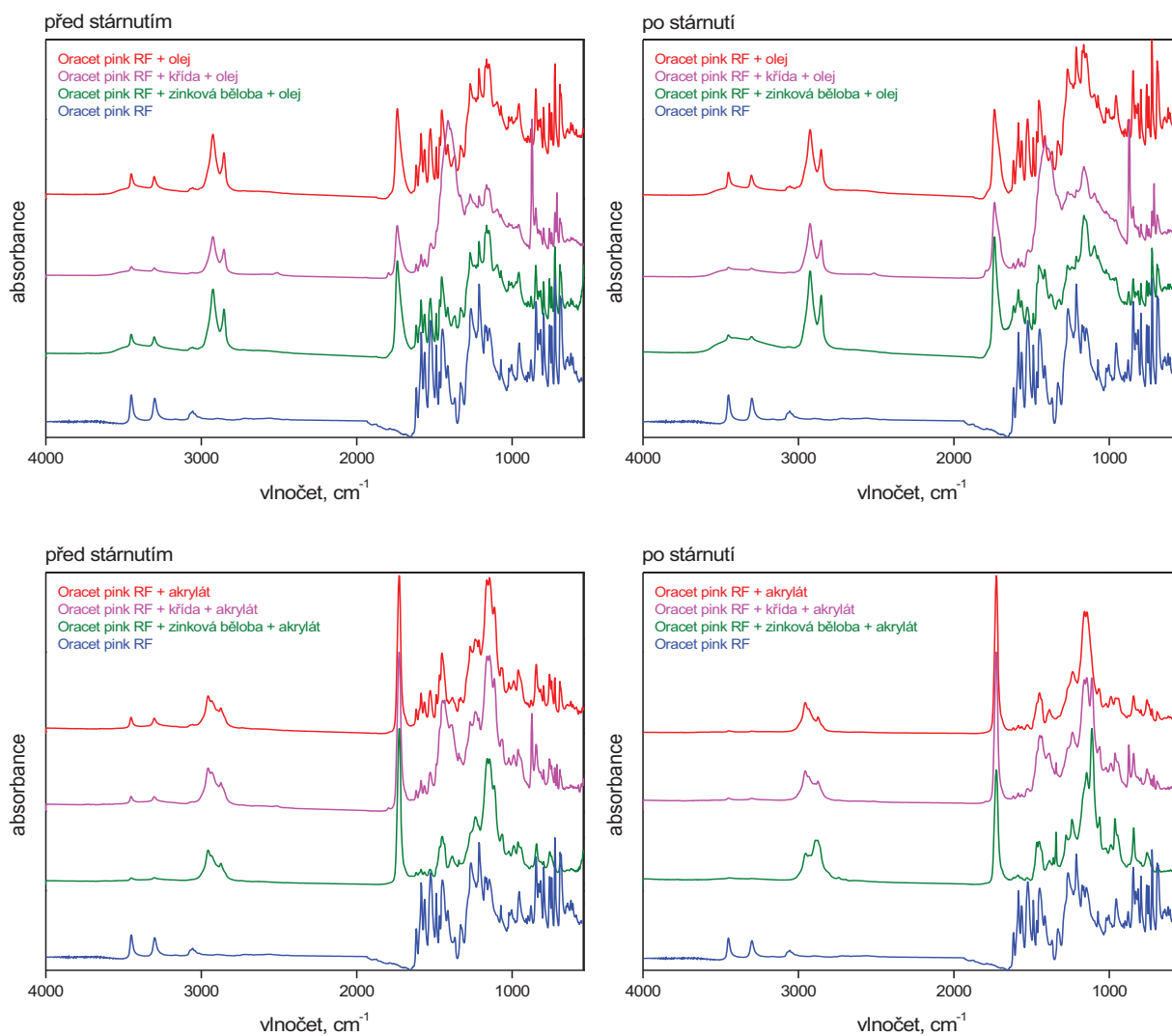
Obr. 2. **FTIR a Ramanova spektra použitých bělob.** FTIR spektra (vlevo) a Ramanova spektra (vpravo) při použití dvou budících laserů: 532 nm – zelená linie (levá zelená osa y), a 785 nm – červená linie (pravá červená osa y). Ve spektrech jsou zobrazeny i vlnočty a Ramanovy posuny maxim jednotlivých pásů. FTIR spektra byla normalizována, Ramanova spektra linearizována. FTIR spektrum zinkové běloby (oxid zinečnatý) zobrazuje pouze nerovnosti základní linie, které jsou příspěvkem odezvy samotného ATR krystalu a jsou součástí šumu pozadí, který byl při normalizaci spektra mnohonásobně zvýšen. Oxid zinečnatý absorbuje infračervené záření při nižších vlnočtech, než byl měřený rozsah vlnočtů



Obr. 3. FTIR a Ramanova spektra použitých pigmentů. FTIR spektra (vlevo) a Ramanova spektra (vpravo) při použití dvou budících laserů: 532 nm – zelená linie (levá zelená osa y), a 785 nm – červená linie (pravá červená osa y). Ve spektrech jsou zobrazeny i vlnočty a Ramanovy posuny maxim jednotlivých spektrálních pásů. FTIR spektra byla normalizována, základní linie Ramanových spekter byla linearizována (v případě pigmentu Oracet pink RF byla základní linie linearizována jen u linie pro laser 785 nm)

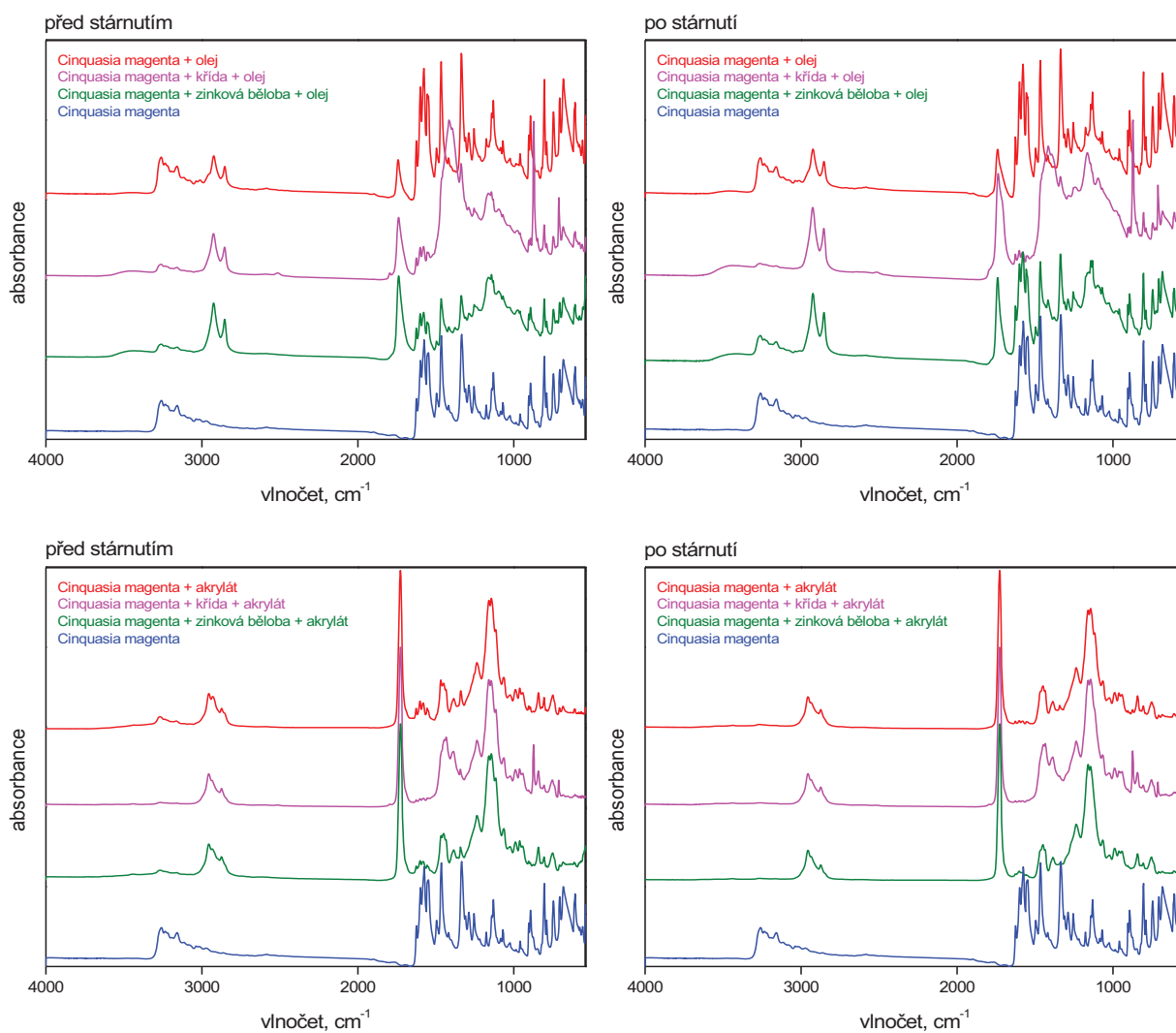


Obr. 4. Záznamy celkových barevných změn modelových vzorků během urychleného stárnutí. Stárnutí probíhalo při teplotě 55 °C a relativní vlhkosti 50 % po dobu 36 dní

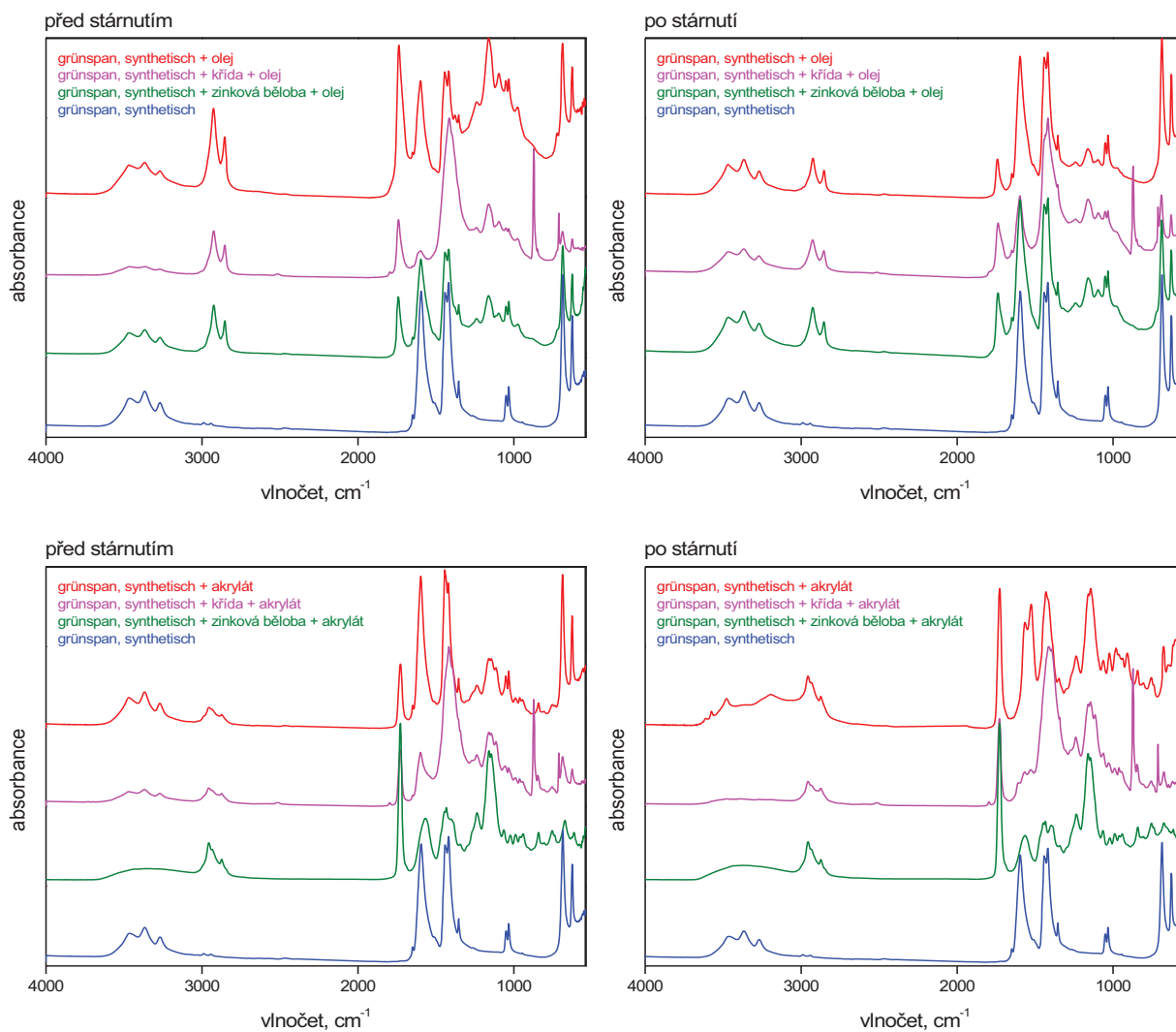


Obr. 5. FTIR spektra modelových vzorků pigmentu Oracet pink RF. FTIR spektra samotného pigmentu (modrá linie) a jeho modelových směsí s bělobami v oleji (nahore) i akrylovém pojivu (dole) před (vlevo) a po urychleném stárnutí (vpravo)

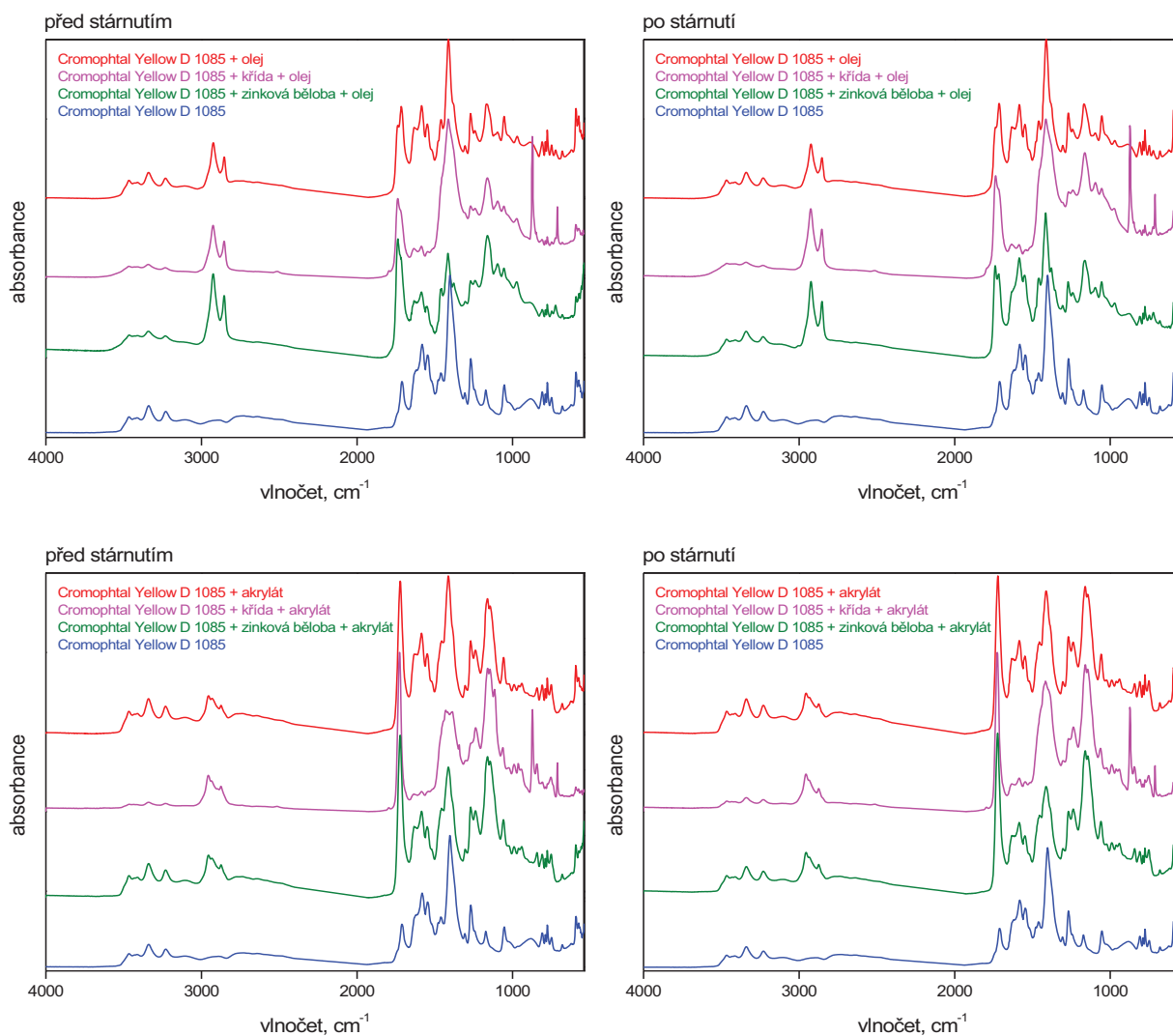




Obr. 6. FTIR spektra modelových vzorků pigmentu RT-143-D Cinquasia magenta. FTIR spektra samotného pigmentu (modrá linie) a jeho modelových směsí s bělobami v oleji (nahore) i akrylovém pojivu (dole) před (vlevo) a po urychleném stárnutí (vpravo)



Obr. 7. FTIR spektra modelových vzorků pigmentu grünspan, synthetisch. FTIR spektra samotného pigmentu (modrá linie) a jeho modelových směsí s bělobami v oleji (nahore) i akrylovém pojivu (dole) před (vlevo) a po urychleném stárnutí (vpravo)



Obr. 8. FTIR spektra modelových vzorků pigmentu Cromophtal Yellow D 1085. FTIR spektra samotného pigmentu (modrá linie) a jeho modelových směsí s bělobami v oleji (nahore) i akrylovém pojivu (dole) před (vlevo) a po urychleném stárnutí (vpravo)

## VÝROBA ENERGIÍ A VODÍKU NAsAZENÍM MALÝCH JADERNÝCH REAKTORŮ V CHEMICKÉM PRŮMYSLU

MARTIN ŠILHAN<sup>a</sup>, PETR POLÍVKA<sup>a</sup> a PETRA DVOŘÁKOVÁ RUSKAYOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centrum výzkumu Řež s.r.o., Hlavní 130, 250 68 Husinec-Řež, <sup>b</sup> The Extreme Light Infrastructure ERIC, Za Radnici 835, 252 41 Dolní Břežany, Česká republika  
martin.silhan@cvrez.cz

Došlo 26.10.23, přijato 13.11.23.

Článek popisuje synergii mezi malými modulárními jadernými reaktory a nízko- a vysokoteplotní elektrolýzou při produkci elektrické energie, tepla a výrobě vodíku. Je provedeno srovnání dodávek energií z malých jaderných reaktorů s běžnými typy obnovitelných zdrojů energie. Rovněž je uvedeno několik možných aplikací malých jaderných reaktorů pro potřeby chemického podniku.

Klíčová slova: malé jaderné reaktory, vodík, chemický podnik, elektrolýza

### Obsah

1. Úvod
2. Srovnání dodávek energie z malých modulárních reaktorů a obnovitelných zdrojů energie
3. Ilustrace možného nasazení malých modulárních reaktorů ve středně velkém chemickém podniku
4. Závěr

### 1. Úvod

Malé modulární jaderné reaktory (SMR, zkratka je používána i pro malé jaderné reaktory, které nejsou modulární) mají potenciál fungovat jako stabilní, nízkoemisní a bezúdržbový zdroj elektrické a tepelné energie. Cenou vyráběné elektrické energie zřejmě nebudou konkurovat velkým jaderným reaktorům, avšak mají celou řadu vlastností, které je předurčují pro nasazení ve výrobních podnicích zpracovatelského a především chemického průmyslu. Jsou jimi např. nižší investiční náklady, rychlost výstavby nebo jednodušší provoz. Jaderné reaktory IV. generace (GIV) jsou pokročilými jadernými reaktory navrženými k dosažení vyšší bezpečnosti, účinnosti a snížení produkce jaderného odpadu ve srovnání s předchozími generacemi jaderných reaktorů. V konstrukci se využívá modulární technologie tak, aby bylo možné jednotlivé komponenty vyrábět sériově a následně převézt na místo využití a tam jednoduše sestavit. Zmenšení velikosti reaktoru navíc sníží investiční náklady. Kompletní zařízení SMR by mělo zaujímat méně než desetinu plochy proti klasickému velkému reaktoru. Klíčovým rysem vysokoteplotních reaktorů je schopnost dosahovat vysokých provozních teplot, obvykle nad 700 °C. To umožňuje efektivní využití tepelné energie

pro další různé účely. Takto vysoké teploty umožňují širokou škálu aplikací, včetně výroby elektřiny, páry a jejího využití při průmyslovém vytápění, výrobě elektřiny, vodíku a dalších. Existuje několik různých typů vysokoteplotních jaderných reaktorů, které se liší v konstrukci, chlazení a palivu. Jedním z vysokoteplotních reaktorů je Very High Temperature Reactor (VHTR, reaktor s velmi vysokými teplotami), který může dosahovat výstupních teplot až 1000 °C. Výběr vhodného typu reaktoru závisí na konkrétních potřebách a aplikacích, jakož i na technických a regulačních faktorech. Řada vyvíjených SMR pracuje při zvýšených teplotách, proto očekáváme teplotu výstupní páry ze SMR vyšší než z jaderných reaktorů typu VVER, která je 324 °C u reaktoru VVER-1000 (cit.<sup>1</sup>). U reaktoru typu VHTR jde o teplotu až 1000 °C (cit.<sup>2</sup>), pára s takovými parametry je v průmyslu (jakožto i v energetice) velmi dobře využitelná.

Kombinace SMR a vysokoteplotní elektrolýzy (HTE, high temperature electrolysis) může plně nahradit zdroj energie, založený na fosilním palivu: jaderný reaktor je schopen dodávat kontinuálně teplo a elektrickou energii, připojený elektrolýzér je schopen vyrábět vodík (a kyslík). Kombinace SMR a HTE pro výrobu elektrické energie a tepla při měnících se momentálních (tzv. spotových) cenách elektrické energie pak může zajistit jak (žádané) kontinuální zatížení SMR, tak prodej přebytků elektrické energie při vysokých spotových cenách, které mohou být zapříčiněny vysokým podílem obnovitelných zdrojů v elektrizační soustavě. (HTE zařízení je totiž v principu schopné provozu v režimu elektrolýzy, nebo palivového článku – v režimu palivového článku vyrábí elektrickou energii a teplo). Další významnou výhodou je snížení nákladů prostřednictvím lokálního využití elektrické energie, u kterého odpadá nutnost hrazení celé řady poplatků spo-

jených s dodávkou elektrické energie, které mohou být vyšší než cena silové energie. Jedná se například o poplatek za distribuci elektrické energie, nebo poplatky na podporu obnovitelných zdrojů energie.

Při HTE se vodní pára rozkládá na vodík a kyslík při použití elektrického proudu. Hlavním rozdílem oproti konvenční elektrolýze je použití vysokých teplot, často nad 800 °C, což zvyšuje účinnost procesu. HTE představuje v současnosti nejméně technologicky vyspělou vodíkovou technologii, která ale skýtá mnohé přednosti. Výhodou vysoké provozní teploty je, že část energie, která je potřebná k proběhnutí elektrochemických reakcí, je dodána pomocí tepla, které je typicky levnější než elektrická energie. Proto je HTE často zmiňována jako obzvláště výhodná ve spojení s procesy, při kterých vzniká větší množství odpadního tepla. Díky tomuto efektu dosahuje HTE technologie vysoké účinnosti, měrná spotřeba elektrické energie na výrobu vodíku se pohybuje okolo 3,7 kWh<sub>AC</sub> / Nm<sup>3</sup> H<sub>2</sub> (LHV lower heating value, výhřevnost) (cit.<sup>3</sup>). Náběh z normální na provozní teplotu však obvykle trvá dlouho, typicky 12 hodin. Vysokoteplotní jaderné reaktory mohou poskytovat vysokopotenciálové teplo potřebné k provozu elektrolýzy, což zvyšuje energetickou efektivitu HTE a umožňuje vyrábět vodík s nízkými emisemi CO<sub>2</sub> (cit.<sup>3</sup>). V databázi vodíkových projektů IEA (cit.<sup>4</sup>) jsou ve fázi „operational“ pouze čtyři projekty, tři z nich mají průmyslové využití (výroba železa a oceli, methanolu a methanu). HTE je schopna procesu ko-elektrolýzy, nejčastěji reakcí vody s oxidem uhličitým. Této kombinace se využívá převážně z důvodu tvorby syntézního plynu, který je následně možné využít pro syntézu vyšších uhlovodíků. Další zkoumané ko-elektrolýzní technologie využívají např. směsi CO<sub>2</sub> a glycerol, nebo směs vody s dusíkem, s cílem alternativní výroby amoniaku.

Alkalická elektrolýza je již komerčně zralá a poměrně levná technologie. V literatuře<sup>3</sup> je uváděna měrná spotřeba elektrické energie na výrobu vodíku 5–6 kWh<sub>AC</sub> / Nm<sup>3</sup> H<sub>2</sub> (LHV). Oproti ostatním technologiím elektrolýzy však produkuje nejméně čistý vodík a je poměrně energeticky náročná. Vodíková elektrolýza s polymerním elektrolytem (PEM, proton exchange membrane) je technologie, které je v současnosti věnováno mnoho pozornosti pro její jednoduchost a dobré dynamické vlastnosti. Výhodou je vysoká čistota produkovaných plynů a kompaktní design. Měrná spotřeba elektrické energie na výrobu vodíku je podobná jako u alkalické elektrolýzy. Alkalická i PEM elektrolýza jsou dále označovány jako nízkoteplotní elektrolýza (LTE, low temperature electrolysis).

## 2. Srovnání dodávek energie z malých modulárních jaderných reaktorů a obnovitelných zdrojů energie

Pro srovnání byl jako reprezentant SMR využit koncept Energy Well (EW), vyvíjený v Centru výzkumu Řež. EW představuje koncept malého modulárního, fluoridového, konstrukčně jednoduchého jaderného reaktoru se sed-

miletým cyklem paliva a vysokým stupněm pasivní bezpečnosti. Je navržen tak, aby mohl být transportován s čerstvým jaderným palivem, bez nutnosti výměny jaderného paliva u zákazníka. Plánovaná jednotka EW produkuje 8 MWe a 20 MWt. Uvažována byla konzervativně provozní doba řetězce sestávajícího z SMR, elektrolýzéry a navazující technologie, která odpovídá 90 % z ročního hodinového fondu, který obnáší 8760 h. Technologie 1 MWe LTE produkuje ročně 0,16 kt vodíku, 1 MWe HTE pak vyrobí o 50 % více vodíku (pro to však spotřebuje ještě 0,3 MW tepla ve formě páry). Uvažované měrné spotřeby elektrické energie pro výrobu 1 t vodíku jsou 55 MWh pro LTE a 37 MWh pro HTE. Srovnání výroby EW, fotovoltaické elektrárny (FVE) a větrné elektrárny (VtE) je provedeno v tab. I.

Očekáváme, že vodík, vyráběný během kontinuálního provozu SMR bude mírně levnější než vodík vyráběný z OZE, a to díky vysokému využití elektrolýzéry ve spojení se SMR. Faktor využití výkonu elektrolýzéry má při určení nákladovosti výroby vodíku význam především při nižších cenách elektrické energie, při ilustrativní ceně silové elektřiny 100 EUR/MWh jsou již náklady na odpis elektrolýzéry zanedbatelné proti nákladům na spotřebu elektřiny. Pro srovnání nákladů bylo využito metodiky popsané v cit.<sup>8</sup>. Vzhledem k nedávnému výraznému poklesu cen HTE elektrolýzérů<sup>9</sup> a obecně vysokým cenám silové elektrické energie očekáváme budoucí masivní nasazení HTE elektrolýzérů spolu se SMR.

## 3. Ilustrace možného nasazení malých modulárních jaderných reaktorů ve středně velkém chemickém podniku

SMR jsou koncipovány tak, aby pracovaly jako bezúdržbové. Další výhodou je dlouhodobá kontinuální dodávka energie s očekávanou vysokou dostupností výkonu, kterou konzervativně odhadujeme na cca 90 %. Taková dostupnost výkonu bezpečně pokryje potřeby navazujících technologií.

Střednědobé výkyvy v dobách nízké poptávky, nebo nízké ceny elektřiny, mohou být vykryty řetězcem, který se skládá z částí: elektrolýzér, zásobník vodíku a palivový článek. Při použití nízkotlakého skladování vodíku není nutné použití vodíkového kompresoru, což je investičně nákladné zařízení. Elektrolýzér může být nízkoteplotní, vysokoteplotní elektrolýzér může velmi rychle přejít do režimu palivového článku. Vzhledem k poklesu ceny HTE elektrolýzérů a vysoké elektrické účinnosti HTE procesu vychází jejich nasazení výhodněji než nízkoteplotních elektrolýzérů. V následujícím textu předestíráme několik reálně využitelných aplikací SMR v chemickém průmyslu.

### Chlor-alkalická elektrolýza

Elektřinu produkovanou ze SMR je možné využít jako zdroj energie pro chlor-alkalickou elektrolýzu. Typická tuzemská průmyslová jednotka chlor-alkalické elektro-

Tabulka I  
Srovnání Energy Well a vybraných obnovitelných zdrojů (fotovoltaických a větrných elektráren)

Parametr	Energy Well	OZE
Řiditelnost výkonu	Výkon je stálý a neřiditelný.	Výkon závisí na aktuálních přírodních podmínkách, není možné jej přesně predikovat ani řídit (výkon lze snížit).
Disponibilita výkonu (hodin/rok)	Očekává se vysoká, zhruba 8700 h/rok.	Obecně nízká, závislá na přírodních podmínkách. VtE v podmínkách ČR 1800–2100 h/rok. Pro přípovrchové VtE je mírně vyšší, běžně se neuvádí. FVE cca 1000 h/rok.
Zábor půdy pro 8 MWe jednotku	Očekává se 900 m <sup>2</sup> .	VtE vyžaduje 1333 m <sup>2</sup> (viz poznámka 1), FVE vyžaduje 80 000 m <sup>2</sup> .
Nutná infrastruktura	Jako pro OZE, navíc nutný vodní zdroj a pravděpodobně vyšší míra ostrahy objektu.	Zpevněná cesta, oplocení pozemku, vyvedení výkonu do distribuční soustavy (nejčastěji na napěťové hladině 22 kV).
Potenciál dalšího rozvoje v ČR	Neomezený, podle potřeb trhu a elektrizační soustavy.	Potenciál VtE do roku 2040 je 2,5–7 GW (cit. <sup>5</sup> ). FVE nad 100 kW – technický potenciál výstavby špičkového výkonu je 10,23 GW (cit. <sup>6</sup> ).
Investiční náklady pro 8 MWe jednotku	Odhad 1000–1500 mil. Kč (cit. <sup>15</sup> ), viz Poznámka 2.	VtE 160–300 mil. Kč (cit. <sup>5,7</sup> ), je patrný významný pokles cen především turbín. FVE 100 mil Kč (dle informací od investorů).

Poznámka 1: Uvedený parametr (MW/plocha) významně závisí na topologii pozemku. I když existují stále účinnější FV panely i nové koncepty umístění panelů, nelze očekávat, že by se potřebná plocha výrazně snížila a přiblížila se tak k ploše, nutné pro výstavbu EW. Plocha pro VtE vychází z VtE Pchery, jedna turbína o výkonu 3 MWe má zabranou plochu odhadem 500 m<sup>2</sup>. Využití sousedních ploch má určitá omezení, nejedná se však o zábor půdy.

Poznámka 2: technologicky nejpodobnější projektu EW je reaktor IMSR (300) s investičními náklady 4,05 mil. USD/MWe (v cenách roku 2020) a s výrazně vyšším výkonem 195 MWe.

lýzy má příkon 30–50 MWe a její produkty tvoří vodík, chlor a hydroxid (sodný nebo draselný). Výhodou chlor-alkalické elektrolýzy je určitá variabilita ve výkonu, část energie ze SMR lze v případě vysokých spotových cen prodávat a produkci odložit na dobu nižší ceny elektrické energie. U membránové chlor-alkalické elektrolýzy je spotřeba elektrické energie cca 2,3–3 MWh/t chloru<sup>10</sup> (uvažováno 2,5 MWh/t). Uvedená hodnota zahrnuje kromě elektrolýzy i následné operace jako sušení, čištění apod. Předpokládáme, že v roce 2017 zrušená a nově plánovaná výroba (s kapacitou 135 kt/rok Cl<sub>2</sub>) v neratovické Spolaně má tržní potenciál a odhadnutý nominální příkon chlor-alkalických elektrolýzérů 43 MWe, kterýžto může být dodán pomocí SMR.

#### Výroba a skladování technických plynů

Energie a teplo ze SMR je možné využívat pro výrobu, čištění, lahvování a distribuci vodíku a kyslíku, které tvoří produkty elektrolýzy. Technologie 10 MW LTE (nebo 6,7 MWe HTE) ročně vyrobí 1,6 kt vodíku a 12,8 kt kyslíku. Elektřinu ze SMR je možné využít pro napájení jednotky frakční destilace vzduchu, jednotka na zpracování 360 t/h vzduchu má příkon 22,3 MW. Při použití 10 MWe ze SMR by bylo možné zpracovávat zhruba 161 t vzduchu/h (cit.<sup>11</sup>). Je možné využít LTE i HTE, pro výrobu vysoce čistého vodíku, např. pro použití v dopravních aplikacích, je preferovanou technologií PEM.

#### Hydrogenované rostlinné oleje

Hydrogenované rostlinné oleje (HVO, hydrogenated vegetable oil) lze použít jako kvalitní součást motorové nafty. Uvažujeme jednu výrobní jednotku s produkcí 380 kt HVO za rok, která bude zpracovávat pouze řepkový olej. Řepkový olej obsahuje nejvíce olejové kyseliny (C18), palmový olej obsahuje 44 % palmitové kyseliny (C16) a 39 % olejové kyseliny (C18). Na přeměnu 1 kt palmového oleje na HVO je potřeba 210·10<sup>3</sup> Nm<sup>3</sup>, tedy cca 0,019 kt vodíku<sup>12</sup>. Odhadujeme, že na přeměnu 1 tuny řepkového oleje bude potřeba 0,02·10<sup>-3</sup> kt vodíku, ročně tedy jednotka spotřebuje 7,6 kt vodíku. Pro takovou výrobu HVO by tedy byl potřeba LTE o příkonu 48 MWe, nebo HTE o příkonu 32 MWe. Vzhledem k velké kapacitě a relativně ustálenému charakteru výroby preferujeme použít HTE.

Další možné použití HVO je při výrobě cukrovinek. V ČR existuje několik potravinářských závodů, které využívají HVO, ale pravděpodobně hydrogenaci olejů nevyžívají. Celkovou roční výrobu cukrovinek v ČR odhadujeme na 60 kt, předpokládáme průměrný obsah 25 hm.% tuku v cukrovinkách, poměry molárních hmotností vodíku a oleje pak 2:836 (řepkový olej, výrobce PREOL, a.s.) a stechiometrii 4 atomy vodíku na jednu molekulu mastné kyseliny. S tím spojený odhad roční produkce vodíku na výrobu cukrovinek produkovaných v České republice činí 0,315 kt, to odpovídá nízkoteplotnímu elektrolýzérovi

o příkonu 2 MWe. Jde tedy o poměrně marginální oblast využití vodíku, vzhledem k velikosti výroby přichází do úvahy prakticky výhradně malý LTE, pravděpodobně PEM.

#### Výroba amoniaku

V rámci výroby amoniaku předpokládáme využití elektrické energie ze SMR pouze na výrobu vodíku, který bude následně využit pro Haberovu-Boschovu syntézu. Z jedné 100 MWe SMR jednotky lze získat 16 kt vodíku ročně pomocí nízkoteplotní elektrolýzy, nebo 24 kt vodíku ročně pomocí HTE. Z tohoto množství vodíku lze stechiometricky vyrobit 90 kt / 135 kt amoniaku ročně. Vzhledem k charakteru a velikosti výroby navrhujeme využití HTE. Pro srovnání, spotřeba průmyslově vyrobených dusíkatých hnojiv v roce 2022 v ČR byla odhadem 390 kt. Tato hodnota je srovnatelná s uvedenou produkcí amoniaku, neboť typické dusíkaté hnojivo užívané v ČR (močovina, dusičnan amonný, dusičnan vápenatý, poslední dva s uměle sníženým obsahem dusíku z legislativních důvodů) má vyšší molární hmotnost i nižší podíl dusíku než amoniak.

#### Výroba anilinu

Při uvažované tuzemské produkci anilinu ve výši 210 kt/rok (tato hodnota odpovídá produkci společnosti BorsodChem MCHZ) bude potřeba pomocí elektrolýzy ze SMR vyrobit 13 kt vodíku ročně. Takovéto množství by vyžadovalo LTE o příkonu minimálně 81 MWe nebo HTE o příkonu 54 MWe. Vzhledem k charakteru a velikosti výroby navrhujeme využití HTE.

#### Doprava a rezidenční sektor

Pro zásobování vodíkové plnicí stanice pro vozidla, která spotřebuje 1 t vodíku denně, je nutný nízkoteplotní elektrolyzátor o příkonu 2,3 MWe. Dodávka vodíku na plnicí stanice je potenciálně zajímavá podnikatelská příležitost pro chemické podniky, mj. protože vodík na plnicí stanice je výrazně dražší než vodík v průmyslu. Tato skutečnost je dána především logistickými náklady a částečně náklady na kompresi vodíku na vysoké tlaky. Logistické náklady je možné minimalizovat, např. umístěním výroby blízko místa spotřeby, nebo využitím potrubní přepravy vodíku. Zde existuje příležitost pro majitele velkoprostorových areálů, ve kterých budou umístěny SMR, výroba vodíku, a také prodej vodíku v plnicích stanicích. Je pravděpodobné, že v oblasti vodíkové logistiky dojde k dalšímu budoucímu technologickému rozvoji a k nárůstu konkurence a logistické náklady vodíku se sníží. Stejně tak očekáváme snížení investičních nákladů na vysokotlaké vodíkové kompresory, vhodné pro vysoce čistý vodík. Při výrobě suchého vodíku s využitím PEM elektrolyzátoru není nutná další chemická úprava vodíku, při využití alkalického elektrolyzátoru představuje nejdůležitější úpravu deoxygenace. Vzhledem ke specifickým požadavkům na kvalitu vodíku navrhujeme využití LTE, konkrétně PEM technologie. Jedna vodíková plnicí stanice představuje příliš

malý odběr pro nasazení jednotky EW, plnicí stanice představuje spíše doplněk k jiné elektrolýzní technologii. Další možností je vybudování velkokapacitní plnicí stanice, například v místě očekávané vysoké spotřeby, typicky v intermodálních uzlech, kombinujících různé formy dopravy, např. silniční, železniční a lodní.

#### Ko-elektrolýza

Další možností je výroba chemických látek procesem vysokoteplotní ko-elektrolýzy. Bez výjimky jde o zajímavé ale málo komerčně zralé technologie. Využitelná je např. pro výrobu amoniaku ko-elektrolýzou dusíku a vody nebo výrobu uhlovodíků ko-elektrolýzou směsi oxidu uhličitého a vody<sup>14</sup>.

## 4. Závěr

Pokročilé malé modulární jaderné reaktory mají obrovský potenciál pro nasazení v chemickém průmyslu jako stálý, spolehlivý, bezúdržbový a prakticky bezemisní zdroj. Cena vyrobené elektrické energie je z jejich fyzikální podstaty vyšší než u velkých jaderných reaktorů a výrazně se liší podle použitých konceptů SMR (cit.<sup>15</sup>). Uvádí se typické investiční náklady 4 mil. USD / 1 MWe, což pro 8 MWe jednotku představuje investiční náklady 768 mil. Kč, v cenách roku 2023 uvažujeme s investičními náklady pro 8 MWe jednotku 1–1,5 mld Kč (cit.<sup>15</sup>).

Vzhledem k určité výkonové variabilitě chemických procesů očekáváme, že bude možné SMR využívat tak, aby bylo maximum dodávek elektrické energie dodáno v dobách vysokých cen elektrické energie. Dalším benefitem nasazení SMR v chemickém průmyslu je zajištění lokální spotřeby tepla a především elektrické energie a s tím související významná úspora poplatků za distribuci elektrické energie.

Pro nasazení SMR je třeba zjednodušit související legislativu, především zákon 263/2016 Sb, atomový zákon, který v současné době nerozlišuje mezi SMR a velkými jadernými reaktory. Dále je nutné legislativně zakotvit logický fakt, že vodík vyrobený elektrolýzou ve spojení s jaderným zdrojem je vodíkem nízkouhlíkovým.

Očekáváme, že v čase komerčního spuštění budou v kombinaci se SMR využívány především HTE elektrolyzátor. Cena HTE elektrolyzátorů neustále klesá a pokles se očekává i ve výhledu let 2030 až 2050 (cit.<sup>16</sup>). Do roku 2030 se očekává pokles cen elektrolyzátorů nízkoteplotních, i když ne tak výrazný<sup>16</sup>. Procesem ko-elektrolýzy s využitím HTE bude v budoucnu možné efektivně vyrábět látky využitelné jako neropná motorová paliva nebo hnojiva. V době komerčního nasazení SMR tak jedno HTE zařízení bude schopné dodat energii pro elektrolýzu, palivový článek, nebo pro ko-elektrolýzu, což značně zvýší variabilitu využití zařízení. Očekáváme, že instalace SMR do chemických podniků a lokální využití elektrické energie a vyrobeného vodíku bude mít v chemickém průmyslu řadu dalších aplikací.

Prezentované výsledky byly realizovány v rámci Institucionální podpory Ministerstva průmyslu a obchodu ČR.

## LITERATURA

1. <https://www.cez.cz/cs/o-cez/vyrobní-zdroje/jaderna-energetika/je-ve-svete/zakladni-typy-jadernych-reaktoru>, staženo 17. 10. 2023.
2. Technology Roadmap Update for Generation IV Nuclear Energy Systems, Gen IV International Forum, 2013, dostupné na [https://www.gen-4.org/gif/jcms/c\\_60729/technology-roadmap-update-2013](https://www.gen-4.org/gif/jcms/c_60729/technology-roadmap-update-2013), staženo 17. 10. 2023.
3. Sebbahi S., Nabil N., Alaoui-Belghiti A., Laasri S., Rachidi S., Hajjaji A.: Mater. Today: Proc. 66, 140 (2022).
4. Hydrogen projects database, International Energy Agency. Dostupné na: <https://www.iea.org/data-and-statistics/data-product/hydrogen-projects-database>, staženo 17. 10. 2023.
5. Hanslian D.: Aktualizace potenciálu větrné energie v České republice z perspektivy roku 2020. Dostupné na <https://csve.cz/img/wysiwyg/file/Potencial-vetrne-energie-2020.pdf>, staženo 17. 10. 2023.
6. EGÚ Brno, Oponentní posudek k vybraným tématům z návrhu Národního Klimaticko-Energetického Plánu (NKEP) pro oblast FVE, 2021, dostupné na [https://www.solarniasociace.cz/aktuality/20190107\\_oponentni-posudek-k-nkep-pro-fve.pdf](https://www.solarniasociace.cz/aktuality/20190107_oponentni-posudek-k-nkep-pro-fve.pdf), staženo 17. 10. 2023.
7. Investice a návratnost větrných elektráren, dostupné na <https://www.pro-ventrniky.cz/cs/fakta-o-vetrnych-elektrarnach/investice-a-navratnost-ve>, staženo 17. 10. 2023.
8. Tocháčková A., Laciok A., Šilhan M: Chem. Listy 115, 623 (2021).
9. Gerlof N.: Sustainable Energy Fuels 7, 1893 (2023).
10. Brinkmann T., Giner Santonja G., Schorcht F., Roudier S., Delgado Sancho L.: Best Available Techniques (BAT) Reference Document for the Production of Chlor-alkali. Industrial Emissions Directive 2010/75/EU (Integrated Pollution Prevention and Control). EUR 26844. Publications Office of the European Union; 2014. JRC91156. Dostupný na <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC91156>, staženo 17. 10. 2023.
11. Aneke M., Wang M: Appl. Therm. Eng. 81, 223 (2015).
12. Blažek J., Kochetkova D., Shumeiko B., Váchová V., Straka P.: Paliva 2, 42 (2020).
13. Zpráva o stavu zemědělství ČR za rok 2022, dostupný na <https://eagri.cz/public/portal/mze/publikace/zpravy-o-stavu-zemedelstvi/zelena-zprava-2022>, staženo 17. 10. 2023.
14. Dvořáková Ruskayová P., Tocháčková A., Šilhan M.: Chem. Listy 115, 134 (2021).
15. Steigerwald B., Weibezahn J., Slowik M., von Hirschhausen Ch.: Energy 281, 128204 (2023).
16. Gerloff N: Sustainable Energy Fuels 7, 1893 (2023).

**M. Šilhan<sup>a</sup>, P. Polívka<sup>a</sup>, and P. Dvořáková-Ruskayová<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> Research Centre Řež, <sup>b</sup> The Extreme Light Infrastructure ERIC, Czech Republic): **Production of Energy and Hydrogen within Chemical Plants Using Small Nuclear Reactors**

The article outlines the possibility of synergistic use of small nuclear reactors and low- and high-temperature electrolysis. The small modular nuclear reactor is compared to common types of renewables. Furthermore, possible small nuclear reactors application in chemical enterprises is shown.

Keywords: small modular nuclear reactors, hydrogen, chemical enterprise, electrolysis

*Acknowledgements*

The presented results were realized within the Institutional Support of the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic.



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.

# 11. mezinárodní chemicko-technologická konference

## DEKARBONIZACE ENERGETICKY NÁROČNÝCH ODVĚTVÍ - GREEN DEAL,

- Dekarbonizace - konverze a skladování energií, zachytávání uhlíku a jeho použití
- Inovativní způsoby výroby vodíku s využitím obnovitelných a udržitelných zdrojů energie
- Oběhové hospodářství

## ORGANICKÁ TECHNOLOGIE, PETROCHEMIE, APLIKOVANÁ KATALÝZA A ORGANICKÁ TECHNOLOGIE

- Ropa, plyn, uhlí – alternativní suroviny, nové technologie, biorafinerie, paliva, biopaliva
- Petrochemie a organická technologie – alternativní suroviny, nové technologie, nové a rozhodující produkty včetně výroby polymerů
- Aplikovaná katalýza a organická technologie

## BIOTECHNOLOGIE, TECHNOLOGIE CHEMICKÝCH SPECIALIT

- Biotechnologie a biorafinace
- Syntéza a výroba léčiv
- Polymery, kompozity

## NOVÉ MATERIÁLY, ZDROJE ENERGIE, VODÍKOVÁ STRATEGIE, POKROČILÉ PROCESY A APARÁTY, TECHNOLOGIE PRO OCHRANU PROSTŘEDÍ

- Anorganická technologie
- Materiálové inženýrství (včetně moderních kovových biomateriálů pro lékařské účely)
- Procesní inženýrství
- Technologie pro ochranu prostředí

## EKONOMIKA CHEMICKÉHO PRŮMYSLU

- Ekonomika chemického průmyslu v nových podmínkách

**15.-17. 4. 2024**  
průběh  
konference

do  
**11. 3. 2024**  
zaslání  
abstrakt

do  
**25. 3. 2024**  
zlevněný  
poplatek

do  
**30. 6. 2024**  
zaslání  
plných  
textů

Registrace, formulář k zaslání abstrakt  
a další informace na [www.icct.cz](http://www.icct.cz)



### SBORNÍK PLNÝCH TEXTŮ V ELEKTRONICKÉ FORMĚ

Naším cílem je zveřejnit plné texty v angličtině v databázi Web of Science Clarivate Analytics. Plné texty budou po recenzi členy vědeckého výboru uveřejněny ve sborníku. Elektronický sborník (PDF) plných textů bude vydán v listopadu 2024 a umístěn na web konference.

# SOUTĚŽ

## na logo Školy hmotnostní spektrometrie – 2. kolo

Sekce hmotnostní spektrometrie SSJMM vyhlašuje soutěž na **návrh loga** Školy hmotnostní spektrometrie.

### Škola hmotnostní spektrometrie:



Výuková akce pořádaná Spektroskopickou společností Jana Marka Marci určená pro začínající i zkušené odborníky v oblasti hmotnostní spektrometrie.

### Podmínky soutěže:

- Použitá grafika musí mít jasnou souvislost s hmotnostní spektrometrií (např. spektrum, píky, elektrosprej, kvadrupól apod.). Grafiku (její vhodnost pro logo, souvislost s hmotnostní spektrometrií apod.) lze během přípravy návrhu konzultovat se Zadavatelem.
- Název lze použít ve formě „Škola hmotnostní spektrometrie“, „Škola MS“, nebo (nejméně preferovaná varianta) „MS Škola“.
- Nebudou použity barevné přechody.
- Pokud bude návrh v barevném provedení, bude zpracována i černobílá verze.
- Logo musí být univerzálně použitelné v různých velikostech (web, tašky, propagační předměty...).

### Logo by podle účastníků 24. Školy MS mělo být:

Jednoduché, minimalistické, zapamatovatelné, srozumitelné, rozpoznatelné, nadčasové, elegantní, výstižné – na první pohled související s hmotnostní spektrometrií, barevné, ale ne příliš.

### Formát:

Návrh bude odevzdán v elektronické podobě ve formě vektorové grafiky a současně ve formě náhledu v pdf souboru, kde bude logo zobrazeno ve dvou velikostech (velké, v průměru aspoň 15 cm, a malé, v průměru cca 2 cm). Pokud je barevné řešení jiné než černobílé, odevzdá soutěžící taktéž černobílou mutaci loga.

### Termín:

Soutěžní návrhy je nutno doručit na adresu tajemníka Spektroskopické společnosti JMM Tomáše Vašiny (immss@spektroskopie.cz) nejpozději do **29. února 2024**.

### Cena pro vítěze:

Peněžitá odměna **20 000,- Kč**.

### Další podmínky:

Vyhlašovatel si vyhrazuje právo nevybrat žádný z předložených návrhů a neudělit cenu.

Autor vítězného návrhu dává SSJMM souhlas k plnému využití díla a přenechává jim veškerá práva z díla plynoucí.

## Veletrh analytica 2024 ukazuje laboratorní svět zítřka

Veletrhu se zúčastní všichni lídři trhu

Vysoký nárůst počtu vystavovatelů ze zahraničí

Nabitý doprovodný program s konferencemi a odbornými fóry

Top témata veletrhu: digitalizace a udržitelnosti



analytica



Ve dnech 9. až 12. dubna se mezinárodní laboratorní průmysl znovu sejde na veletrhu analytica v Mnichově. Přední světový veletrh laboratorní techniky, analytiky a biotechnologie pokrývá celé spektrum laboratoří v průmyslu a výzkumu a klade velký důraz na výměnu odborných znalostí pro vědu a praxi.

Ředitelka veletrhu paní Susanne Grödl poskytla náhled na inovace, hlavní body a vrcholy akce:

### *Paní Grödl, jak probíhají registrace vystavovatelů na analytica 2024?*

Přihlášeno je již kolem 800 vystavovatelů a opět se účastní všichni národní a mezinárodní lídři na trhu. Jsme svědky vysokého růstu, zejména vystavovatelů z Číny, tito jsou již na úrovni před pandemií. Velký zájem zaznamenáváme také ze strany inovativních start-upů a menších firem, které dosud na analytice nevystavovaly. Nebudou chybět ani velké společné stánky z předních trhů jako USA. V současné době je zřejmé, že zvláště hojně budou zastoupeny oblasti „analytika a kontrola kvality“. Jako obvykle obsadíme celkem pět výstavních hal o velikosti 40 000m<sup>2</sup>. Přihlášeno je také 10 vystavovatelů z Česka a mám informace o tom, že se chystá opět společná česká expozice.

### *Na jaká oborová témata se bude letošní analytica zaměřovat?*

Digitalizace v laboratoři zůstává jedním z klíčových témat v oboru. Proto opět nabídneme speciální show „Digitální transformace“ ve spolupráci s firmou SmartLab Solutions GmbH, kde si návštěvníci mohou vyzkoušet práci v propojené a digitalizované laboratoři na pěti případech použití. Ústředním bodem je také udržitelnost v laboratorním prostředí: budou prezentována a diskutována vhodná řešení, například jak lze snížit energetické požadavky nebo jak lze materiály znovu použít. Analýza potravin také hraje důležitou roli při dalším zlepšování jejich bezpečnosti a kvality a poskytování spolehlivých informací pro spotřebitele o nich. V této oblasti si také troufáme nahlédnout do budoucnosti a zabývat se alternativními formami potravin, a to v souvislosti s udržitelností a globální výživou.

### *Na jaké vrcholy se můžeme těšit na veletrhu analytica 2024?*

Renomovaná mezinárodní konference analytica se jako vždy koná souběžně s veletrhem v kongresovém centru na výstavišti. S přibližně 180 přednáškami zahraničních řečníků pokrývá celé spektrum moderní analytiky a podporuje přímou výměnu mezi vědou a byznysem. Čtyři odborná fóra na veletrhu jsou velmi orientovaná na praxi a poskytují cenné tipy pro každodenní laboratorní práci. Fórum bezpečnosti a ochrany zdraví při práci je zde obzvláště oblíbené, protože svými někdy výbušnými živými ukázkami jasně demonstruje nebezpečí každodenní laboratorní práce. Opět nabízíme také akce pro absolventy škol a pro profesní rozvoj. V neposlední řadě: Paralelně s veletrhem analytica se koná přední mezinárodní veletrh pro keramický průmysl ceramitec, což vytváří další synergie pro vystavovatele a návštěvníky.



---

**OBSAH****ÚVODNÍK**

- Od přirozeného k umělému** 77  
P. Chuchvalec

**REFERÁTY**

- Betulonová a platanová kyselina jako základ pro syntézu nových terapeuticky účinných látek** 78  
L. Černá, Z. Wimmer, A. Massyagutova a P. Lovecká

- Biotechnologická produkce butanolu** 86  
B. Branská

- Výskum a vývoj nových procesov izolácie prchavých aromatických látok z prírodných materiálov** 95  
J. Čuchorová a J. Blaško

**PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE**

- Využití moderních výpočtových metod a neuronových sítí k optimalizaci metody pro LC/MS/MS analýzu vojensky významných organofosforových látek** 103  
D. Trefilík

- Možnosti spektroskopické analýzy modelových vzorků moderních pigmentů** 111  
E. Svobodová a I. Kopecká

**CHEMICKÝ PRŮMYSL**

- Výroba energií a vodíku nasazením malých jaderných reaktorů v chemickém průmyslu** 118  
M. Šilhan, P. Polívka a P. Dvořáková-Ruskayová

---

**CONTENTS****EDITORIAL**

- From the Natural to the Artificial** 77  
P. Chuchvalec

**REVIEW ARTICLES**

- Betulonic and Platanic Acids as a Basis for the Synthesis of New Therapeutically Effective Substances** 78  
L. Černá, Z. Wimmer, A. Massyagutova, and P. Lovecká

- Biotechnological Production of Butanol** 86  
B. Branská

- Research and Development of New Processes for the Isolation of Volatile Aromatic Substances from Natural Materials** 95  
J. Čuchorová and J. Blaško

**ORIGINAL AND METHODOLOGICAL PAPERS**

- Use of Modern Computational Methods and Neural Networks to Optimize Methods for LC/MS/MS Analysis of Military-Relevant Organophosphorus Compounds** 103  
D. Trefilík

- The Possibility of Spectroscopic Analysis of Model Samples of Modern Pigments** 111  
E. Svobodová and I. Kopecká

**CHEMICAL INDUSTRY**

- Production of Energy and Hydrogen within Chemical Plants Using Small Nuclear Reactors** 118  
M. Šilhan, P. Polívka, and P. Dvořáková-Ruskayová




**ZALOŽTE SI  
VÝZKUMNOU  
SKUPINU**

START-UP GRANT | 2 MIL. KČ ROČNĚ | PO DOBU 3 LET

VRÁTILI JSTE SE ZE ZAHRANIČNÍ STÁŽE,  
MÁTE MAXIMÁLNĚ 7 LET OD UKONČENÍ PH.D. STUDIA  
A PROJEKT V OBORU ORGANICKÉ, BIOORGANICKÉ  
NEBO MEDICINÁLNÍ CHEMIE?

**PŘIHLASTE SE DO  
15. BŘEZNA  
2024**

[www.experientia.cz](http://www.experientia.cz)





**VYCESTUJTE NA  
ZAHRANIČNÍ  
STÁŽ**

12 MĚSÍCŮ | PRESTIŽNÍ UNIVERZITA | VLASTNÍ VÝBĚR

MÁTE PH.D., PROJEKT V OBORU ORGANICKÉ,  
BIOORGANICKÉ NEBO MEDICINÁLNÍ CHEMIE  
A JE VÁM MĚNĚ NEŽ 35 LET?

**PŘIHLASTE SE DO  
15. BŘEZNA  
2024**

[www.experientia.cz](http://www.experientia.cz)


**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 118 (2024), čís./no. 2 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 148, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 134 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností v 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. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffer, 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 plné předplatné 2024 (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 zaslány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce (Světlem aktivovaný komplex ruthenia vázaný na DNA kvadruplex, McQuaid K. T. a spol.; <https://www.rcsb.org/structure/5l8s>): M. Štětina • Dáno do tisku 24.1.2024.**

# Chemistry Europe Fact Sheet

**16** chemical societies, **15** European countries,  
over **75,000** chemists.

Family of high-quality scholarly chemistry journals,  
covering a very broad range of disciplines.

Journals:  
[www.chemistry-europe.org](http://www.chemistry-europe.org)

Societies:  
[www.chemistryviews.org/  
chemistry-europe-member-societies/](http://www.chemistryviews.org/chemistry-europe-member-societies/)

Evaluate, publish, disseminate, and amplify the  
scientific excellence of chemistry researchers  
from around the globe in high-quality publications.

Supports its members at every stage of their careers  
as they strive to solve the challenges that impact  
humankind.

Values integrity, openness, diversity, cooperation,  
and freedom of thought.

Hub: [www.chemistry-europe.org](http://www.chemistry-europe.org)

Association

Mission

3 per year, free

Newsletter



**Chemistry  
Europe**

Science  
news  
magazine

*ChemistryViews*

What is happening in  
the global chemistry  
community

Strong focus on the people  
behind the science.

[www.chemistryviews.org/register/](http://www.chemistryviews.org/register/)

[www.chemistryviews.org](http://www.chemistryviews.org)

Fellows  
Program

Award

Recognizes members for their outstanding  
achievements and contributions and their  
service to at least one member society.

[www.chemistryviews.org/fellows/](http://www.chemistryviews.org/fellows/)

Recognizes outstanding contributions to chemistry.

Includes prize money of EUR 10,000  
and a certificate

Open to individuals worldwide, regardless of  
their affiliation with *Chemistry Europe* societies.  
[www.chemistryviews.org/chemistryeuropeaward/](http://www.chemistryviews.org/chemistryeuropeaward/)



@ChemEurope

Hub:

[www.chemistry-europe.org](http://www.chemistry-europe.org)



[linkedin.com/company/  
chemeurope/](https://www.linkedin.com/company/chemeurope/)



MERCK

# set your sights on cytokines

More cytokines means even more discoveries in biology and beyond

Multiplexing with MILLIPLEX® Human Cytokine Panels A and B offers you:

- The ability to analyze nearly 100 cytokines in 50 µL of sample, such as serum, plasma or tissue lysate.
- The flexibility to choose any combination of analytes from each panel of 48 cytokines to design a custom kit that better meets your scientific needs and budget.
- Superior performance with rigorous assay development and quality control testing.
- A convenient “all-in-one” box format that gives you the assurance that you will have all the necessary reagents you need to run your assay on any xMAP® Luminex® platform.



[SigmaAldrich.com/milliplex-cytokines](https://SigmaAldrich.com/milliplex-cytokines)

For Research Use Only.  
Not For Use In Diagnostic Procedures.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt,  
Germany and/or its affiliates.  
All Rights Reserved.

The Life Science business  
of Merck operates as  
MilliporeSigma in the  
U.S. and Canada.

**Millipore®**

Preparation, Separation,  
Filtration & Monitoring Products