

Ultramalé a ultravelké technologie

*Homo sapiens se od ostatních živočichů odlišil mimo jiné výrobou nástrojů. Postupně zdokonaloval technologie jejich přípravy. Jako velmi zvidavý tvor vyvíjel během evoluce stále nové a vyspělejší technologie výroby. Začal v rozměrech sobě úměrných (**technologie**), před tisíciletími už však dokázal postavit egyptské pyramidy (**hektotechnologie?**), ve středověku ovládal i miniaturní technologie hodinových strojků nebo výroby uměleckých předmětů (**militechnologie?**). V 18. století pak zahájil cílený vývoj technologií všeho druhu, které v posledních letech dosáhly úžasných možností.*

*V šedesátých letech dvacátého století vědci dokázali spojením velkého počtu mikroskopických tranzistorů do jednoho čipu vytvořit mikroelektronické obvody, **mikrotechnologie**. Jejich objevy umožnily zahájit informační revoluci. Později se podařilo vytvořit v těchto rozměrech i mechanické přístroje a získat tak obdobné výhody, jaké přinesly integrované obvody. Jestliže elektronika se stala „mozkem“ současných technologií, mikromechanické přístroje se mohou stát senzory, jako jsou oči, uši, nebo manipulatory nahrazující ruce a nohy, zvyšující kvalitu života mnoha lidem. Mikromechanika se stala klíčovou součástí běžně používaných věcí, jako jsou mikroelektrické motory, měřiče krevního tlaku, tiskárny počítačů, projekční systémy, či součásti automobilů, třeba airbagy. Technika fotolitografie umožnila vyrobit v mechanice elektrické motory, ložiska, kloubové mechanismy, pumpy, turbíny a v elektronice vodiče, tranzistory, odpory, diody, kondenzátory.*

*Ovšem v současnosti se pracuje již na vývoji **nanotechnologií**, jež by umožnily sestavit přístroje menší než 100 nm, které by měly významný přínos v počítačových technologiích, vývoji polovodičových materiálů, v biotechnologiích, při konstrukci robotů, rotačních molekulových motorů i jinde. Ukazuje se, že nanotechnologie požadují existenci **pikotechnologií**. Pojem pikotechnologie již má dva významy. Používá se jednak v nanotechnologiích v případech, kdy je třeba pracovat s větší přesností než v řádu nm a rovněž pro manipulace s hmotou o tomto rozměru v budoucnu. Zatím nedostižným a následovaným hodným vzorem je Příroda, která používá již po miliardách let **bionano(piko)technologie**. Oxidační fosforylace je systém těchto rozměrů a membránový protein ATPasa přepouštějící kanálem uvnitř své molekuly pouze protony (H^+) přes vnitřní mitochondriální biomembránu je unikátní zdroj ušlechtilé chemické energie a tepla. Velké naděje se*

vkládají do principiálně obdobného děje, fotosyntézy, která by mohla být zdrojem plynného vodíku. Pokud by se povedla 10% konverze Sluncem vyzařovaných fotonů dopadajících na zemský povrch, pak by stačila spotřebu elektrické energie Prahy zajistit „bioelektrárna“ připomínající vodní plochu pokrytou zelenými řasami a zabírající desítku plochy této metropole.

*Pojem **femtotechnologie** (10^{-15} m) je již používán futurology analogicky s pojmy nanotechnologie či pikotechnologie. V těchto rozměrech se ovšem pohybujeme v atomovém jádře s cílem získat metastabilní stav s neobvyklými vlastnostmi. Zdá se to být zatím spíše science fiction, protože praktické využití femtotechnologií se momentálně zdá nepravděpodobné. Zatím existuje pouze spekulace o možném využití indukované emise gama záření hafnia ($^{178m2}\text{Hf}$) jako pohonné jednotky letadel nebo dokonce využití možnosti téměř okamžitého uvolnění gama záření jako neštěpné radiologické bomby. Popustíme-li uzdu naší fantazie ještě dále, můžeme se ptát, budou také **attotechnologie** (10^{-18} m) nebo **zeptotechnologie** (10^{-21} m)? Dnes již existuje technologie umožňující zvažít buňku či dokonce virus (10 ag) s přesností desetin ag, tedy stovek zg. Ale to se již vydáváme na cestu, která končí u rozměrů řádu 10^{-35} m, tedy k Planckově délce a k teorii superstrun.*

Někteří futurologové spekulují naopak v obráceném měřítku o teratechnologiích (10^{12} m), které by mohly uskutečňovat operace v kosmu, třeba bránit střetu planetek se Zemí. Můžeme očekávat i petatechnologie (10^{15} m), nebo dokonce exatechnologie (10^{18} m)?

*Není proto překvapením, že obrovský rozvoj různých technologií přináší řadu otázek filozofického rozměru. Dokáže se Homo sapiens sapiens vypořádat s technologickým pokrokem mnohdy přesahujícím jeho chápání? Humanitně vzdělání antitechnologové soudí, že žijeme v technologickém prostředí, tedy v technosféře a zavádí pro ni pojem **megatechnologie**. Od rána do večera jsme obklopeni dopravními prostředky, nejrůznějšími spotřebiči, přístroji, počítači. Myšlenka, že tyto technologie jsou neutrální, je podle nich chybná. Ať chceme nebo nechceme, ovlivňují nás ve všech směrech, protože se jim musíme do určité míry přizpůsobovat. Můžeme pak parafrázovat klasika moderního českého humoru: „...moderní technologie jsou krásné, ale jeden si musí dávat pozor, aby z toho nezblblnul“.*

Pavel Rauch.

Redakce časopisu

Chemické listy

uděluje

**CENU
Karla PREISE
za rok 2006**



Břetislavu FRIEDRICHOVÍ

Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft

za práci

Proč jsou studené molekuly tak žhavé?

Chem. Listy 100, 256 (2006)

SRDEČNĚ BLAHOPŘEJEME

KRYSTALIZACE FARMACEUTICKÝCH SUBSTANCÍ

BOHUMIL KRATOCHVÍL

*Ústav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
bohupil.kratochvil@vscht.cz*

Došlo 15.10.06, přijato 30.11.06.

Klíčová slova: krystalizace, nukleace, termodynamika krystalizace, růst krystalu a jeho kinetika, polymorfismus, křivka rozpustnosti, šifka metastabilní zóny, očkovaná krystalizace, krystalizace ve farmaceutickém průmyslu

Obsah

1. Úvod
2. Nukleace
3. Termodynamika krystalizace
4. Mechanismus růstu krystalu a jeho kinetika
5. Krystalizace polymorfů
6. Krystalizace ve farmaceutické výrobě
7. Závěr

1. Úvod

Krystalizace je jedním ze základních procesů v přírodě a člověk se s ní poprvé setkal asi při odpařování moří nebo při mrznutí vody. Později ji začali lidé využívat ve výrobě. Ačkoliv je krystalizace známa tak dlouho, stále se jí v některých případech nedaří cíleně řídit. Těmito případy jsou ve farmaceutickém průmyslu krystalizace nestabilních polymorfů^a a jejich možné a nekontrolovatelné polymorfní přechody na stabilní fázi v určitých technologických stupních (vlhká granulace, mikronizace) nebo výjimečně i při skladování léčiv.

Krystalizace, především jako separační a čistící proces, je finálním stupněm výroby krystalické API (Active Pharmaceutical Ingredient). Krystaly vznikají nejčastěji z fáze kapalné postupy, které jsou založeny na vytvoření přesyceného roztoku API. Při krystalizaci dochází k samsopřádajícímu supramolekulárnímu procesu, při kterém se původně nahodile orientované molekuly skládají do vnitřně uspořádaných krystalů (supramolekul). Abychom mohli krystalizaci řídit, je nutné tento proces ovlivnit již v prvotním, tzv. prenukleacním stadiu. To znamená,

že musíme ovlivnit jak termodynamiku – jaké krystalické fáze vzniknou za určitých podmínek, tak kinetiku – jak rychle se tvoří krystalové zárodky (nuklea) a jak rychle z nich rostou krystaly.

Sledovanými parametry produktu jsou ve farmaceutické výrobě: výtěžek, chemická a fyzikální (polymorfni) čistota krystalů, distribuce jejich velikostí, krystalový tvar a obsah zbytkových rozpouštědel. Výroba je v neposlední řadě ovlivněna také ekonomickými a ekologickými aspekty.

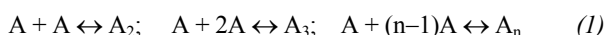
Obecná teorie krystalizace a chemicko-inženýrský přístup při realizaci jsou v literatuře podrobně popsány v domácích i zahraničních monografiích². Krystalizační postupy lze často optimalizovat na základě teoretických modelů, např. při velkotonážní výrobě cukru nebo močoviny. Zde je situace jednodušší v tom smyslu, že např. u sacharosy nebylo dosud pozorováno polymorfni chování. Ve farmaceutické výrobě se při optimalizaci krystalizačních podmínek kombinují empirické a teoretické přístupy, právě s ohledem na časté polymorfni chování API a citlivost přechodu z laboratorního na poloprovozní a provozní měřítko.

Předložený referát lze rozdělit do dvou částí. Smyslem první části je shrnutí nejdůležitějších představ současné teorie krystalizace, především pro „nekolgy“ z oboru. Ve druhé části práce pojednává o specifických problémech, které při krystalizaci aktivních substancí musí řešit farmaceutický průmysl.

2. Nukleace

Krystalizační proces se skládá ze dvou hlavních kroků: nukleace a růstu krystalů. První etapa vyžaduje, aby se dostatečně rychle v přesyceném roztoku vytvářely krystalizační zárodky, tzv. nuklea. Jestliže k nukleaci nedojde, resp. koncentrace nukleí nepřekročí kritickou mez, vzniká při solidifikaci roztoku amorfni fáze.

Sekvencí molekulárních adicí vznikají v přesyceném roztoku molekulární agregáty (klastry):



Roztok pak obsahuje agregáty různých velikostí, $A_2 \dots A_n$, které mají tendenci se spontánně rozpadat, ovšem v důsledku vzájemných kolizí i rostou. Agregáty, které dosáhnou tzv. kritické velikosti, se nazývají nuklea a jsou schopné dalšího růstu (již se samovolně nerozpadají). Nukleus obsahuje (podle typu API) několik molekul až několik stovek molekul.

^a Polymorfismus, v rozšířeném významu ve farmacii znamená, že molekula může v závislosti na krystalizačních podmínkách vykristalovat v několika různých krystalových formách (polymorfech), často i s molekulami použitého rozpouštědla (solvátech, resp. solvatomorfech)¹.

Nukleace může být buď primární (spontánní) nebo sekundární (ovlivněná přítomností pevné fáze). Primární nukleaci dělíme na homogenní a heterogenní.

Homogenní nukleace je idealizující stochastický proces a slouží k nastavení základního modelu. Při homogenní nukleaci se nukleus tvoří náhodnými srážkami molekul kdekoli v objemu krystalizujícího roztoku bez přítomnosti jiné fáze. Pro jednoduchost se zabýváme krystalizací v jednosložkovém systému. Pokud uvažujeme kulovitý agregát molekul, je vytvoření krystalické fáze spojeno se změnou Gibbsovy energie ΔG , vztažené na jeden agregát:

$$\Delta G = (4\pi/3)r^3\Delta G_v + 4\pi r^2\gamma_{CL} \quad (2)$$

kde ΔG_v (hnací síla nukleace) je záporná a značí rozdíl mezi Gibbsovými energiemi jednotkových objemů krystalické a kapalné fáze při $T < T_i$ (T_i je teplota tuhnutí). Veličina γ_{CL} značí mezifázové napětí mezi fází kapalnou (L) a krystalickou (C) a r je poloměr kulovitého agregátu. První člen ve vztahu (2) způsobuje pokles a druhý člen růst ΔG . Při spontánním ději musí být ΔG záporné, a proto po překonání hranice kritického poloměru nukleus r^* a nukleační bariéry $\Delta G_{\text{hetero}}^*$, z nukleusů spontánně rostou krystaly, protože pro ně platí $d\Delta G/dr < 0$. S rostoucím přesycením se snižuje jak r^* , tak $\Delta G_{\text{hetero}}^*$. Naopak agregáty s $r < r^*$ mají tendenci se rozpadat, protože $d\Delta G/dr > 0$. Toto chování je založeno na jednoduchém faktu, že povrch kulovité částice se zvětšuje s r^2 , zatímco její objem s r^3 , takže vnitřní přitažlivé vazby v agregátu nakonec převáží nad mezifázovým napětím. V roztoku existují v mikroměřítku fluktuace koncentrací a pravděpodobnost, že některá fluktuace překročí nukleační bariéru extrémně rychle, roste s rostoucím přesycením.

V okamžiku vzniku nukleus platí:

$$(d\Delta G/dr)_{r=r^*} = 0 \quad (3)$$

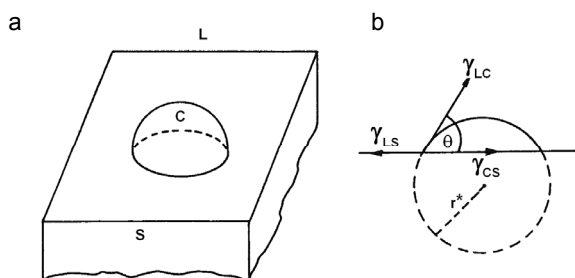
Provedením derivace (3) v rovnici (2) získáme pro velikost kritického poloměru r^* vztah:

$$r^* = -2\gamma_{CL}/\Delta G_v \quad (4)$$

a dále dosazením (4) do (2) dostaneme výraz pro bariéru homogenní nukleace $\Delta G_{\text{hetero}}^*$:

$$\Delta G_{\text{hetero}}^* = (16\pi\gamma_{CL}^3)/(3\Delta G_v^2) \quad (5)$$

Bližší realitě je model nukleace heterogenní, která přednostně probíhá na přítomné fázi, např. na stěně krystalizátoru, na krystalizačním přídavku, na krystalovém prachu vznikajícím otěrem a srážkami krystalů s míchadlem atd. Tato fáze disponuje volným povrchem (S), na kterém se snáze zachytí molekulární agregát. Aby tento agregát dorostl do nukleus (C), stačí mu vytvořit pouze jeho vrchlík (obr. 1a), což je energeticky méně náročné. Heterogenní nukleace je proto energeticky výhodnější, protože vzniká-li nukleus na povrchu pevného substrátu, postačí k jeho vytvoření mnohem menší počet atomů (molekul), než by vyžadoval nukleus o stejné kritické velikosti r^* při homogenní nukleaci. Práce potřebná k vytvoření nukleus (tj. nového povrchu) je zmenšena o smočený volný povrch (S), přičemž adhezni úhel θ je definován rovnováhou (obr. 1b):



Obr. 1. **Heterogenní nukleace.** a) vrchlík (kulová úseč) nukleus, b) adhezni úhel θ

$$\gamma_{LS} = \gamma_{CS} + \gamma_{LC} \cos \theta \quad (6)$$

kde γ_{ij} jsou mezifázová napětí (LS – kapalina-pevný povrch, CS – nukleus-pevný povrch, LC – kapalina-nukleus).

Nukleační bariéra heterogenní nukleace je nižší než homogenní nukleace. Příslušný vztah modifikuje rovnici (5) funkcí adhezniho úhlu, $f(\theta) < 1$:

$$\Delta G_{\text{het}}^* = \Delta G_{\text{hetero}}^* \cdot f(\theta) \quad (7)$$

Pro $\theta=180^\circ$ je $f(\theta) = 1$ a nukleace se uskuteční pouze homogenním mechanismem.

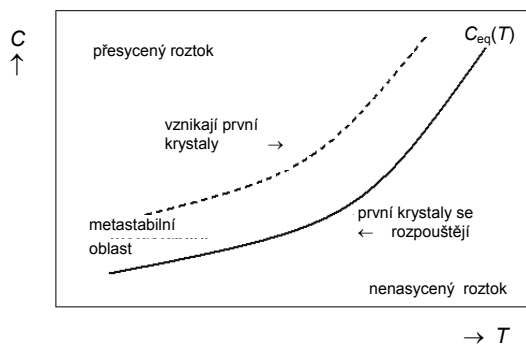
Pokud je roztok ponechán primární (spontánní) nukleaci, znamená to nebezpečí, že vykristaluje nežádoucí produkt (polymorf). Ve farmaceutické výrobě se proto při řízené krystalizaci velmi často používá nukleace sekundární – očkovaná, právě z důvodu, že nikdy nelze zcela vyloučit polymorfni chování systému. Při očkování přidáváme k výchozímu roztoku krystalky (zárodky, očka) požadované fáze. Sekundární nukleace může být vyvolána i jinými, nechtěnými vlivy, např. pohybem míchadla krystalizátoru.

3. Termodynamika krystalizace

Jak bylo již několikrát zdůrazněno, krystaly mohou nukleovat a růst pouze tehdy, jestliže je roztok přesycený. Přesycení roztoku je vyjádřeno jako:

$$\Delta c = c_{\text{př}} - c_{\text{eq}} \quad (8)$$

kde $c_{\text{př}}$ je koncentrace přesyceného roztoku a c_{eq} koncentrace nasyceného roztoku. V grafu na obr. 2 je plnou čarou znázorněna obecná rovnovážná křivka rozpustnosti ($c_{\text{eq}}(T)$ – závislost koncentrace krystalizující API na teplotě pro nasycený roztok). Pod křivkou rozpustnosti leží oblast nenasyčeného roztoku. Pokud snižujeme teplotu, dostáváme se postupně z nenasyčeného roztoku přes roztok nasycený k tečkované křivce, která je zhruba rovnoběžná s křivkou rozpustnosti. Tečkovaná křivka, která odpovídá maximálnímu přesycení (začnou se vylučovat první krystaly), určuje spolu s křivkou rozpustnosti tzv. šířku meta-



Obr. 2. **Obecná rovnovážná křivka rozpustnosti** (plná čára), c – koncentrace, T – teplota. Tečkovaná čára odpovídá maximálnímu přesyčení a vymezuje šířku metastabilní oblasti

stabilní oblasti (zóny). Nad tečkovanou křivkou je oblast přesyčeného roztoku, kde přednostně probíhá nukleace. Šířka metastabilní oblasti závisí na typu nukleace (homogenní, heterogenní, očkovaná), ale především na přítomných nečistotách. Krystalizace API se musí provést právě v metastabilní oblasti. V oblasti nenasyceného roztoku již pevná fáze neexistuje.

Z termodynamického hlediska dochází ke krystalizaci tehdy, když je chemický potenciál krystalizované složky v rovnovážném stavu (μ_{eq}) nižší, než chemický potenciál této složky v přesyčeném stavu ($\mu_{\text{př}}$). Hnací silou krystalizace je příslušný rozdíl:

$$\Delta\mu = \mu_{\text{př}} - \mu_{\text{eq}} \quad (9)$$

Poznamenejme, že hnací síla krystalizace je v podstatě totožná s hnací silou nukleace ΔG (viz rovnici (2)).

Vzhledem k obecnému vztahu pro chemický potenciál látky rozpuštěné v roztoku:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln a \quad (10)$$

kde μ_0 je standardní chemický potenciál rozpuštěné látky, a její aktivita a T teplota, dostaneme spojením rovnic (9) a (10):

$$\Delta\mu / RT = \ln(a_{\text{př}} / a_{\text{eq}}) \quad (11)$$

kde $\Delta\mu/RT$ je přesyčení, které reprezentuje hnací sílu krystalizace a $a_{\text{př}}/a_{\text{eq}}$ je termodynamický poměr aktivit rozpuštěné látky v přesyčeném a nasyčeném roztoku. Aktivita složky i v roztoku je rovna součinu:

$$a_i = (\gamma_i x_i) \quad (12)$$

kde x_i je molární zlomek a γ_i aktivitní koeficient.

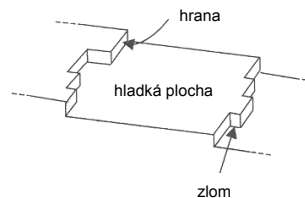
Vyčíslení či odhad aktivitních koeficientů a z toho vyplývající výpočet přesyčení bývá často velmi komplikovaný. Pro ideální roztok nebo v případě, kdy aktivitní koeficient nezávisí na koncentraci, lze vztah (11) vyjádřit jako:

$$\Delta\mu / RT = \ln(x_{\text{př}} / x_{\text{eq}}) \approx (x_{\text{př}} - x_{\text{eq}}) / x_{\text{eq}} \quad (13)$$

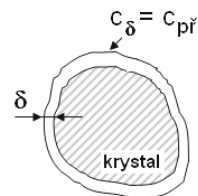
4. Mechanismus růstu krystalu a jeho kinetika

Růst krystalu znamená přirůstání dalšího materiálu k nukleu. Mechanismus růstu krystalů je komplikovaný proces, jehož detaily nejsou doposud zcela objasněny. Důvodem je, že přesyčený roztok obsahuje celou škálu stavebních jednotek (atomy, ionty, molekuly, dimery, trimery, polymery, agregáty a jejich solvované formy atd.), jejichž struktura je někdy nejasná. Při růstu krystalu převládá rychlost toku stavebních jednotek směrem k povrchu krystalu nad jeho odtokem. Výsledkem růstu krystalu je krystalová plocha, která je popsána Millerovými indexy (hkl). Typická hodnota lineární rychlosti růstu plochy je $0,5 \text{ mm h}^{-1}$ a je úměrná sumě ($h^2 + k^2 + l^2$). Soubor všech krystalových ploch určuje morfologii krystalu neboli jeho habitus. Podle podmínek krystalizace nemusí všechny krystalové plochy habitu vždy stejnoměrně vyrůst, konstantní však zůstávají vždy úhly mezi plochami (tzv. Steunův zákon). V konečném výsledku je krystalový habitus tvořen převážně plochami, které rostou nejmaleji a mají tudíž nejmenší energii. Plochy s největší energií mají největší hustotu obsazení stavebními částicemi. Nejrychleji rostoucí plochy (s největší energií) naopak většinou zarůstají.

Krystalová plocha však nenarůstá přísunem stavebních jednotek „pravidelně jako vojsko v řadě“, ale růstovými mechanismy. Z energetického hlediska se stavební jednotky nejnáze připojují ke zlomům krystalové plochy, méně ochotně k hranám a nejhůře k hladké ploše (obr. 3). Pokud není k dispozici dostatečné množství hran a zlomů, potom na hladké ploše dochází k povrchové nukleaci nebo k využití přítomných čárových defektů reálné krystalové struktury – šroubových dislokací.



Obr. 3. **Růst krystalové plochy**



Obr. 4. **Ke kinetice růstu krystalu**, δ – tloušťka tenkého laminárního filmu, c_δ – koncentrace složky na hranici filmu, kterou pokládáme rovnou koncentraci přesyčeného roztoku

Aby krystal v přesyceném roztoku rostl, musí být rozpuštěná složka transportována objemem matečného roztoku k povrchu nuklea. Tam je následně ukotvena do krystalové struktury. Podle klasické představy transport probíhá přes tenkou vrstvu roztoku (film), (obr. 4). Vrstva filmu je v dynamické rovnováze jak s povrchem krystalu na jedné straně, tak s kapalnou fází matečného roztoku na straně druhé. Tloušťka filmu δ (okolo 20–50 μm) závisí na teplotě a hydrodynamice krystalizačního systému (míchání roztoku). Vlastní krystalizace se potom dá popsat následujícími kroky:

- přenos složky z kapalně (roztokové) fáze do vrstvy filmu obklopující krystalickou fází,
- difuze složky přes vrstvu filmu,
- orientace a zabudování stavební částice do krystalové struktury,
- odvedení krystalizačního tepla do matečného roztoku.

Celkovou kinetiku krystalizace určuje nejpomalejší, tzv. řídicí děj. V nemíchaném roztoku to bude zřejmě difuze, v míchaném krystalizátoru to pravděpodobně bude zorientování a zabudování částice do krystalu. Zabudování do krystalu je zpomaleno, pokud je molekula konformačně flexibilní³.

V ustáleném stavu systému se množství složky zabudované do krystalu rovná množství, které bylo transportováno difuzí. Pokud předpokládáme, že tento děj lze popsat analogicky rychlostní rovnicí reakce prvního řádu, bude mít příslušná kinetická rovnice tvar:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{1}{\left(\frac{\delta}{D} + \frac{1}{k_S}\right)} \cdot A \cdot (c_\delta - c_{eq}) \quad (14)$$

kde člen dm/dt znamená množství složky difundující jednosměrně plochou A za jednotku času při daném koncentračním gradientu, D [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] je difuzní koeficient krystalizující složky v přesyceném roztoku, k_S je koeficient sdílení hmoty potřebný pro popis zakotvení stavební částice do krystalové struktury, c_δ je koncentrace složky na hranici filmu a c_{eq} je koncentrace rovnovážného roztoku.

Pokud zahrneme difuzní koeficient D , tloušťku laminárního filmu δ a koeficient k_S do celkové rychlostní konstanty krystalizace \bar{k} , potom přejde rovnice (14) na:

$$\frac{dm}{dt} = \bar{k} \cdot A \cdot \Delta c \quad (15)$$

kde Δc je přesycení roztoku (viz rov. 8).

Obecně lze odvodit, že celková rychlostní konstanta krystalizace \bar{k} je funkcí všech parametrů, které ovlivňují termodynamiku i kinetiku krystalizace.

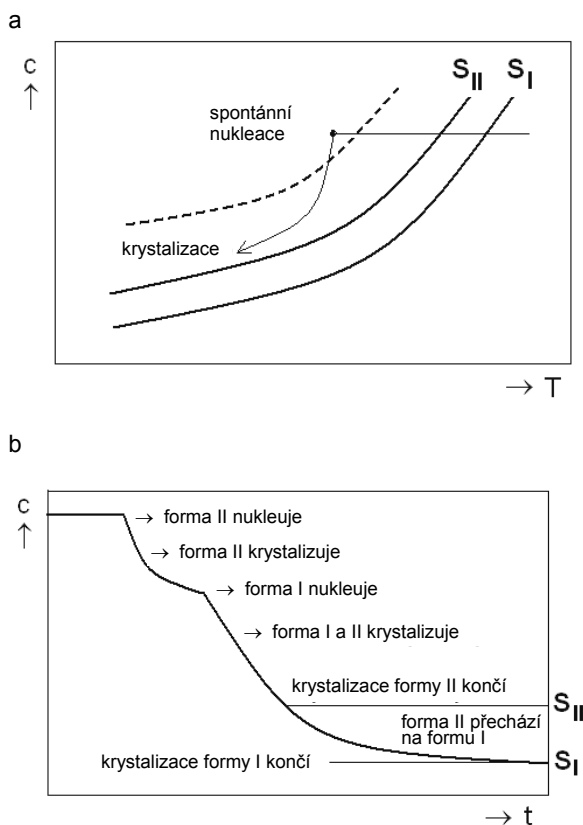
Vezmeme-li v úvahu vlastní mechanismus růstu krystalu, rychlost zabudování částice do krystalu závisí na druhé mocnině lokálního přesycení. Celkový řád krystalizace, kdy řídicími ději jsou jak difuze (první řád), tak zabudování (druhý řád), je tedy roven g ($1 \leq g \leq 2$).

V inženýrských modelech je rychlost nukleace úměrná Δc^n , kde n je vyšší než 2 (přibližně 3 až 6). To znamená, že rychlost nukleace výrazněji závisí na přesycení než je tomu u růstu krystalů.

5. Krystalizace polymorfů

V polymorfním systému je za definovaných podmínek vždy jeden polymorf (solvát) stabilní a ostatní metastabilní, tzn. z termodynamického hlediska nestabilní. I metastabilní polymorfy však mohou být stálé a hodit se pro lékovou formulaci. Stabilní polymorf je charakterizován:

- nejnížší Gibbsovou energií,
- nejnížší rozpustností v libovolném rozpouštědle,
- nejnížší rozpouštěcí rychlostí,
- nejnížší biodostupností,
- nejnížší reaktivitou,
- nejnížším parciálním tlakem,
- nejvyšším bodem tání.



Obr. 5 a) Spontánní nukleace a krystalizace dvou polymorfů. Stabilnější forma I je méně rozpustná (S_I). Dříve nukleuje a krystalizuje nestabilní forma II. b) Časový průběh (t) spontánní nukleace a krystalizace dvou polymorfů. Výsledkem je směs dvou forem I a II, která v ideálním případě (dlouhodobě stání suspenze) přechází na stabilní formu I

Termodynamická stabilita a nestabilita polymorfů vyplývá z diagramů energie-teplota ($E - T$). Pro krystalické pevné látky platí:

$$H = U + PV \approx U \quad \text{a} \quad G = H - TS \approx U - TS \quad (16)$$

takže z diagramů $E - T$ se používají především grafy $H - T$ a $G - T$.

Při krystalizaci v polymorfním systému obvykle krystalizují nejdříve nestabilní polymorfy, které se posléze transformují na stabilní formu.

Pro ilustraci uvažujme dimorfní systém, který obsahuje stabilní (I) a nestabilní (II) formu (obr. 5). Při ochlazení systému je nejdříve protnuta rozpouštěcí křivka formy I, která roztok přesycuje, forma II je zatím nenasytjena. Posléze je přetnuta i rozpouštěcí křivka formy II a obě formy jsou v roztoku přesycené. Pro spontánní nukleaci je zapotřebí ještě dalšího přesycení za hranici metastabilní zóny. Jako první začne vždy nukleovat a krystalizovat nestabilní, rozpustnější forma II a potom forma I. Forma II ve vzniklé dimorfní směsi nakonec v ideálním případě konvertuje na stabilní formu I. Popsaný proces je výsledkem platnosti empirických pravidel Gay-Lussaca⁴ a Ostwalda⁵.

V polymorfních systémech rozlišujeme dva typy přechodů: enantiotropní a monotropní. Při enantiotropii je možná polymorfní přeměna v pevném stavu, v monotropii je polymorfní přeměna možná pouze v roztoku. Jak uvedla ve své prezentaci Štěpánková⁶, mohou nastat 4 eventuality z hlediska udržení žádaného polymorfu v systému:

- 1) termodynamicky stabilní forma v monotropním systému – žádná transformace v jinou formu nenastane,
- 2) stabilní forma v enantiotropním systému – nutno dodržet podmínky existence (teplota, tlak, relativní vlhkost),
- 3) metastabilní forma v monotropním systému – fázová transformace řízena kinetikou, pro uchování nutno dodržet náročné podmínky (nízká teplota, bezvodé prostředí),
- 4) metastabilní forma v enantiotropním systému – nutno změřit fázové diagramy $H - T$ a $G - T$ pro stanovení termodynamických vztahů v systému.

Originální farmaceutická firma k výrobě zpravidla vybere termodynamicky stabilní polymorf (hydrát, jiné solváty se používají pouze jako možné prekurzory), u kterého je zaručena reprodukovatelnost výrobních šarží a stabilita jak při formulaci, tak do expirace lékové formy. Generické firmy, např. z důvodu obejití patentové ochrany nebo terapeutických výhod, volí nestabilní polymorf (hydrát). Pro cílenou výrobu nestabilního polymorfu (hydrátu) se používá očkovaná krystalizace. Problém nastává, když není k dispozici krystalizační očko, protože univerzální technika, jak usměrnit polymorfní chování určité API žadaným směrem, tj. robustně a reprodukovatelně vyrábět určitý polymorf, neexistuje. To souvisí se současnou absencí fundamentální teorie polymorfismu. O tom, jaký polymorf vykristalizuje, se rozhoduje v prenukleačním stadiu, tedy u molekulárních agregátů, na základě kompetice kinetických a termodynamických fakto-

Tabulka I

Faktory ovlivňující, který polymorf (solvát) vykristalizuje z roztoku, a metody transformace na jiný polymorf

Faktory	Metody
teplota a tlak při krystalizaci	sublimace
rychlost ochlazení nebo odpařování roztoku	ochlazení taveniny
stupeň přesycení roztoku	desolvatace (dehydratace)
zvolené rozpouštědlo (srážedlo)	rekrytalizace z jiného rozpouštědla, resp. směsi rozpouštědel
obsah vody (jiného kosolventu) ve finálním rozpouštědle	změna pH
přítomnost nečistot, aditiv v roztoku	rekrytalizace v suspenzi
rychlost dosažení přesyceného roztoku	zahřívání (při enantiotropii)
doba stání produktu v matečném roztoku	lyofilizace
intenzita míchání roztoku	
koncentrační a teplotní gradienty v roztoku	
zvukové, ultrazvukové, mikrovlnné, laserové, akustické nebo jiné rázy	

rů. Vzhledem k tomu, že energetické rozdíly mezi polymorfy jsou někdy velmi malé, snadno se může stát, že vykristalizuje jiný polymorf, než si přejeme. Faktorů, které ovlivňují krystalizaci (nukleaci), zrovna tak jako možných metod krystalizace polymorfů je celá řada (tab. I). Některé jsou velmi subtilní, a je obtížné mít všechny parametry krystalizace dokonale a reprodukovatelně pod kontrolou ve výrobním měřítku. I u technologie, která byla doposud bezproblémová a vedla vždy k požadovanému polymorfu, může dojít k jevu, který Dunitz a Bernstein nazvali „disappearing polymorph“ (ztracený polymorf)⁷. Dlouho vyráběný polymorf se najednou nedaří reprodukovat. Příčinou je zřejmě skutečnost, že (náhodou?) vzniknou mikroskopická prenuklea jiného polymorfu, která kontaminují krystalizační zařízení, příp. jsou přítomná ve vzduchu a tak může tvrdošijně krystalizovat vždy nechtěný polymorf a pokusy vykristalizovat jiný na stejném místě jsou dlouhodobě neúspěšné.

Známým příkladem je nezvládnutelné dimorfní chování ritonaviru (inhibitor HIV-proteasy, léková forma Norvir[®], Abbott Laboratoires). V roce 1996 bylo toto léčivo uvedeno na trh, přičemž ritonavir byl znám pouze v jedné formě. Po dvou letech prodeje, v roce 1998, najednou přestaly u vyráběných šarží souhlasit disoluční testy a z polotuhého léčiva začala vypadat substance. Výzku-

mem se zjistilo, že se jedná o nový stabilní polymorf, později označený jako forma II, přičemž původně vyráběná forma byla označena jako I. Bylo zjištěno, že rozpustnost formy II je významně nižší než formy I. Forma II záhy kontaminovala výrobu a veškeré vyrobené šarže formy I přecházely samovolně na formu II. Je zajímavé, že před rokem 1998 nebyla forma II v šaržích vůbec detegována. K vyřešení dimorfie ritonaviru byla nasazena značná výzkumná kapacita, ovšem problém se nepodařilo uspokojivě zvládnout, takže firma Abbot byla nucena v roce 1999 přeformulovat Norvir® na roztok⁸.

V poslední době je snahou kontrolovat a řídit pre-nukleační a nukleační mechanismy přímo v molekulárním měřítku („crystal engineering“)⁹. K tomuto účelu se využívají různé, nukleaci vyvolávající povrchy, např. polymery, Blodgett-Langmuirovy filmy, grafit, specificky orientované krystalové plochy substrátů atd. Tyto povrchy specificky interagují s pre-nukleačními klastry. Pokud má určitý polymorf podobnou geometrii mřížky jako substrát, nastává epitaxiální růst. U polymorfu, který vůči substrátu vykazuje značnou mřížkovou inkoherenci (nesouměřitelnost) se růst zablokuje. To znamená, že substrátový povrch zde má funkci polymorfně selektivní. Jako příklad lze uvést selektivní nukleaci 6 konformačních polymorfů 5-methyl-2-[(2-nitrofenyl)amino]-3-thiofenkarbonitrilu na různých plochách monokrystalu kyseliny pimelové¹⁰. Někdy lze použít i očkování podobnou strukturou („tailor-made impurities“), které snižují nukleační bariéru.

Polymorfni systémy jsou komplikované, což je způsobeno především množstvím možných hydrátů a solvátů, které může molekula v pevném stavu vytvářet. Rekordmanem je zřejmě sulfathiazol, který vytváří přes 100 různých solvátů¹¹. Počet „čistých“ polymorfů pouze výjimečně dosahuje pěti. Předmětem farmaceutického vývoje je především anhydrát (ansolvát), tzn. „čistý“ polymorf, který vznikne buď přímou krystalizací nebo sušením (dehydratací, desolvatací) hydratovaných (solvatovaných) fází. Pokud anhydrát z nějakého důvodu použít nelze, např. z patentového, lze pro přípravu lékové formy použít i hydrát. Solváty se pro formulaci obvykle nepoužívají, ale jsou důležitými prekurzory, které desolvatací poskytují metastabilní, ale kineticky stálé fáze, které nelze vykrytalovat z roztoku. Příkladem jsou krystalové formy námeloového alkaloidu cabergolinu¹².

V případě komplikovaných polymorfni systémů může zjednodušení, resp. obejítí problému polymorfismu, spočívat v přechodu na vhodnou sůl, pokud lze substanci převést na kyselou nebo zásaditou formu. Např. u námeloového alkaloidu terguridu (léčba parkinsonismu) je známo 7 krystalových forem, zatímco u protonizované formy, terguridu hydrogenmaleátu, polymorfie pozorována dosud nebyla. Léková forma Mysalfon® (Zentiva), kde aktivní substancí je tergurid, je formulována z hydrogenmaleátu monohydrátu¹³.

Jinou technikou je krystalizovat tzv. kokrystal. Kokrystal je obecná sloučenina typu hostitel-host, kdy původní hostitelská struktura substance je synteticky doplněna hostem, který není solventem. Host ze struktury kokrystalu

snadno nevytěká (nedesolvatuje) a tím se kokrystal liší od solvátů. To proto, že se mezi složkami často vytváří pevné H-můstky. Je popsána řada kokrystalů, většinou s jednoduchým poměrem mezi hostem a hostitelem (1:1, 1:2 nebo 2:1). Příkladem je kokrystal mezi acetaminofenem (paracetamolem) a piperazinem a mnoho dalších¹⁴. Kokrystal lze definovat i jinak, např. jako obecné multi-komponentní sloučeniny, kam patří i soli, hydráty a solváty. Pokud dále definujeme solvent, můžeme z této skupiny vydělit solváty (hydráty)¹⁵.

6. Krystalizace ve farmaceutické výrobě

Krystalizace finální API není ve farmaceutické výrobě kontinuální proces, ale probíhá v šaržích jako výroba chemických specialit. Většinou se jedná o několikastupňovou syntézu. Optimalizace krystalizačního procesu vyžaduje získání informací o všech parametrech systému, aby mohly být nastaveny krystalizační podmínky v provozním měřítku.

Především se jedná o „screening“ polymorfniho chování a charakteristiku jednotlivých polymorfů a hydrátů (solvátů). Komplexní „screening“ na polymorfismus zvolené API může zahrnovat až několik tisíc krystalizačních experimentů na krystalizačním automatu, provedených kombinatoriálně při použití 20 a více rozpouštědel (tab. II) a jejich směsí včetně variace dalších krystalizačních podmínek. Identifikace polymorfů se provádí v krystalizačním důlku *in situ* vhodnou analytickou metodou, např. RTG práškovou analýzou. Užitečnou pomůckou je nedávno vytvořená databáze polymorfů, která obsahuje jejich kompletní fyzikálně-chemická a analytická data¹⁷.

Dalším důležitým parametrem je rovnovážná rozpouštěcí křivka zvoleného polymorfu (hydrátu), která může být získána z fázového diagramu, resp. z jeho části.

Tabulka II
Přehled 20 nejpoužívanějších rozpouštědel (kromě vody). Používání rozpouštědel (solventů) je ve farmacii stanoveno směrnici ICH Topic Q3C (cit.¹⁶)

Rozpouštědlo	
<i>N,N</i> -dimethylformamid (DMF)	dichlormethan
dimethylsulfoxid (DMSO)	chloroform
dioxan	methanol
<i>p</i> -xylen	aceton
benzen	<i>i</i> -propanol
tetrahydrofuran (THF)	cyklohexan
acetonitril	ethylacetát
kyselina octová	ethanol
tetrachlormethan	diethylether
toluen	hexan

Významná je především závislost koncentrace na teplotě, ale v případě stanovení hranice existence anhydrátu a hydrátu v systému i závislost koncentrace na obsahu vody ve finálním rozpouštědle. Velmi důležité je stanovení šířky metastabilní oblasti (resp. křivky metastabilní oblasti), ve které se vede krystalizace. Šířka metastabilní oblasti je stanovena jako teplotní interval (podchlazení), kdy na horní hranici začnou vznikat první krystaly a pod dolní hranici se začnou první krystaly rozpouštět (viz obr. 2). Tuto šířku lze stanovit buď vizuálně, mikroskopicky nebo v zařízení, které převádí gradient koncentrace na gradient indexu lomu (Töplerova metoda)¹⁸.

Typické hodnoty šířky jsou okolo 10 K. Šířku metastabilní oblasti nejvíce ovlivňují přítomné nečistoty v matečném roztoku, někdy až o 50 % (cit.¹⁹), vliv způsobu nukleace je méně významný. Znalost šířky metastabilní oblasti poskytuje především informaci, kdy dojde k nechtěné spontánní nukleaci, ale i informaci, kdy zahájit očkovanou nukleaci. Nukleace nastává v přesyceném roztoku a toho lze dosáhnout:

- odpařováním rozpouštědla,
- ochlazením roztoku,
- přidáním antisolventu (vysrážení produktu),
- změnou pH,
- přidáním látky, která chemickou reakcí vytvoří žádaný produkt (tzv. reakční krystalizace),
- k přípravě jak krystalické, tak amorfni API lze použít i techniku lyofilizace.

Ve výrobě se často používá technika přidání antisolventu („srážedla“), aby se skokově snížila rozpustnost krystalizované API v matečném roztoku a tím se dosáhlo co největšího výtěžku. Např. přídavek vody vysráží API z polárního organického rozpouštědla a naopak polární organické rozpouštědlo vysráží API z vodných roztoků. Jako srážedlo lze také použít kyselinu nebo zásadu, pokud je rozpustnost API výrazně závislá na pH. To lze využít např. u karboxylových kyselin, protože snížením pH vodných roztoků jejich solí vznikají volné (nedisociované) kyseliny, jejichž rozpustnost ve vodě bývá velmi nízká. Při použití techniky vysrážení je požadována rozpustnost API v rozmezí 1–10 mg ml⁻¹. Formálně podobná je krystalizace chemickou reakcí po přidání reagentu k roztoku, kdy výchozí složka a produkt se výrazně liší rozpustností v daném rozpouštědle.

Krystalizace změnou teploty, zpravidla ochlazením roztoku, se často používá v případě, když je rozpouštěcí křivka API výrazně teplotně závislá. Při použití této metody je výhodné, když rozpustnost API leží v rozmezí 10 až 100 mg ml⁻¹. Pokud rozpustnost leží mimo toto rozmezí, získá se buď malý výtěžek (při nižší hodnotě) nebo velké, pomalu rostoucí krystaly (při vyšší hodnotě). Pokud nevyhovuje hodnota rozpustnosti v jednom rozpouštědle, lze požadovaného rozmezí dosáhnout použitím směsi rozpouštědel.

Krystalizace odpařováním rozpouštědla, příp. vakuová krystalizace, přichází v úvahu, když rozpouštěcí křivka právě není výrazně teplotně závislá. Pro výslednou kvalitu

produktu je důležitá i rychlost dosažení přesyceného roztoku. Hodnota rozpustnosti API při technice odpařování by měla být >10 mg ml⁻¹.

Při vysrážení produktu většinou dochází k velkému přesycení a k nebezpečí nekontrolované spontánní nukleace a následně rychlé krystalizace, kdy z roztoku naráz vypadne až 50 % krystalů²⁰. Kontrolované rychlosti nukleace a tím záruky reprodukovatelnosti šarží se dosahuje přidáním krystalizačních oček požadovaného polymorfu (stabilního nebo zvoleného metastabilního). Také lze využít např. ultrazvuku nebo při krystalizaci z vody zavádění páry pod hladinu přesyceného roztoku.

S očkovanou nukleací jsou spojeny dva problémy. Jaké množství oček je potřeba k úspěšné krystalizaci a v jakém okamžiku očka do roztoku přidat? Empiricky byla stanovena hmotná bilance²¹ mezi velikostí oček (L_S), velikostí krystalů produktu (L_P), hmotností produktu (M_P) a hmotností oček (M_S), která konstatuje, že prakticky veškerá hmota naroste na vložených očkách (tzn., že sekundární nukleace během procesu je prakticky nulová):

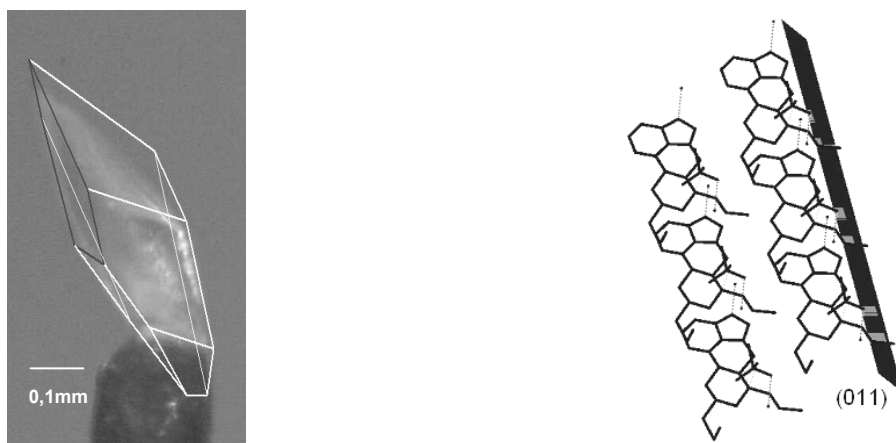
$$L_P / L_S = (M_P / M_S)^{1/3} \quad (17)$$

Oček se přidává max. do 10 hm.% výtěžku, což v průmyslovém měřítku („scale up“) může představovat i několik desítek kilogramů požadovaného produktu. Očka se do roztoku doporučuje²⁰ přidat v ¼ až ½ šířky metastabilní oblasti, ve směru od rovnovážné rozpouštěcí křivky, a nejlépe ve formě krystalické kaše, ve které jsou očka „aktivována“. Mletí oček pro aktivaci se nedoporučuje, spíše mají být čerstvě krystalizována. To lze někdy obtížně splnit, protože se většinou používají očka oddělená z předchozí šarže. Při první šarži ovšem vzniká problém, kde očka opatřit. To lze řešit výrobou menšího množství v laboratorním měřítku. Pokud jsou problémy s krystalizací oček nestabilního polymorfu nepřekonatelné, pak do arsenálu generických firem patří i jejich extrakce z tablet konkurence. Úspěšná očkováná krystalizace je i empirickou záležitostí zkušeného obsluhujícího personálu. Na druhé straně má očkováná krystalizace svá omezení. Pokud rozpouštěcí křivka metastabilního polymorfu kříží hranici metastabilní oblasti stabilnějšího polymorfu, pak tento metastabilní polymorf nelze vykrystalovat očkováním při ochlazení roztoku.

Důležitou podmínkou úspěšné krystalizace je, aby vznikající krystaly vytvářely s roztokem suspenzi, která je stále promíchávána. Pro kvalitu výsledného produktu jsou důležité fyzikální vlastnosti suspenze, např. její viskozita a hustota, což ovlivňuje možnost sedimentace, která je nežádoucím faktorem. Krystaly nesmí klesat na dno krystalizátoru, kde mají tendenci se shlukovat do agregátů. Problém agregace krystalů pak komplikuje následující technologické stupně výroby léčiva a sice mikronizaci (mletí) a vlhkou granulaci.

Řešení problému stabilizace metastabilního polymorfu bylo již uvedeno v kap. 5. V některých případech pomohou i aditiva²².

Dalším sledovaným parametrem je velikost vznikajících krystalů. Pokud jsou krystaly příliš velké, dochází



Obr. 6. Racionalizace tvaru a růstu krystalu pergolidu methansulfonátu (mesylátu) formy I. Vlevo je na krystalu černě ohraničena rovina (011) a vpravo je tato rovina vyznačena v krystalové struktuře (obrázek laskavě poskytli Dr. Alexandr Jegorov, Ivax Pharmaceuticals a Dr. Jan Čejka, VŠCHT Praha)

k jejich oděru a ke vzniku mikrokrytalického prachu, na kterém může docházet k další, nežádoucí nukleaci. Kvalitu krystalů lze ovlivnit geometrií a typem krystalizátoru a operačními podmínkami (hydrodynamikou). Jedná se o způsob a rychlost míchání suspenze, tvar míchadla, velikost krystalizátoru, umístění míchadla atd.

Velikosti krystalických API se běžně pohybují v rozmezí 10–50 μm . Někdy se vyrábí i větší krystaly – až stovky μm , ale jen tehdy, když jsou speciálně požadovány pro vývoj lékové formy. To se využívá např. při přímé tabletaci API bez granulace. V tomto případě musí být rozpustnost API velmi dobrá a velikost krystalů nesmí ovlivnit disoluční profil substance. Velké krystaly nesmí způsobit kolísání obsahu API v tabletě.

Sledovaným parametrem produktu je také tvar krystalů (krystalový design). Tvar krystalů určuje důležité mechanické vlastnosti produktu, jako je sytná hustota, filtrovatelnost, mikronizovatelnost aj. a kromě toho ovlivňuje i vlastnosti formulací. Polymorfy jedné API se obvykle liší krystalovým tvarem, ale i jeden polymorf může vytvořit několik různých habitů. Tvarově se liší krystaly např. různých solvátů β -estradiolu, ale i monomorfní acetylsalicylová kyselina (aspirin) krystaluje v různých tvarech²³. Tvar krystalů lze především ovlivnit použitým rozpouštědlem, resp. směsí rozpouštědel, speciálně i obsahem vody v rozpouštědle²⁴. Rozpouštědla lze podle příbuznosti hodnot jejich parametrů (např. polarita, dipólový moment, viskozita, povrchové napětí, bod varu, hustota aj.) kategorizovat do skupin²⁵, což pomáhá při vytváření cíleného krystalového designu.

Tvar krystalů lze ovlivnit i krystalizačními aditivy, které se přednostně adsorbují na určité plochy a tím blokují jejich růstovou rychlost. Princip působení aditiv spočívá v tom, že každá krystalová plocha má v povrchové vrstvě jinak orientovanou stavební molekulu, a aditivum se naváže pouze na určité orientace. Jako aditivum lze použít např. močovinu, iontové soli, kyselinu octovou²⁶, aj. Kla-

sickým příkladem je chlorid sodný, který z vodného roztoku běžně krystalizuje v krychlich, zatímco v přítomnosti několika procentního roztoku močoviny v oktaedrech. Firmou Accelrys je nabízen simulační software Morphology²⁷, který umožňuje predikovat habitus krystalu při krystalizaci z vybraného solventu v přítomnosti aditiv a při zahrnutí efektů způsobených nečistotami.

Tvar krystalů je také ovlivněn stupněm přesycení (stupeň přesycení $S > 1$ je definován poměrem $S = c/c_{\text{eq}}$, kde c znamená koncentraci uvažovaného přesyceného roztoku). Při rychlé krystalizaci za velkého přesycení vznikají dendrity. Jsou to stromkovité útvary, jejichž tvar lze vysvětlit tím, že se difuzí nestačí přivést k povrchu dostatečné množství materiálu a přednostně rostou pouze významné krystalové směry. Také se nestačí odvést krystalizační teplo a tak se v bezprostředním okolí krystalu snižuje stupeň přesycení.

Klíčovou úlohu má tvar krystalů u pulmonárních pevných lékových forem, používaných např. při léčbě bronchiálního astmatu (Seretide[®], GlaxoSmithKline). Při inhalaci musí částice léčiva, právě v závislosti na svém optimálním aerodynamickém tvaru, s jistotou doletět až do plic.

Kombinací programů CrysAlis²⁸ a Mercury²⁹ lze racionalizovat tvar a vysvětlit růst krystalu. Na obr. 6. je znázorněna rovina (011) a na ní kolmo je směr nejpomalejšího růstu krystalu. Naopak nejrychleji roste krystal právě podél roviny (011). Tento efekt je snadno vysvětlitelný. Ve směru nejrychlejšího růstu dochází k řetězení molekul prostřednictvím vodíkových vazeb mezi pergolidem a aniontem kyseliny methansulfonové. Molekula, která se z tohoto směru přiblíží, je pevně zachycena vodíkovými vazbami, přičemž vznik vazeb kompenzuje přechod ze stavu o vyšší entropii k entropii nižší, odpovídající více uspořádanému systému. Naopak v kolmém směru k rovině (011) se molekula přiblížuje pouze jednou ze svých stran, nedochází k vytvoření silných vazeb, molekula je zachyce-

na pouze slabými silami a růst krystalu ve směru kolmém k rovině (011) je proto nejpomalejší.

Podmínky krystalizace a krystalový tvar produktu mohou být průmyslovým výrobcem i patentově chráněny. Příkladem je patentový spor firem Monsanto a Ajimoto o krystalový tvar aspartamu²⁶ (dipeptid kyseliny asparagové a fenylalaninu), který je v potravinářství používán jako umělé sladidlo (100–200× sladší než sacharosa). Originální výrobce, firma Monsanto, produkovala aspartam pod komerčním názvem Nutra-Sweet[®], který obsahoval tenké jehličkovité krystaly, délky několika mm, které měly tendenci se rozpadat na ultrajemný prach. To samozřejmě způsobovalo problémy s filtrací a sušením produktu, který byl v této formě nepřilíši vhodný k tabletaci.

Konkurenční výrobce, fa Ajimoto zjistila, že ochlazením vodného roztoku bez míchání vznikají snopkovité krystaly aspartamu, které mají daleko lepší technologické parametry než konvenční jehličkovité krystaly fy Monsanto. Podstatou vyvolaného patentového sporu bylo rozhodnout, zda produkty firem Monsanto a Ajimoto jsou stejné nebo nikoliv. Po několika letech sporů vydala v roce 1997 Apelační rada Evropského patentového úřadu rozhodnutí, kterým uznala technologii firmy Ajimoto při produkci krystalů aspartamu za nový patentově chráněný postup.

7. Závěr

Vzhledem k převažující produkci pevných lékových forem je krystalizace ve farmaceutické výrobě nejdůležitějším čistícím a separačním procesem. Velmi rozšířený jev polymorfismu farmaceutických substancí a zvláště nekontrolovatelné polymorfni přechody nutí výrobce, aby krystalizace požadovaného polymorfu z roztoku byla pod důkladnou kinetickou a termodynamickou kontrolou. Při spontánní nukleaci typicky krystalizuje jako první metastabilní polymorf, který pak přechází pomaleji či rychleji na stabilnější formu, takže často je produktem polymorfni směs. Kontrolovaná krystalizace aktivních substancí ve farmaceutické výrobě se provádí očkovaním roztoku krystaly produktu. Tím je zaručena reprodukovatelnost výrobních šarží i kvalita produktu. Technika očkovaním však vyžaduje pečlivou znalost systému (polymorfni chování, křivky rozpustnosti, šířky metastabilních oblastí), aby bylo možné určit přesný okamžik, kdy očka do roztoku přidat a v jakém množství. Dalšími důležitými faktory cílené krystalizace jsou typ použitého krystalizátoru, jeho hydrodynamika, použité rozpouštědlo, resp. směs rozpouštědel a krystalizační aditiva.

Sledovanými parametry výsledného produktu jsou: výtěžek, chemická a fyzikální (polymorfni) čistota krystalů, distribuce jejich velikostí, krystalový tvar a obsah zbytkových rozpouštědel.

Autor děkuje Dr. Q. Smejkalovi za přispění k této práci a pánům A. Jegorovi, J. Hostomskému, J. Jirmanovi a J. Hájičkovi za podnětné připomínky.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT ČR č. 6046137302.

LITERATURA

1. Kratochvíl B.: Čs. čas. fyz. 55, 576 (2005).
2. (a) Nývlt J., Hostomský J.: *Průmyslová krystalizace*. Edice MAPRINT. Nakladatelství Procesní inženýrství, Praha 1996; (b) Nývlt J., Söhnle O., Matuchová M., Broul M.: *The Kinetics of Industrial Crystallization*. Academia, Praha 1985; (c) Myerson S. A. (ed.): *Handbook of Industrial Crystallization*. Butterworth-Heinemann, Boston 1993; (d) Mullin J. B.: *Crystallization*. Butterworth-Heinemann, Boston 2001.
3. Yu L., Reutzel-Edens S. M., Mitchell Ch. A.: *Organic Process Research & Development* 4, 396 (2000).
4. Verma A. R., Krishna P.: *Polymorphism and Polytypism in Crystals*. John Wiley, New York 1966.
5. Ostwald W.: *Z. Physik. Chem.* 22, 289 (1897).
6. Štěpánková H. v prezentaci: Vliv polymorfismu na vlastnosti léčiv. 3. odborná konference VÚFB: Vliv polymorfismu na chování farmaceutických látek. VÚFB Praha, 12.–13.11. 2003.
7. Dunitz J., Bernstein J.: *Accts. Chem Res.* 28, 193 (1995).
8. Chemburkar S. R.: *Organic Process Research & Development* 4, 413 (2000).
9. http://en.wikipedia.org/wiki/Crystal_engineering. Staženo dne 16. 9. 2006.
10. Mitchell C. A., Yu L., Ward D. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 123, 10830 (2001).
11. Bingham A. L., Hughes D. S., Hursthouse M. B., Lancaster R. W., Tavener T. L., Threfall T. L.: *Chem. Commun.* 2001, 603.
12. Jegorov A., Cvak L., Bednář R., Čejka J., Hušák M., Kratochvíl B., Císařová I.: *Struct. Chem.* 17 (1), 131 (2006).
13. Hušák M., Kratochvíl B., Sedmera P., Stuchlík J., Jegorov A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 58, 2944 (1993).
14. Sborník konference: Pharmaceutical co-crystals. IQPC. 25th–27th September, Amsterdam 2006.
15. Haynes D. A., Jones W., Motherwell S. W. D.: *J. Pharm. Sci.* 94, 2111 (2005).
16. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>. Staženo 16.9.2006.
17. Mutz M.: RADAR: A Global Database Bridging the Gap Between Research and Development. ACD/Labs 7th Annual European Users Meeting. Obernai 2006.
18. Nývlt J.: *Rovnováhy tuhá fáze-kapalina*. Academia, Praha 1975.
19. Beckman W., Otto W., Budde U.: *Organic Process Research & Development* 5, 387 (2001).
20. Beckmann W.: *Organic Process Research & Development* 4, 372 (2000).
21. Davey R., Garside J.: *Introduction to Crystallization*. Oxford University Press. Oxford 2000.
22. Garekani H. A., Ford J. L., Rubinstein M. H., Rajabi-Siahboomi A. R.: *Pharm. Res.* 13, 209 (1996).
23. Byrn S. R., Pfeiffer R. R., Stowell J. G.: *Solid-State*

- Chemistry of Drugs*. 2. vydání. SSCI. West Lafayette 1999.
24. Hušák M., Kratochvíl B., Císařová I., Cvak L., Jegorov A., Böhm S.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67, 479 (2002).
 25. Hilfiker R., De Paul S. M., Szelagiewicz M., v knize: *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry* (Hilfiker R., ed.), str. 290. Wiley-VCH, Weinheim 2006.
 26. Bernstein J.: *Polymorphism in Molecular Crystals*. Clarendon Press, Oxford 2002.
 27. <http://www.accelrys.com/products/mstudio/modeling/crystallization/morphology.html>. Staženo 16.9. 2006.
 28. Oxford Diffraction's the crystallographic processing and diffractometer control software CrysAlis. <http://www.oxford-diffraction.com>. Staženo 17.9.2006.
 29. Bruno I. J., Cole J. C., Edgington P. R., Kessler M., Macrae C. F., McCabe P., Pearson J., Taylor J.: *Acta Crystallogr. B*58, 389 (2002).

B. Kratochvíl (*Department of Solid State Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Crystallization of Pharmaceutical Substances**

The theoretical background and crystallization techniques used in pharmaceutical manufacture are reviewed. Processes of primary and secondary nucleation, thermody-

namics and kinetics of crystal growth and the phenomenon of polymorphism and polymorphic transitions are introduced. Polymorphism is a keyword of considerable importance in the pharmaceutical industry. Most pharmaceutical substances crystallize in more than one solid state form, whether they are polymorphs or solvates or both. Crystallization of the required polymorph from a solvent must be under kinetic and thermodynamic control because possible polymorph transformations are influenced by many parameters of the crystallizer. The phase nucleated during a primary (spontaneous) nucleation is a typically metastable polymorph. Unstable polymorphs have a tendency to transform to more stable ones, and finally to the thermodynamically stable form. Crystallizations in the pharmaceutical industry are often carried out batchwise. Changes in the polymorphic form of the batches produced are seen as indicative of changes in the crystallizing conditions, so seeding techniques are used for batch reproducibility. The development of seeding strategies is facilitated by certain data on the system (polymorphic behaviour, solubility curves, widths of metastable zones). Special attention is paid to the preparation of the seed, optimisation of the seeding strategy and the amount of the seed added. The quality of the product (crystal size, shape, purity) and the choice of the solvent are also discussed. An example of the patent suit between Monsanto and Ajimoto companies concerning the crystal shape of aspartam is mentioned for illustration.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze nabízí zaměstnání

Pozice: referentka na studijním oddělení děkanátu Fakulty chemické technologie VŠCHT Praha
Pracovní náplň: doktorské studium, agenda vědy a výzkumu

Požadavky: úplné střední vzdělání, pasivní znalost a.j., dobrá znalost práce s PC (Excel, Word), komunikativnost, vstřícnost, přátelský přístup

Co nabízíme: příjemný pracovní kolektiv, práce s mladými lidmi, možnost využití školních rekreačních zařízení, příspěvek k důchodovému pojištění, pravidelné nabídky kulturních akcí

Nástup: 1.5. 2007

Úvazek: 40 hodin/týden

Platové zařazení B4, podle tarifních tříd VŠCHT Praha

Nabídky se stručným životopisem, doloženým vzděláním a přehledem dosavadní praxe zasílejte na adresu:

Vysoká škola chemicko – technologická v Praze

Ing. Pavla Vlčková

Personální odbor

Technická 5

166 28 Praha 6

HORMONY A LÁSKA

LUBOSLAV STÁRKA

Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha
lstarka@endo.cz

Došlo 13.12.05, přijato 16.2.06.

Klíčová slova: zamilovanost – romantická láska, stresové hormony, návyk, oxytocin, katecholaminy, serotonin, nervový růstový faktor

Obsah

1. Úvod
2. Teorie o citu lásky
3. Fáze lásky
 - 3.1. Romantická láska – stresové hormony
 - 3.2. Stabilní láska – endorfiny ?
 - 3.3. Fáze reprodukce a péče o potomstvo – oxytocin – hormon věrnosti
4. Závěr

1. Úvod

Láska je snad hlavním tématem krásné literatury a důležitým motivem i jiných oblastí umění, ale na její podstatu ani umění, ani věda odpověď dosud neumí dát. Partnerskými vztahy od zamilování až po rozchod, domácí násilí a jiné krajní jevy se zabývá právo, sociologie nebo psychologie, ale pro medicínu nebo biochemii je láska oblastí dosud jen nepatrně zmapovanou. O tom, jak to je u lidí se stavem zamilovanosti a lásky z hlediska hormonálních změn, existuje jen velice skromný počet vědeckých prací^{1–4}. Na internetu ve vyhledávacím programu PubMed pod heslem „falling in love AND hormones“ najdeme jen 3 odkazy, pod heslem „love AND hormones“ kolem třicítky odkazů, z nichž převážná většina má s tématem spojitost jen náhodnou a irelevantní.

2. Teorie o citu lásky

Na otázku, co je láska, nedává tedy odpověď ani věda, ani krásná literatura, ačkoliv láska je nepochybně důležitým psychosociálním fenoménem. Podle W. Jankowicka⁵ z nevadské university v Las Vegas má ze 166 studovaných kultur romantická láska místo ve 147 kulturních

společenstvích. Je tedy téměř univerzálním jevem a velice obecnou, i když ne nezbytnou, součástí reprodukční biologie člověka. Zamilovanost představuje – v mnoha případech – úvod do dlouhodobých partnerských vztahů. Někteří jiní vědci však mezi základní primitivní lidské city, jako je strach, hněv nebo radost, lásku neřadí.

Že zamilovanost je provázána – nebo vyvolávána – živými ději v centrální nervové soustavě, pomáhá dnes řešit moderní projekce neurologických dějů do různých lokalit v mozku zamilovaných pomocí zobrazovacích metod, jako je magnetická rezonance nebo pozitronová emisní tomografie. Ale ani tyto studie^{6,7} nejsou příliš čtené a docházejí pouze k závěru, že oblasti aktivace a deaktivace nejsou shodné s místy projekce běžných emocí. Víme, že v mozku jsou aktivovány bilaterálně medialní insula a kortex předního cingula a subkortikálně nucleus caudatus a putamen, deaktivovány gyrus cingulatus posterior, amygdala, pravostranně oblasti v prefrontálním, parietálním a středním temporálním kortexu, ale zatím toho mnoho nevíme, které působky, ať už transmittery nebo hormony, se na těchto pochodech účastní.

Více je studií o lásce z aspektu psycho-sociálního a kulturního nebo pokusů na zvířatech v době námluv z pohledu neurobiologického. V experimentálních pracích o tvorbě biologického páru je potvrzena úloha osy hypotalamus-hypofýza-nadledvina a úloha oxytocinu^{8,9}. Snaha poznat endokrinní pozadí stavu zamilovanosti a lásky u lidí samozřejmě nesmí znamenat degradaci tohoto stavu na jednoduchá chemická schémata.

Láska je skutečně velice pevně zakotvena v evoluční historii člověka, v jeho biologii i biochemii¹⁰. Byla zřejmě naprogramována do našich genů, protože pomáhala udržovat pospolu lidský pár po dobu nezbytnou pro výchovu potomků až do prvních známek jejich samostatné životaschopnosti. K naší škodě je toto zřejmě genově zakotvené období omezeno na pouhé asi čtyři roky. Toto „čtyřroční pokušení“ se dosud zcela zřetelně projevuje na statistice rozvodů: je tomu tak ve většině z 62 kultur, které studovala H. Fisherová¹¹. Zjistila zcela jasný vrchol rozvodovosti ve čtvrtém roce po sňatku. Další dítě však posunuje následný známý nový vrchol rozvodovosti na sedm roků po svatbě. Jiné doklady ukazují, že romantická zamilovanost netrvá většinou déle než jeden rok³.

Romantická láska není tedy věčná ani výlučná a je třeba na ni pohlížet jako na dynamický proces. Na rozdíl od pojetí lásky v umění to také není zvláštní stav srdce nebo duše. Z pohledu endokrinologie jde spíše o hru hormonů a transmitterů, podle některých autorů snad přímo o chemickou intoxikaci organismu. Není divu, je-li pro někoho zamilovanost stresem, protože chemické cesty a hormonální faktory jsou u lásky zřejmě podobné jako u stresu.

Existují však i teorie, které s účastí hormonů příliš

nepočítají^{11–14} nebo hledají spíše paralelu s pochody typickými pro závislost, které ovšem také nejsou příliš jasné a v nichž zřejmě neurohormony budou hrát důležitou roli¹⁵.

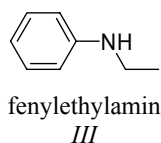
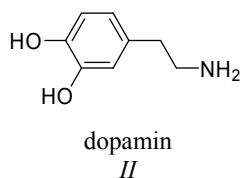
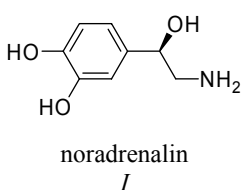
3. Fáze lásky

Řada autorů se přidržuje časového rozdělení lásky na fázi romantické lásky, na dobu jejího naplnění a na konečnou fázi, jejíž hlavní úlohou je reprodukce a starost o mláďata.

3.1. Romantická láska – stresové hormony

O romantické zamilovanosti panovala představa, že v ní hrají roli katecholaminy – adrenalin, noradrenalin a jejich metabolity – a také stresový steroidní hormon kortizol a jeho regulátory – kortikoliberin CRH a adrenokortikotropní hormon ACTH. Ve fázi naplněné lásky by snad měly hrát roli endorfíny, endogenní polypeptidy s výrazným účinkem na mozgová centra pocitu libosti, a ve fázi péče o potomstvo podle posledních názorů dominuje vliv peptidu oxytocinu a vasopresinu, secernovaných zadním lalokem hypofýzy.

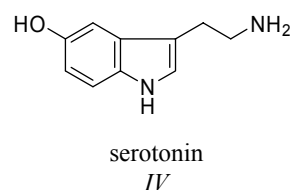
Jedna z prvních hypotéz o biologické a endokrinní podstatě zamilovanosti byla představa o podobné struktuře katecholaminových transmiterů a amfetaminů, které mohou vyvolávat řadu účinků, podobných počátečními stadii romantické lásky. Ve své prvé fázi romantické zamilovanosti je láska snad excitací stresového charakteru. Je řada dokladů^{16,17}, že stresové situace usnadňují tvorbu nových sociálních vazeb i intimních svazků u lidí i u zvířat. Euforie při zamilovanosti by pak byla pochopitelná proto, že v ní rozhodují metabolity hormonů dřeně nadledvin: noradrenalin (*I*), dopamin (*II*) a zejména s metabolismem katecholaminu spojený fenylethylamin (*III*). Katecholaminy, jak se zdá, však mohou být spíše známkou psychické nepohody, jak o tom svědčí jejich vyšší hladina u mužů a žen v rozvodových situacích, v manželských hádkách apod. V těchto stresových situacích je kromě adrenalinu také zvýšena hladina ACTH⁴. V souvislosti s katecholaminy byla – spíše v úvahách – věnována pozornost bio-



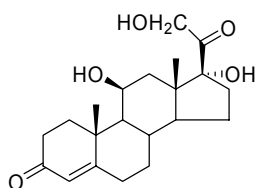
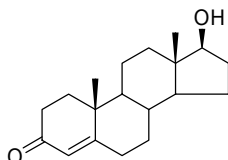
genním aminům, které jsou svými účinky v něčem blízké amfetaminům. Amfetaminy mají typický charakter návykových drog a zamilovanost skutečně může být jistou formou narkomanie^{18,19}.

β -Fenylethylamin spolu s tyraminem, tryptaminem a octopaminem patří mezi biogenní aminy, které jsou přítomny ve stopovém množství v nervovém systému a jsou vázány na specifickou rodinu receptorů svázaných s G-proteinem (GPCR). Jejich funkce a dokonce i původ v nervovém systému nejsou dostatečně známy. β -Fenylethylamin a jeho metabolity (fenylethanolamin, tyramin, acetyl-fenylethylamin a fenylacetaldehyd) působí na dopaminergní systém v některých oblastech mozku, zejména v nigrostriatu. U zvířat v experimentu bylo sledováno chování po i.v. injekci aminů do mozku a bylo zjištěno, že β -fenylethylamin a acetyl-fenylethylamin indukují rotace zvířat ipsilaterálně, tedy na stejnou stranu, do jaké byla látka do mozku injikována²⁰. Jistě to nemá nic společného s tím, že se někomu láskou hlava točí, ale svědčí to o výrazném účinku na centrální mozkový systém. Jde o psychomotoriku stimulující bioamin, který působí na acetylcholinový systém ve striatu a inhibuje dopaminovou neuronální aktivitu cestou dopaminových D(2) receptorů.

Důkazy však pro teorii přisuzující stav zamilovanosti působení fenylethylaminu nebyly přineseny žádné²¹. Bylo však prokázáno¹, že romantická láska je provázena snížením transportéru destičkového serotoninu a tedy s poruchou dostupnosti serotoninu (*IV*), podobně jako je tomu u některých psychóz anebo u patologické žárlivosti²², a že zamilovanost je také spojena se signifikantním zvýšením nervového růstového faktoru NGF³. Tento neurotropin měl dokonce pozitivní korelaci s intenzitou romantické lásky a po 12–24 měsících postupně, jak se romantická láska měnila na stabilní stav nebo vyprchala, se hladina NGF normalizovala a nebyla odlišná od kontrolní skupiny. V této spojitosti je jistě zajímavé, že hladina některých neurotopinů, včetně NGF, se zvyšuje při líbání a že se touto cestou zlepšují i alergické kožní reakce²³.



Podobný přístup k studiu zamilovaných párů jako autoři zabývající se neurotropiny měla i skupina kolem prof. Marazzitiové^{1,2,22}. Srovnávala zamilované páry nejen s běžnými kontrolními osobami, ale sledovala je po dobu delší než rok, kdy už pak nešlo o lásku romantickou. Zjistila² u všech zamilovaných vyšší kortizol (*V*) a snížení folikuly stimulujícího hormonu FSH a u zamilovaných mužů snížení testosteronu (*VI*), což svědčí pro chápání zamilovanosti jako stresové situace. Pozoruhodné v této práci je však zvýšení testosteronu u zamilovaných žen v kontrastu s jeho poklesem u mužů. Také ve srovnání s většinou obratlovců, u nichž dvoření a námluvy u samců

kortizol
Vtestosteron
VI

jsou téměř vždy spojeny se vzestupem androgenů (u sloňích samců v říji dokonce padesátinásobné zvýšení testosteronu), se endokrinní sekrece zamilovaných mužů chová značně nestandardně. Zamilovanost však nelze ztožňovat se sexuálním vzrušením, které má zcela jiné fyziologické charakteristiky, i když se někdy oba tyto stavy setkávají.

Nejen zamilovanost, ale i odloučení partnerů v úzkém svazku vede k stresové reakci systému hypotalamus-hypofýza-nadledviny²⁴.

3.2. Stabilizace lásky – endorfiny?

Navázání sociálních vazeb ulehčuje nástup fyziologického stavu se sníženou anxiétou a redukovanými negativními pocity^{25–27}. Skutečně také u většiny zamilovaných počáteční stadium excitace a euforie přechází do stadia, které se vyznačuje pocitem bezpečí, klidu a vyrovnanosti a které je ovládáno jiným typem hormonů. Převládá zřejmě vliv endorfinů, látek, které své působení uplatňují přes stejné receptory jako exogenní opiáty. Opět tedy jakási forma narkomanie, ale odlišná od fáze prvé¹⁸. Na rozdíl od amfetaminových derivátů nejsou endorfiny produkovány nadledvinou, ale převážně mozkiem, a mají nikoli excitální, ale zklidňující a bolest tišící účinek.

3.3 Fáze reprodukce a péče o potomstvo – oxytocin, hormon věrnosti

Dalším hormonem, který však již skutečně patří k nástrojům biologických regulací vlastních reprodukčních pochodů, je oxytocin. Doménou jeho působení je vlastně již další fáze lásky – fáze reprodukce a péče o potomstvo. Je produkován hypotalamem a uvolňován z hypofýzy – mimo jiné při milostném aktu – a způsobuje svalové kontrakce. Oxytocin v povědomí lékařů je spojován spíše se ženami než muži. Pod jeho vlivem totiž dochází u žen k porodním stahům i k ejekci mléka, ale je i významným hormonálním regulátorem sexuálního a mateřského chování nebo pozitivních sociálních kontaktů snižujících anxiety^{8,9,28–32}. Snad působí i na matky, aby se mazlily se svými

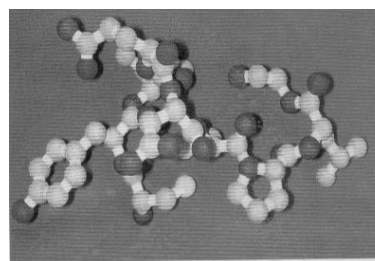
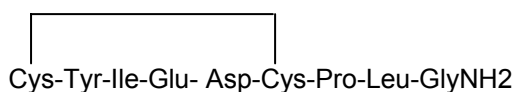
mi dětmi a asi podobnou účinnost má i na aktivitu mezi ženou a mužem. Zvýšené vyplavení oxytocinu je součástí biochemických dějů při orgasmu: u mužů při sexuálním vyvrcholení stoupá jeho hladina několikanásobně a u žen dokonce ještě více než u mužů³³. Jeho hladina se zvyšuje tělesným kontaktem³⁴.

Vzájemné dotyky partnerů přispívají tak i k oxytocinem zprostředkované inhibici adrenergní aktivity, zejména snížení krevního tlaku, a to zejména u žen. Oxytocin (VII), sekret neurohypofýzy, vyvolává také pocit uvolněného uspokojení a náklonnost a je evidentně antistresovým působkem^{31,32} a podle posledních poznatků zvyšuje oxytocin vzájemnou důvěru mezi lidmi³⁵.

Hladiny oxytocinu u žen i mužů jsou podobné a receptory pro oxytocin se nalézají v řadě tkání, zejména v míše, u obou pohlaví. Oxytocin byl také označen jako „hormon věrnosti“, protože řada poznatků na zvířatech ukázala, že je značný rozdíl v oxytocinových receptorech mezi blízkými druhy hrabošů, z nichž jeden (*Microtus ochrogaster*) je monogamní a žije v sociální struktuře více zvířat, zatímco druhý (*Microtus pennsylvanicus* a *M. monaxus*) je polygamní a žije solitérně^{36,37}. Monogamní chování a péči o mláďata u samců *M. ochrogaster* lze zrušit injekcí antagonistů oxytocinu atosibanu (Tractocile®; 1-deamino[D-Tyr(Et)2,Thr4]ornitinvasotocin) anebo ještě účinnějšího nově vyvíjeného syntetického peptidu barusibanu (FE 200440, Ferring Pharm.), používaných jako tokolytika. Na druhé straně monogamní chování je upevňováno prostřednictvím dopaminových D2, ale nikoli D1 receptorů.

V neurobiologii sociální vazby – partnerském vztahu, dvoření, věrnosti, péči o mláďata, vztahu k ostatním jedincům svého druhu – hrají neuropeptidy oxytocin a vasopresin významnou úlohu^{38,39}. Tyto „hormony lásky a strachu“ modulují integrace informací v amygdale⁴⁰.

I když, jak se zdá, si věda ví rady, jak vysvětlit pocity v různých stádiích lásky a jak jim přiřadit různou důležitost pro plození i výchovu lidských mláďat, zůstává



Obr. 1. Model molekuly oxytocinu; v oblasti Cys1 je kumulován negativní náboj, v oblasti Gly9 pozitivní náboj. (model podle Ing. R. Bílka, CSc., Endokrinologický ústav, Praha)

stále záhadou, proč tyto děje v nás iniciuje právě ten jeden nebo ta jedna pravá mezi tisíci, jaká to jiskřička přeskóčí, aby vyvolala ony sekvence sekrecí hormonálních drog a afrodisiak a proč ani co nejspřávněji v lékárně namíchané hormonální koktejly nemohou působit jako nápoj lásky tam, kde pro to nejsou zatím ještě nepostižitelné předpoklady. U některých živočichů pro tyto facilitace nacházíme biologické důvody, např. ve feromonech⁴¹ a jiných vůních či zápaších, v zásunbních rituálech a schématech dvoření, ale u člověka jsou zřejmě tyto signální soustavy mimo (hlavní) provoz.

Tolik zatím dodávají k otázce lásky naše znalosti o hormonech a endokrinologii. Snad v nedaleké budoucnosti budeme o chemii lásky znát více a budeme moci ordinovat antihormony proti nešťastné lásce nebo působky, posilující partnerskou věrnost. Doufám ale, že láska zůstane ještě dlouho elixírem složeným z ingrediencí tělesných i duševních, z reality i imaginace, poezie i bušení srdce, i když snad i trochu z kortizolu, endorfinů a oxytocinu.

4. Závěr

Přestože v krásné literatuře je jedním z hlavních námětů zamilování a láska a přestože různé socio-psychologické koncepce a modely na tvorbě párů u různých živočichů s úlohou hormonů počítají, humánní endokrinologie si tohoto tématu všimá dosud jen velice spoře. Počáteční zamilovanost má některé rysy stresové odpovědi s odezvou ve stresových hormonech, zejména kortizolu a katecholaminech a v období romantické lásky se zjišťují změny v dostupnosti serotoninu a neurotropinů (transformačního růstového faktoru β), v pozdějších fázích lásky snad hrají roli endorfiny a oxytocin, ale průkaz ve studiích na lidech zatím chybí.

Práce vznikla s podporou Interní grantové agentury MZ ČR v projektu č. I A8235-3/2004.

Seznam zkratk

ACTH	adrenokortikotropní hormon
CRH	kortikoliberin
FSH	folikuly stimulující hormon
GPCR	receptory napojené na G-proteiny
NGF	nervový růstový faktor

LITERATURA

- Marazziti D., Akiskal H. S., Rossi A., Cassano G. B.: *Psychol. Med.* 29, 741 (1999).
- Marazziti D., Canale D.: *Psychoneuroendocrinol.* 29, 931 (2004).
- Emanuele E., Politi P., Bianchi M., Minoretti P., Bertona M., Geroldi D.: *Psychoneuroendocrinology* 2005, Nov 9.
- Kiecolt-Glaser J. K., Bane C., Glaser R., Malarkey W. B.: *J. Consult. Clin. Psychol.* 71, 176 (2003).
- Jankowiak W. R., Fischer E. F.: *Ethol.* 31, 149 (1992).
- Bartels A., Zeki S.: *Neuroreport* 11, 3829 (2000).
- Bartels A., Zeki S.: *Neuroimage* 21, 1155 (2004).
- Carter C. S., DeVries A. C., Taymans S. E.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 807, 260 (1997).
- Carter C. S.: *Psychoneuroendocrinol.* 23, 779 (1998).
- Jankowiak W. R.: *Psychol. Rev.* 93, 119 (1986).
- Fisher H.: *Anatomy of Love*. Fawcett Columbine, New York 1992.
- Panksepp J.: *Behav. Brain Res.* 5, 407 (1982).
- Hazan C., Shaver P.: *J. Person. Soc. Psychol.* 52, 511 (1987).
- Porges S. W.: *Psychoneuroendocrinol.* 23, 837 (1998).
- Insel T. R.: *Physiol. Behav.* 79, 351 (2003).
- Kraemer G. W.: *Behav. Brain. Sci.* 15, 493 (1992).
- Panksepp J., Nelson E., Silvy S.: *Acta Pediatr. Suppl.* 397, 40 (1994).
- Kimball C. D.: *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156, 1463 (1987).
- Eisenstein M.: *Lab. Anim. (NY)* 33, 10 (2004).
- Barroso N., Rodriguez M.: *Eur. J. Pharmacol.* 297, 195 (1996).
- Liebowitz M. R.: *The Chemistry of Love*. Little Brown and Company, Boston 1983.
- Marazziti D., Rucci P., Di Nasso E., Masala I., Baroni S., Rossi A., Giannaccini G., Mengali F., Lucacchini A.: *Neuropsychobiology* 47, 12 (2003).
- Kimata H.: *Physiol. Behav.* 80, 395 (2003).
- Hennessy M. B.: *Neur. Biobehav. Rev.* 21, 11 (1997).
- Milgram N. A.: *Stress and Coping in Time of War: Generalizations from the Israeli Experiences*. Brunner Mazel, New York 1986.
- Simpson J. A., Rhole W. A.: *Adv. Pers. Relat.* 5, 181 (1994).
- Legros J. J.: *Psychoneuroendocrinol.* 26, 649 (2001).
- McCarthy M. M., Kow L. M., Pfaff D. W.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 652, 70 (1992).
- Herbert J.: *Brit. Med. J.* 309, 891 (1994).
- McGregor G. P., Lang R. E.: *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109, 83 (2001).
- Uvnäs-Moberg K.: *News Physiol. Sci.* 13, 22 (1998).
- Uvnäs-Moberg K.: *Psychoneuroendocrinol.* 23, 819 (1998).
- Filippi S., Vignozzi L., Vannelli G.B., Ledda F., Forti G., Maggi M.: *J. Endocrinol. Invest.* 26 (3 Suppl), 82 (2003).
- Grewen K. M., Girdler S. S., Amico J., Light K. C.: *Psychosom. Med.* 67, 531 (2005).
- Kosfeld M., Heinrichs M., Zak P. J., Fischbacher U., Fehr E.: *Nature* 435, 673 (2005).
- Lim M. M., Wang Z., Olazabal D. E., Ren X., Terwilliger E. F., Young L. J.: *Nature* 429, 754 (2004).
- Young L. J., Wang Z.: *Nature Neurosci.* 7, 1048 (2004).
- Kendrick K. M.: *J. Neuroendocrinol.* 16, 1007 (2004).
- Bielsky I. F., Young L. J.: *Peptides* 25, 1565 (2004).

40. Debiec J.: *Bioassays* 27, 869 (2005).
41. Stárka L., Doskočil M.: *Vesmír* 76, 202 (1997).

L. Stárka (*Institute of Endocrinology, Prague*): **Hormones and Love**

Though in literature – fiction and poetry – falling in love and romantic love play a crucial role and several psy-

chosocial conceptions of couple attachment involve the participation of hormones, human endocrinology noticed this theme only marginally. Falling in love shows some signs of hormonal response to stressors with changes in serotonin availability and neurotrophin (transforming growth factor β) concentration, in later phases of love endorphins and oxytocin, may play a role; however, the proof of hormonal events associated with love in humans has been lacking up to now.

BIOFARMACEUTIKA (BIOLÉČIVA)

LUDĚK BENEŠ

*Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno
benesl@vfu.cz*

Došlo 3.2.06, přijato 16.3.06.

Klíčová slova: biofarmaceutika, farmaceutika, farmaceutická chemie, biofarmaceutická chemie

Obsah

1. Úvod
2. Rozdělení biofarmaceutik
 - 2.1. Monoklonální protilátky
 - 2.2. Vakcíny
 - 2.3. Proteiny, včetně peptidických hormonů
 - 2.4. Enzymy jako léčiva
 - 2.5. Kombinace biofarmaceutik s jinými látkami a technologickými úpravami
 - 2.5.1. Kombinace biofarmaceutik s nosiči polymerního charakteru
 - 2.5.2. Kombinace monoklonálních protilátek s „klasickými“ nízkomolekulárními léčivy a toxíny
 - 2.5.3. Kombinace „klasických“ léčiv navázaných na polymerní nosiče a monoklonální protilátky
 - 2.6. Různá biofarmaceutika
3. Závěr

1. Úvod

Výsledky výzkumů molekulární biologie, biochemie, genetiky, chemie a dalších oborů, spolu s rozvojem počítačové techniky a programového vybavení, výrazně posunují původní zaměření farmaceutické chemie – farmakochemie do oblasti se silným interdisciplinárním zázemím. Diskuse a snahy o změnu názvu (a náplně) farmaceutické chemie, především po vzoru USA, vedly v šedesátých letech minulého století do jisté míry k upřesnění pojmu „pharmaceutical“ spíše na oblast analýzy léčiv. Název „medicinal“ představoval podle definice A. Burgera¹ spíše pojem „biologičtější“, jak ostatně vyplynulo z vlastní náplně této disciplíny a to značně dlouho před rozvojem počítačové techniky. Z těchto důvodů bylo zavedeno v USA

pojmenování „Medicinal Chemistry“. U nás se přibližujeme k současné náplni této disciplíny spíše názvem „farmakochemie“. Ve značné míře se jednalo o chemická léčiva nebo chemii léčiv nebiologického původu. Na druhé straně se začátkem devadesátých let objevují léčiva, zaváděná postupně do terapeutické praxe, která měla svůj původ v biologickém zázemí, i když často šlo o léčiva dlouho známá a vyráběná extrakční a jinou separační technikou z biologického materiálu. Nové přístupy využívající např. rekombinantní technologii, umožnily přípravu některých, dříve používaných léčiv a jejich strukturální modifikace. Toto období je spojeno s výrobou humánního insulinu rekombinantní technologií a s dalšími, rychle se rozšiřujícími biofarmaceutiky. Původní i současný pokrok v oboru byl, kromě jiného, výsledkem poznávání mechanismu účinku léčiv na molekulární úrovni a to zpětně i u léčiv dlouho známých a v praxi používaných. Dnes již klasickým příkladem může být zcela unikátní, více jak stoleté používání kyseliny acetylsalicylové (Aspirin®), a to až do konce 80. let minulého století prakticky bez znalosti mechanismu účinku. Obrat k mnohadisciplinární spolupráci a jejímu zesilujícímu trendu nastal nástupem oborů, postupně se oddělujících od původních disciplín např. koncem 40. let minulého století fyziologie a farmakologie nebo později biochemie a molekulární biologie. Přispěly k tomu i zcela nově konstituované obory (genetika, imunologie) nebo po objasnění humánního genomu znalosti, které iniciovaly nástup oborů jako jsou genomika, proteomika, metabolomika a další. Přinesly spolu s rozvojem počítačové techniky a softwarového vybavení nebývalé možnosti na poli vývoje nových, biologicky aktivních látek a je nutné poznamenat, že jen velice zřídka a pouze v málo případech, též nových léčiv, které úspěšně prošly vývojem na cestě do terapeutické praxe. V posledních desetiletích jsou požadavky na objasnění mechanismu účinku léčiva na molekulární úrovni naprostou samozřejmostí u každého nově zaváděného léčiva. Poznání mechanismu účinku se tedy výrazně přesunuje z úrovně celého organismu, orgánů resp. jednotlivých tkání až na molekulární úroveň. Další trendy výzkumu posunující původní léčivo na „biologičtější“ úroveň vyplývají z výsledků medicíny založené na důkazech (evidence based medicine). Tyto tendence vedou k rychle se měnícímu poměru klasických chemických léčiv, plně strukturálně charakterizovaných a v současnosti vyvíjených k léčivům, jejichž chemická struktura není v řadě případů známa a už vůbec ne plně charakterizována. Vývoj si vyžádal rozdělení terapeutik na farmaceutika a biofarmaceutika (v angl. pharmaceuticals a biopharmaceuticals). Určitým projevem tohoto trendu je dnes již několik specializovaných časopisů, např. Biomacromolecules, Biotechnology Progress, Bioconjugate Chemistry, Biopharmaceuticals. Nové rychle se měnící poznatky byly důvodem k napsání i tohoto článku, jehož

základ tvořila přednáška autora na 34. konferenci Syntéza a analýza léčiv v Brně (září 2005)² a k jehož napsání byl vyzván.

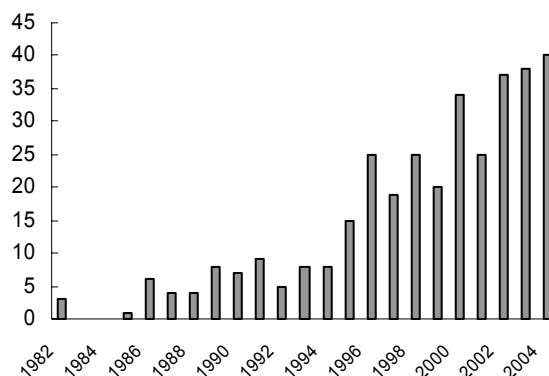
2. Rozdělení biofarmaceutik

Biofarmaceutika jsou léčiva nebo potenciální léčiva získaná jinou, než klasickou cestou syntetické chemie, včetně kombinatorní chemie, případně léčiv původně získaných izolací z rostlinného (biologického) materiálu. Biofarmaceutika představují tedy léčiva, jejichž příprava má základ v rekombinantní technologii, je původu genetického nebo jsou to vakcíny tvořené např. i štěpy membrán, léčiva typu monoklonálních protilátek, ale i klasická léčiva navázaná na polymery nebo léčiva navázaná na polymery a monoklonální protilátky, léčiva peptidického původu s příslušnou řídicí informací, léčiva navázaná na proteiny i léčiva, která mají složku pro aktivní transport do cílového místa účinku (receptor mediated targeting) a zřejmě i mnohá další, jejichž vývoj již probíhá a jsou v různých fázích klinického studia.

Je pravděpodobné, že biofarmaceutika a farmaceutika by asi bylo nejsnáze rozdělit podle způsobu výroby. Například látka vyrobená na principu rekombinantní techniky patří jednoznačně do skupiny biofarmaceutik. Jedná se většinou o rozdělení na bázi nových biotechnologií, které nepochybně již sehrávají významnou roli na trhu léčiv a budou v nejbližších letech zcela dominovat. Ovšem již dnes tento přístup rozdělení značně pokulhává za skutečností, neboť jsou v různých fázích klinického studia jednak „biofarmaceutické konjugáty“, kde se jedná o biotechnologicky vyvinuté preparáty, ale též léčiva, která představují až „trojkombinaci“, dokonce často hraničící se specializovanou oblastí technologie lékové formy. Příkladem může být monoklonální protilátka, navázaná (i kovalentně) na biologický nebo nebiologický makromolekulární nosič, případně na nanočástici, obsahující malou molekulu některého léčiva, připraveného „klasickou“ syntetickou chemií. Z těchto důvodů by pravděpodobně bylo výhodné rozdělení z hlediska molekulové hmotnosti, i když toto rozdělení není pochopitelně optimální. Problémy s rozdělením léčiv a tím i příslušným zařazením, včetně legislativního, se někdy obcházejí z opačné strany a to označením „klasických“, strukturálně jasně charakterizovaných léčiv nepolymerních, nebiologických, názvem malé molekuly (small molecules), které ostatně jsou stále velmi žádané a jejichž vývoj se z různých důvodů, které nejsou tématem ani cílem tohoto článku, zpomaluje. Od r. 1987, kdy bylo zavedeno asi 63 nových léčiv, tento počet prakticky neustále klesal až na 25 nových léčiv v r. 2004, zavedených do praxe, přičemž tento trend nadále pokračuje. Ve výčtu nových léčiv jsou samozřejmě zahrnuta farmaceutika i biofarmaceutika.

Složení a původ léčiv vytvořilo paradoxně určité vakuum, vyplývající z přechodu výzkumu a vývoje léčiv na méně podmínky.

Z uvedených důvodů a rychlého nárůstu léčiv, event.

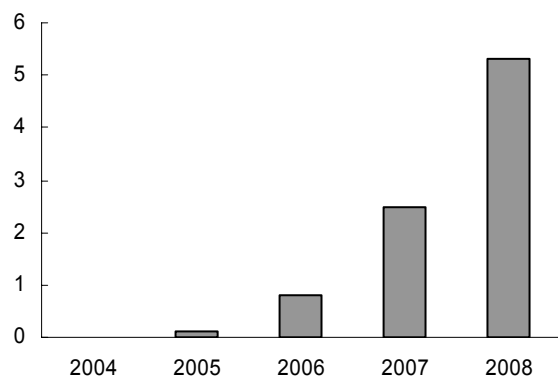


Obr. 1. Počet biofarmaceutik na trhu 1982–2004 (cit.³)

potenciálních léčiv v oblasti biofarmaceutik (obr. 1), včetně neúplné legislativy, která doprovází jejich výzkum, vývoj, realizaci a zvláště standardizaci podle příslušných (lékopisných) norem a při obtížích s jejich zařazením i definováním, je možné pracovní rozdělit biofarmaceutika následujícím způsobem:

- monoklonální protilátky,
- vakcíny,
- proteiny, včetně peptidických hormonů,
- enzymy jako léčiva,
- kombinace biofarmaceutik s jinými látkami a technologickými úpravami,
- různá jiná biofarmaceutika nezařaditelná přímo do předcházejících skupin.

Toto rozdělení pochopitelně není a nemůže být definitivní. Je pouze návrhem autora této práce. Rozdělení bude zřejmě průběžně doplňováno a měněno rychlostí, jakou se mění současná skladba vyvíjených a do praxe zaváděných biofarmaceutik. Dosud (v r. 2005) je v praxi zavedeno asi 150 biofarmaceutik. Do tohoto počtu nejsou však započítány dříve zavedené peptidické hormony a naopak je zde běžně zařazován insulin. Navíc se nejedná o zcela originální léčiva, ale v řadě případů o blízké analogy dříve zavedených léčiv nebo dokonce o léčiva, odlišující se pouze lékovou formou, způsobem použití i indikací. Seznam prodávaných preparátů obsahujících biofarmaceutika je naproti tomu již dnes nesmírně obsáhlý. Jedná se však jen o výrobky s jinými chráněnými názvy a vyrobené jinými firmami po skončení jejich patentové ochrany nebo nepříliš velké strukturální změny dlouho známých a používaných látek. I tento počet biofarmaceutik je závislý na definici biofarmaceutik, uznávanou zejména v USA. Z tohoto pohledu je zajímavější obr. 2, který ukazuje předpokládaný vývoj na trhu biofarmaceutik v nejbližších letech⁴. V roce 2004 byl vedoucím preparátem erythropoietin firmy Amgen/J&J a Sankyo (Epoetin α), s prodejem za 6,2 mil \$, následovaný insulinem firmy Novo Nordisk s 2,4 mil \$, interferonem α (Intron A®, Schering-Plough) s 1,17 mil \$



Obr. 2. Předpokládaný vývoj světového trhu v mld USD v letech 2004–2008

a filgrastimem (Neupogen®, Amgen) s přibližně stejným prodejem (1,175 mil \$). Biofarmaceutický průmysl dosahuje v USA každoročního nárůstu asi 19 %, přičemž příjem vzrůstá o 21,4 %. Celkový obrat na trhu s biofarmaceutikou je více než 9 mld \$, z toho Genentech, první firma, která začala v r. 1982 vyvíjet biofarmaceutika, 1 mld \$. Není pochyb, že koncem 90. let zveřejněné předpoklady nárůstu biofarmaceutik v prvních deseti letech tohoto tisíciletí a jejich asi 25% zastoupení mezi léčivy je reálné. Přitom nedochází v žádném případě ke snižování tradiční role chemie ve výzkumu léčiv, ale pouze k přeměně na efektivní symbiózu biologie a chemie v laboratoři, a to zvláště při formulování léčiv budoucnosti.

2.1. Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky (MnP) představují vcelku dobře konstituovanou skupinu biofarmaceutik. Jsou to potenciální léčiva anebo již v praxi používaná, známá pod různými, našemu jazyku často nepřilíš vyhovujícími názvy, s koncovkou *mab*. V této skupině je však již zaveden poměrně dobrý nomenklaturní systém, který ve zkrácené podobě je následující:

- koncovka *-mab* je používána pro monoklonální protilátky a jejich fragmenty
- označení a identifikace monoklonálních protilátek podle původu je zabezpečena vsunutím příslušného písmene:
 - o myší (*omab*)
 - a potkaní (*amab*)
 - e křeččí (*emab*)
 - i z primátů (*imab*)
 - u humánní (*umab*)
 - xi chimerní (*ximab*)

Další vsuvky jsou do konečného názvu vkládány podle místa zásahu:

- vir- virální

- bac- bakteriální
- lim- imunitní
- les- infekční lese
- cir- kardiovaskulární

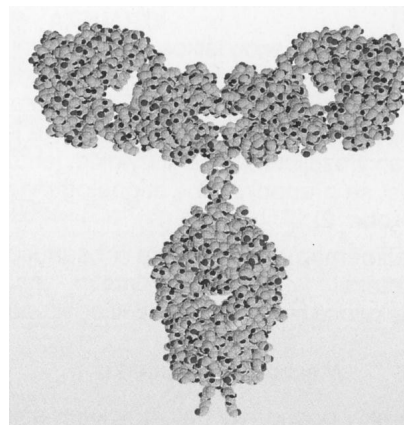
Upřesnění podle místa zásahu je rozpracováno dále u nádorů:

- col kolonu
- mel melanomu
- mar prsní mléčné žlázy
- got testes
- gov ovarií
- pr(o) prostaty
- tum u různých nádorů

Příkladem vytvoření názvu je *ab-cir-xi-mab* (*abciximab*), *lim-zu-mab* (*daclizumab*). Uvedená nomenklatura je jen orientačním a informačním nástrojem⁵.

Přehled některých do praxe zavedených léčiv a léčiv, která jsou v různých fázích klinického studia:

- *adalimumab* (*Humira®*) – lidská MnP proti TNF- α , pro léčbu reumatoidní artritidy (obr. 3),
- *alizumab* – humánní MnP interleukin-6 receptoru, podobně *elsilimomab*,
- *bevacizumab* (*Avastin®*) – humánní MnP receptorů cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR-1 a VGFR-2), inhibující růst nádorů (rectum, colon), zejména používaná v kombinaci s 5-fluorouracilem u metastatických nádorů, nádorů prostaty, prsu. *Bevacizumab* byl vyvinut ze skupiny asi 100 látek, které jsou (od r. 2005) ve vývoji protinádorových léčiv⁶,
- *catumaxomab* (*Removab®*) – chimerní MnP s předpokladem indukce lýzi nádorových buněk,
- *daclizumab* – léčivo mnohočetné sklerózy,
- *ertumaxomab* (*Rexomon®*) – třífunkční MnP zkoumaná jako léčivo metastazujících nádorů prsu,
- *ifliximab* – MnP TNF- α používaná při poškozeních srdce,
- *libivirumab/exbivirumab* – dvě humánní MnP určené pro léčbu hepatitidy B, a humánní MnP pro léčbu hepatitidy C označené prozatím *Ab65* a *Ab68*,



Obr. 3. Molekula *adalimumabu*, biofarmaceutika, používaného v praxi i v ČR při léčbě reumatoidní artritidy

- *natalizumab* (Tysabri®) – humánní monoklonální protilátka určená pro léčbu sklerózy multiplex a to mechanismem závislým na inhibici adheze molekul na povrch imunitních buněk. Působí preventivně před migrací těchto buněk z krevního řečiště do mozku,
- *omalizumab* – MnP s předpokladem použití jako léčiva různě perzistujícího alergického astma,
- *panitumumab* – MnP s účinkem proti receptoru epidermálního růstového faktoru, zkoušen u pacientů s kolorektálním metastatickým karcinomem, u kterého standardní terapie selhává,
- *pexelizumab* – humánní MnP, potenciální léčivo infarktu myokardu a postoperačních stavů srdce,
- *ranibizumab* (Rituxan®) – MnP zkoušená na léčbu makulární degenerace,
- *rituximab* – humánní MnP imunoglobulinu G 1 pro léčbu ne-Hodgkinových lymfomů. Váže se na CD20 antigen receptoru na normálních i maligních B buňkách. Rozrušuje B-buňky, ale z kmenových B-buněk se regenerují po předcházející léčbě zdravé B-buňky a vracejí se po několika měsících k normálnímu životu. Poslední zprávy upozorňují na možnost použití u reumatoidní artritidy⁶,
- *tocilizumab* – lidská monoklonální protilátka proti IL-6 pro léčbu Castlemanovy nemoci, reumatoidní artritidy a pravděpodobně dalších nemocí,
- *volociximab*, *fontolizumab* – monoklonální protilátky zkoumané v řadě dalších indikací,
- Valortim® (MDX-1303) humánní MnP vyvíjená jako antraxový protektivní antigen, i jako protilátka pro případné teroristické útoky (bioterrorismus),
- MnP TRX-4 je zkoumána jako léčivo diabetu typu 1 v případech, kdy dochází k snížení vylučování insulínu při ztrátě funkce β -buněk pankreatu,
- Tarvacin® – chimerní MnP vážící se na fosfolipidický fosfatidylserin buněk infikovaných viry. Původně byla vyvinutá na léčbu hemoragických nemocí, resultujících při Ebolě, Marburgově viróze. Je účinná proti cytomegaloviru, viru hepatitidy B a C, chřipce a SARS. Působí údajně proti šesti různým rodinám virů. Váže se též na cévy nádorů a inhibuje jejich růst. Mezi další potenciální léčiva nádorů nebo již léčiva zavedená do praxe lze zařadit SC-101, látku zkoumanou pro léčbu nádorů mechanismem indukce smrti nádorových buněk, inhibici růstu nádorů a to údajně nádorů různých typů⁷,
- *catumaxomab*, (Removab®) – MnP specifická pro adhezi epitheliálních buněk u solidních tumorů, kde stimuluje jejich lýzu,
- *ertumaxomab* (Rexomun®) – MnP zkoumaná pro léčbu metastatických prsních karcinomů
- IGN-311 je humánní MnP destrující nádorové buňky aktivací funkce efektorů a selektivně ovlivňující růst nádorů cestou funkčních receptorů,
- *ticilimumab* (CP-675206) – humánní MnP, s předpokládanou léčbou melanomu.

Dnes jsou komerčně dostupné monoklonální protilátky pro protinádorovou léčbu:

- *adecatumumab* (Canvaxin®)
- *alemtuzumab* (Campath®)
- *ibritumomab* (Zevalin®)
- *gemtuzumab* (Mylotarg®)
- *rituximab* (Rituxan®), v kombinaci s talabostatem léčba chronické lymfocytární leukemie
- *trastuzumab* (Herceptin®), s pozitivními výsledky u nádorů prsu
- *mapatumumab* (HGS-ETR1) je humánní MnP specificky se vážící na protein TRAIL receptor 1. Prozatím je ve II. fázi klinického zkoušení s indikací kolorektálních nádorů, nádorů plic, ne-Hodgkinových lymfomů. Údajně je velmi dobře snášena. Podává se intravenózně po dobu 21 dní v dávkách 10 mg kg⁻¹ (cit.⁷).
- Mycograb® je kombinovaný přípravek v kombinaci s docetaxelem, určený pro léčbu metastatických a opakujících se nádorů prsu.
Ve vývoji jsou specifické rakovinné humánní protilátky s přesným místem určení. Pochopitelně, že zde není výčet všech monoklonálních protilátek, které jsou v různém stadiu klinického výzkumu a nebo již zavedeny do praxe. Rychlost, s jakou se objevují nové MnP a navíc s účinností většinou ne zcela upřesněnou, je v současnosti velmi vysoká.

2.2. V a k c í n y

Vakcíny nového typu se značně odlišují od původních, které nebyvalým způsobem zasáhly do zdravotního stavu obyvatelstva země a v řadě případů téměř eliminovaly některé nebezpečné choroby. Patří sem např. v r. 1798 zavedené očkování proti pravým neštovicím, v r. 1885 proti vzteklině, v r. 1927 proti tetanu, v r. 1964 proti spalničkám, dále proti obrně a řadě dalších, život a zdraví obyvatelstva planety ohrožujících nemocí. Jednalo se většinou o buněčné vakcíny s usmrcenými patogeny nebo oslabenými patogeny (bakterií, virů). Dnes jsou vyvíjeny vakcíny poněkud jiného typu:

- nebuněčné a podjednotkové vakcíny (např. samotné antigenní struktury membrán, proteinů, prázdných virových částic bez DNA, RNA apod.),
- rekombinantní vakcíny – antigen vytvořený ve velkém množství v tzv. GRAS (Generally Recognized As Safe) organismech, např. proti hepatitidě B,
- syntetické sacharidové vakcíny (glykoproteiny a polysacharidy),
- DNA vakcíny (expresi zprostředkuje buňka organismu a vyrábí si sama vakcínu po vpravení DNA prostřednictvím liposomů nebo virů tj. vakcíny založené na plasmidové DNA technologii).

Ani tento výčet není kompletní. Nebylo to též účelem tohoto sdělení. Všechny vakcíny a tedy i nové, jsou kate-

gorizovány a uváděny pod příslušným kódem.

Novým trendem v problematice vakcín jsou tzv. terapeutické vakcíny: Patří sem např. takové, které zpomalují průběh chorob, stimulují odpověď imunitního systému proti sobě samému. Imunitní systém je vyzbrojován pro boj s již propuknutou nemocí. Jsou též konstruované vakcíny na základě celých rakovinných buněk, např. Melacine®, lyofilizovaný lysát z dvou melanomových linií buněk. Dále sem patří vakcíny vytvořené na základě dendritických buněk antigenů z nádorových buněk nebo proteiny tepelného šoku (HSP) 70 a 90, intracelulární chaperony, jako peptidy s širokým antigenním repertoárem, indukujícím antitumorovou imunitu při stresových situacích. Potenciálním protinádorovým léčivem je i vakcína VX-001, obsahující dosud neobjasněný peptid hTERT572Y.

Vakcínou může být i komplex proteinů tepelného šoku GP96 (HSPPC-96, Oncophage®), který je vyvíjen jako léčivo různých nádorů, včetně melanomu, plicního, kolorektálního, renálního, pankreatického i nádorů ne-Hodgkinového lymfomu.

K nejnovějším směrům výzkumu na tomto poli patří návrhy a studium imunizace konstrukcí transgenních organismů s možností imunizace obyvatelstva pouhou konzumací plodin nebo živočišných produktů⁸.

Je nepochybné, že i vakcíny patří zařazením mezi biofarmaceutika, i když o jejich chemické struktuře nejsou většinou kompletní informace, snad jen s výjimkou molekulové hmotnosti. O jejich specifikaci, nomenklatuře, pravidlech zařazení se prozatím diskutuje na odborných fórech, legislativa je již v USA zabezpečena Food Drug Administration (FDA).

2.3. Proteiny, včetně peptidických hormonů

Do této skupiny je možné zařadit prakticky všechny dosud známé peptidické hormony a jejich obdoby, získané v posledních asi deseti letech většinou rekombinantní technologií.

Jednou z látek s největším zastoupením na trhu léčiv je pochopitelně insulin, v dnešní podobě většinou jako rekombinantní lidský insulin (např. Humulin®), ale i jeho obměny:

- *insulin detemir* – neutrální insulin vázaný na kyselinu myristovou vazbou na lysinu v řetězci B, poloze 29, nahrazující v pozici B30 threonin. Tento insulin má prodloužený účinek⁹,
- *insulin glargin* – rekombinantní insulin s přidáním řetězce se dvěma molekulami argininu v terminální poloze,
- *insulin glulisin* – rekombinantní insulin se zaměněným lysinem v B26-B30 za kyselinu glutamovou.

Do této skupiny, ve které jsou opět zařazena jen některá léčiva, která jsou biofarmaceutiky, náleží i nové peptidy, např. adrenomedullin – vasodilatační peptid s antioxidačním účinkem, protektivně působící proti vysokému krevnímu tlaku, ischemiím i stárnutí a dalším stavům, kde oxidační stres sehrává důležitou roli a s předpokládaným

mechanismem účinku na inhibici produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku.

Zvláště jsou zastoupeny analogy somatostatinu, např. pasireotid (SOM-230), u kterého se předpokládá využití při nádorové léčbě s proliferací endoteliálních buněk a vysokými hladinami somatostatinových receptorů.

Dalšími peptidy ve stadiu vývoje jsou např. anti-diabetické peptidy, které jsou schopny zastavit autoimunní destrukci pankreatických β -buněk u diabetes mellitus typu 1. Látka s těmito účinky je prozatím označena NBI-6024. Jedná se o peptid s 15 aminokyselinami v molekule⁷, nebo MBP-8298 se 17 aminokyselinami, který je ve 3. fázi klinického studia jako potenciální léčivo mnohočetné sklerózy. Pochopitelně, že těchto, zvláště kratších peptidů, je v různých stádiích klinického výzkumu celá řada.

Mycograb® je kombinovaný přípravek s docetaxelem určený pro léčbu metastazujících a opakujících se nádorů prsu. Je monoklonální protilátkou, navázanou na HSP-90 (protein tepelného šoku). Je také potenciálním léčivem invazivních kandidóz.

Mezi peptidové faktory GIT tzv. inkretiny patří *li-raglutid* – acylovaný derivát fragmentu GLP-1 (glukagon-like peptides) stimulující sekreci insulinu nebo *exenatid* strukturálně podobný GLP-1, izolovaný z ještěrky *Heloderma suspectum*, *nesiritid* – rekombinantní lidský natriuretický peptid typu B, uplatňující se v regulaci kardiovaskulární homeostázy u stavů s tlakovým a objemovým přetížením srdce.

Biofarmaceutiky jsou i různé antikoagulační látky. Patří sem přímé deriváty heparinu (mukopolysacharidy), syntetické polysacharidy: *idraparinux* – nepřímý selektivní inhibitor faktoru Xa, antitrombotická látka, používaná preventivně při cévních tromboembolických příhodách a dále *fondaparinux* anebo hirudin, polypeptid, který ovlivňuje, podobně jako jeho analoga, na určitých místech koagulační kaskádu.

Mezi proteiny jako potenciální léčiva a to většinou ze skupiny inhibitorů NS3 a NS5 serinových proteas, je možné zařadit látky působící proti replikaci viru hepatitidy C (HCV). Těchto peptidů je dnes ve stadiu pokročilých vývojových fází několik desítek, dosud pod označením firmy a čísla např. SCH-6 (Schering-Plough)⁷, modifikovaný nízkomolekulární peptid, inhibující výše zmíněnou NS3 serinovou proteasu.

2.4. Enzymy jako léčiva

I když bychom měli zařadit enzymy do skupiny proteinů, je pravděpodobně přehlednější je ve skupině biofarmaceutik uvádět samostatně. Mohou být rozděleny na enzymy „metabolické“ určené pro tzv. „enzyme replacement therapy“, kde jde o náhradu enzymů, chybějících z důvodů dědičné metabolické poruchy, např. srážecí faktory při léčbě hemofilie a enzymy s akutním terapeutickým použitím, jako jsou přípravky snižující krevní srážlivost při akutním infarktu myokardu a další se specifickými funkcemi v organismu, jakými mohou být antioxidační enzymy (superoxiddismutasa, katalasa, glutathionredukta-

sa a další), které byly již jako samostatná léčiva terapeuticky využívány nebo enzymy, na jejichž využití se zvláště v modifikované formě čeká. Zřetelné snahy o zavedení do praxe jsou patrné u enzymů ovlivňujících vývoj diabetu a produkci insulinu. Celá řada enzymů se stala pro léčbu infarktu myokardu a dalších vážných cévních onemocnění jedněmi z nejdůležitějších a život zachraňujících léčiv. Patří k nim:

- *alteplasa* – rekombinantní technikou připravený lidský aktivátor tkáňového plazminogenu,
- *tenekteplasa* – upravená molekula lidského tkáňového aktivátoru plazminogenu (*alteplasy*), produkovaná rekombinantní technologií se specifickým účinkem: aktivace plazminogenu při trombolytické léčbě infarktu myokardu,
- *saruplasy* – varianta urokinasy,
- *stafylokinasa* – rekombinantní aktivátor plazminogenu ze *Staphylococcus aureus*.

Mezi další příklady enzymů náleží *streptokinasa*, *reteplasa*, *anistreplasa*, *urokinasa* a dále *agalsidasa-β*, enzym pro terapii Fabryovy nemoci, *alglukosidasa-a* (*Myozyme®*) při léčbě Pompeovy nemoci a další jako *amediplasa*, hybrid plasminogenního aktivátoru, používána při léčbě infarktu myokardu s nízkou imunogenní aktivitou, zvláště porovnáním se streptokinásou, urokinásou a dalšími preparáty, které mají nízkou fibrinovou specifitu.

2.5. Kombinace biofarmaceutik s jinými látkami a technologickými úpravami

2.5.1. Kombinace uvedených biofarmaceutik s nosiči polymerního charakteru

Do praxe jsou rychle zaváděna léčiva jak peptidického charakteru (např. interferony), tak i jiná léčiva, s výhodnější dostupností a s prodlouženými dávkovými intervaly. Jednu skupinu tvoří léčiva, kde účinná látka je navázána na polymer, např. polyethylenglykol. Patří sem pegylované interferony: INF 2a, 2b (léčiva *Pegasys®*, *Pegintron®*), zavedené do klinického výzkumu (v r. 2003, III. fáze) a do praxe v 2004–2005. Jsou určeny pro léčbu hepatitidy C v kombinaci s ribavirinem nebo jeho proléčivem viramidinem a nověji i pro léčbu hepatitidy B v kombinaci s lamivudinem⁷.

V praxi je již i pegylovaný lyposomální doxorubicin (*Caelyx®*), léčivo ovariálního karcinomu, zkoušené dále u nádorů prsu a v řadě jiných indikací⁷. Vyvíjeny jsou i jiné kombinace, např. albumin-INF- α v kombinaci s ribavirinem pro léčbu hepatitidy C a jiná léčiva, dříve používaná v různých indikacích, dnes navrhovaná v pegylované formě.

2.5.2. Kombinace monoklonálních protilátek s „klasickými“ nízkomolekulárními léčivy nebo toxiny

Navázání nízkomolekulárního léčiva na monoklonální protilátku je již poměrně staršího data. Experimenty probí-

hají více jak 20 let, s cílem dosažení cílového místa účinku použitého léčiva. Nověji jsou uváděny pokusy o vytvoření konjugátů monoklonální protilátky s nízkomolekulárními toxiny, s cíleným zásahem u pacientů s nemocemi ohrožujícími život. Patří sem např. *Mylotarg® gemtuzumab*, imunitoxin vázající se na CD33 antigen a konjugovaný s antibiotikem calicheamicinem a nebo s pilokarpinem, určený pro léčbu myeloidní leukemie nebo *Bexxar®*, *tositumomab* a I^{131} , kombinace připravovaná pro léčbu ne-Hodgkinového lymfomu s minimálním ohrožením sousedních buněk při ozařování.

2.5.3. Kombinace „klasických“ léčiv navázaných na polymerní nosiče a monoklonální protilátky

Do této skupiny je možné zařadit léčiva tvořená opět „klasickým“ nízkomolekulárním léčivem, navázaným na polymerní nosič nebo „trojkombinací“, kde je léčivo navázáno na polymerní nosič a monoklonální protilátku. Příkladem mohou být přípravky, u kterých je např. doxorubicin navázán na hydroxypropyl metakrylát a na odpovídající MnP (cit.^{10,11}). Dále je možné sem zařadit kombinace s fotosenzitizátory diagnostickými, kromě jiného, přesně cílové místo zásahu a koncentraci léčiva v určité subbuněčné části, buňce nebo tkáni. V některých případech buňku označí, v některých umožní přímou reakci v místě zásahu. Dnes je též známých asi 400 signálních molekul, které mohou specifikovat některé komunikační cesty mezi buňkami a v kombinaci s MnP nebo cytokiny zabezpečit mnohem účinnější terapii, zejména nádorů,

2.6. Různá biofarmaceutika

Do této skupiny je snad možné zařadit bioléčiva, která se do jisté míry předchozímu rozdělení vymykají. U některých přípravků bude jejich zařazení v budoucnosti pravděpodobně jednoduché. Vytvoří zřejmě další samostatnou skupinu biofarmaceutik. Např. návrh léčiva složeného ze sekvencí DNA, jakým je Gendicin, rekombinantní humánní adenovír, který obsahuje DNA sekvence antionkogenu p53, geneticky zabezpečující vzestup proteinu p53 a vedoucí ke zpomalení nádorového růstu a k apoptóze. Kam zařadit budoucí léčiva tvořená nanotubuly, nasměrovanými do nádoru, ve kterém koncentrují např. blízké IČ záření a teplem poškozují cíleně rakovinné buňky resp. je usmrctují? Blízká IČ oblast, kdy lidská tkáň a biologické tekutiny jsou částečně prostupné pro tuto emisi záření, se zdá být pro uvedené indikace velmi zajímavá. V biokonjugátu a např. reakci v nanočástici, může dojít k rychlé absorpci záření a k ovlivnění sousedních buněk. Použití těchto teplo-senzitivních nosičů k současné regionální hypertermii je jedním z progresivních postupů léčby nádorů budoucnosti.

Dalšími biofarmaceutiky jsou nebo budou po zavedení do praxe perorální bakteriální imunomodulátory s pravděpodobným mechanismem účinku, souvisejícím se stimulací tzv. PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patermal) prostřednictvím TLRs (Toll-Like Receptors). Jedná se

o lipopolysacharidy, manany, glukany, bakteriální DNA a další. Vyvolávají nespecifickou aktivaci imunitního systému, přeměňující se ve specifickou imunitní odpověď.

Novým přístupem k léčbě nádorů by mohl být preparát PHP (pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene), který je zkoušen pro léčbu melanomu a nádorů ledvin. Kromě jiného je scavengerem oxidu dusnatého. Mezi biofarmaceutika je potřebné zařadit i deriváty kyseliny hyaluronové, které se kromě jiného používají na léčbu osteoartrózy (hylanstan, Synvisc®, hylan G-F20)⁷.

3. Závěr

Biofarmaceutika se stávají již v současnosti důležitou součástí farmakoterapie a nepochybně jejich počet, jako léčiv zaváděných do praxe, bude nadále rychle narůstat. Svědčí o tom nejen ekonomická stránka této oblasti, ale i určité úspěchy při léčbě nemocí, které jsou dodnes považovány za obtížně zvládnutelné nebo dosud nezvládnutelné. Biofarmaceutika – bioléčiva se stanou v příštích 20–30 letech reprezentativní a významnou skupinou biologicky aktivních látek, které svou nekonečnou variabilitou umožní specifikovat místo zásahu v organismu i procesy, které se na určitém místě nebo v celém organismu odehrávají. Reálný přístup k sledování této problematiky si pravděpodobně vyžádá i vytvoření samostatné výukové disciplíny, kterou by se mohla stát *biofarmaceutika* nebo *biofarmaceutická chemie*. Přes tyto změny prozatím nejsou a ještě dlouho nebudou biofarmaceutika plnohodnotnou náhradou dosud používaných „klasických“ syntetických léčiv – farmaceutik (malých molekul), které budou, vzhledem ke své většinou nenáročné přípravě a někdy i vysoké specifitě, v terapii nepostradatelné. Výběr biofarmaceutik a informací se dotýká jen určitého omezeného spektra látek, které lze za biofarmaceutika považovat. Posloužily k určité specifikaci a nepředstavují ani kompletní výčet těch, jejichž uplatnění v terapii dnes již existuje nebo bude v nejbližší budoucnosti reálné.

Diskuse, která proběhla na stránkách Chemických listů¹² na téma pojmů „biofarmacie“ a „biofarmaceutika“ nemohla být v tomto přehledu již zohledněna. Práce představuje výtah z přednášky autora² a snaží se ukázat na některé směry ve výzkumu a realizaci léčiv, které žádná diskuse nemůže zastavit. Na přímé vybitnutí recenzenta se příkláním k použití termínu „biofarmaceutika“ nebo „bioléčiva“ tam, kde nejde jen o „malá léčiva“ a navrhuji další případné podskupiny např. „bioléčiva-terapeutické MnP“, „bioléčiva-terapeutické enzymy“, „bioléčiva-

terapeutické peptidy“ nebo „bioléčiva kombinovaná“. Vakcíny jsou a budou léčivy a preventivními léčivy – bioléčivy i nadále bez tohoto označení.

LITERATURA

1. Burger A., v knize: *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. J. Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore 1995.
2. Beneš L.: Abstr. 34. Konference Syntéza a analýzy léčiv Brno, s. 11 (2005).
3. Mulin R.: Chem. Eng. News August 29, 16 (2005).
4. Ainsworth S.: Chem. Eng. News June 6, 21 (2005).
5. <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/13280.html> (2005).
6. <http://www.dailydrugnews.com> (staženo srpen, září 2005).
7. Hroudová M.: *Bioprospect*. 14, 14 (2004).
8. Beneš L., Benešová M.: *Česk. slov. Farm.* 53, 18 (2004).
9. Bogen S.L.: Abstr. MEDI-175, 230th ACS Meet., Aug 28-Sept 1, Washington (2005).
10. Řihová B.: Mezinárodní seminář Biofarmacie a její možnosti v České republice po vstupu do Evropské unie, 21. 4. 2005, Praha.
11. Kopeček J.: *Mol. Pharmac.* 1, 174 (2005).
12. Diskuse: *Chem. Listy* 100, 49 (2006).

L. Beneš (*Institute of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Biopharmaceuticals**

Development of new drugs, originally oriented to their chemical basis, has recently shifted to a more biological sphere. The mechanism of drug activity on the molecular level and simultaneous technical background require a definition of a new drug type – biopharmaceuticals. Biopharmaceuticals have been predominantly prepared by recombinant DNA technologies as opposed to structurally precisely defined pharmaceuticals, predominantly designated as small molecules. This article describes a major paradigm of development of new drugs: therapeutic monoclonal antibodies and their nomenclature, therapeutic enzymes, therapeutic proteins, new types of synthetic recombinant vaccines and combinations of biopharmaceuticals with polymers including new drug technologies like nanotechnologies in drug reformulation form (polymer carrier).

BIOLÉČIVA – JAKÝ JE JEJICH SKUTEČNÝ POTENCIÁL?

ZUZANA CHRASTILOVÁ^{a,b}, MARTINA MACKOVÁ^a, JAN ŠOTOLA^b a VLADIMÍR KRÁL^{a,b}

^a Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, ^b Zentiva a.s. Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10

Došlo 5.12.06, přijato 18.12.06.

Klíčová slova: bioléčiva, biofarmaceutika, terapeutické proteiny, produkce bioléčiv

Obsah

1. Úvod
2. Současný vývoj farmaceutického průmyslu aneb stanou se bioléčiva jeho nezbytnou součástí?
3. Oblasti terapeutického využití bioléčiv
4. Nové technologické přístupy pro produkci bioléčiv
 - 4.1. Produkce v bakteriích
 - 4.2. Produkce v kvasinkách
 - 4.3. Produkce v hmyzích buňkách s použitím bakulovirových vektorů
 - 4.4. Produkce v savčích buňkách
 - 4.5. Produkce v transgenních zvířatech
 - 4.6. Produkce v transgenních rostlinách a rostlinných tkáňových kulturách
5. Cesty zdokonalení terapeutických vlastností bioléčiv
6. „Biosimilars“ – nová generace bioléčiv
7. Závěr

1. Úvod

Bioléčiva neboli biofarmaceutika nesporně zaujímají významné místo mezi prodávanými léčivými. Na rozdíl od klasických nízkomolekulárních léčiv zahrnují bioléčiva molekuly s velkou molekulovou hmotností (protilátky až 150 kDa). Mezi biofarmaceutika patří rozličné peptidy (např. insulin pro léčbu diabetes mellitus), proteiny (např. srážecí faktor VIII pro léčbu hemofilie, interferon β pro léčbu roztroušené sklerózy atd.) i velké molekuly protilátek (např. protilátka proti receptoru CD-20 pro léčbu rakoviny lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu). V některých případech bioléčiva dokonce představují jedinou účinnou terapii. Například dříve neléčitelné nemoci, jako je nanismus nebo neplodnost, mohou být nyní úspěšně léčeny pomocí biofarmaceutik. Terapeutické proteiny navíc mohou být upraveny tak, aby měly optimální farma-

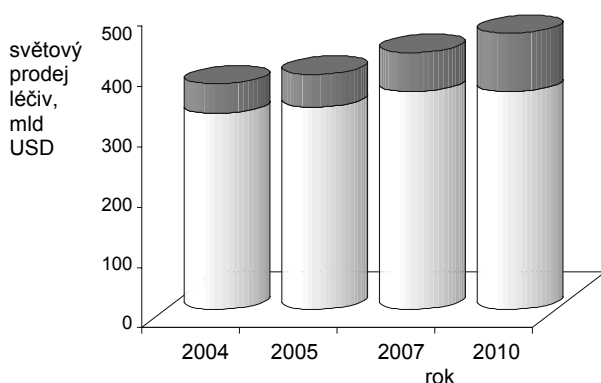
kologické vlastnosti.

V posledních dvaceti letech byl zaznamenán neobyčejný nárůst produkce v biofarmaceutickém průmyslu založeném na vývoji rekombinantní DNA a hybridních technologiích. Rozsah a kvalita proteinů vhodných pro klinické využití byla dříve limitována závislostí na extrakci z přírodních zdrojů. Rekombinantní DNA technologie umožnily masovou produkci širokého spektra přírodních a modifikovaných proteinů. Navíc hybridní technologie zavedly přípravu nové třídy proteinů – monoklonálních protilátek – které poskytují alternativní přístup k léčbě mnoha onemocnění.

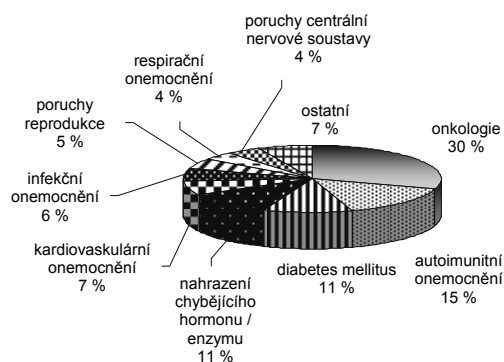
První rekombinantní proteiny nahrazovaly existující proteiny, které byly izolovány z přírodních zdrojů, jako je např. krev nebo hypofýza. Prvním schváleným rekombinantním proteinem byl v roce 1982 insulin. Následoval lidský růstový hormon a srážecí faktor VIII. V některých případech byl výzkum a následná rekombinantní produkce bioléčiv také motivována bezpečností spojenou s izolací požadovaných látek z přírodních zdrojů. V roce 1980 se objevila obava, že růstový hormon izolovaný z lidské hypofýzy může přenášet prionové částice způsobující Creutzfeld-Jacobovu nemoc, což vedlo k přípravě geneticky modifikovaných bakterií *Escherichia coli* produkujících lidský růstový hormon. Rekombinantní technologie také umožnily produkci virových vakcín, např. proti hepatitidě B, aniž by bylo potřeba při výrobě pracovat s nebezpečným virem¹. Významný podíl aplikací je v oblasti terapie rakoviny, další pak zahrnují léčbu imunitních a infekčních onemocnění. Počet schválených produktů stabilně roste. V roce 2000 bylo schváleno 84 biofarmaceutik v Evropě a USA, zatímco v roce 2003 to bylo již 148 (cit.¹). V roce 2006 tento počet narůstá až na 165 schválených bioléčiv².

2. Současný vývoj farmaceutického průmyslu aneb stanou se bioléčiva jeho nezbytnou součástí?

Farmaceutický trh zaznamenává postupné vytěšňování klasických nízkomolekulárních léčiv velkými molekulami bioléčiv. Analýza společnosti Datamonitor ukazuje, že globální prodej bioléčiv v roce 2004 padesáti šesti „top“ farmaceutickými a biotechnologickými firmami dosáhl 56,2 mld USD, což je oproti roku 2003 nárůst o 18,3 %. Z toho 20,2 mld USD zahrnoval prodej šesti klíčových tříd produktů: insulin, lidský růstový faktor, faktor stimulující kolonie (CSF), epoetin, interferon α a interferon β . Zatímco nejprodávanějšími produkty v minulosti byly epoetin a insulin, v budoucnu to budou monoklonální protilátky a terapeutické vakcíny³. Podle analýzy společnosti Datamonitor trh s terapeutickými proteiny nadále poroste.



Obr. 1. Světový prodej bioléciv ve srovnání s prodejem ostatních léčiv⁴; □ světový prodej nízkomolekulárních léčiv, ■ světový prodej bioléciv



Obr. 2. Hlavní oblasti terapeutického využití bioléciv²¹

V roce 2010 by se měl téměř zdvojnásobit a dosáhnout tak 105 mld USD (cit.⁴) (obr. 1).

Monoklonální protilátky představují největší a nejrychleji se rozvíjející skupinu biofarmaceutik, která zahrnuje široké spektrum aplikací (léčbu rakoviny, poruchy imunitního systému a některé infekční nemoci). V roce 1995 monoklonální protilátky představovaly 1 % biofarmaceutického trhu, 14 % v roce 2001 a 22 % v roce 2002. Odhaduje se, že prodej monoklonálních protilátek ročně poroste o 17,2 % do roku 2010 a zvýší se tak z 3,6 mld USD v roce 2002 na 7,9 mld USD v roce 2006 a 12,1 mld USD v roce 2010 (cit.³).

3. Oblasti terapeutického využití bioléciv

Významný podíl aplikací bioléciv je v oblasti rakoviny (např. rakovina lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu, rakovina prsu, rakovina tlustého střeva, leukémie), dále zahrnují léčbu autoimunitních onemocnění (např. roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, Crohnova nemoc, psoriáza), léčbu diabetes mellitus, anémie,

nahrazení chybějícího proteinu (např. lidského růstového hormonu) a další. Hlavní oblasti terapeutického využití jsou shrnuty na obr. 2.

Podstatnou část mezi prodávány biolécivy zahrnuje prodej insulinu, lidského růstového hormonu, erythropoetinu, faktoru stimulujícího kolonie (CSF), interferonu α a interferonu β (cit.⁴). Vedle nich zaujímají důležitou oblast monoklonální protilátky. V tabulce I jsou shrnuty nejčastěji používané terapeutické proteiny a oblasti jejich terapeutického využití.

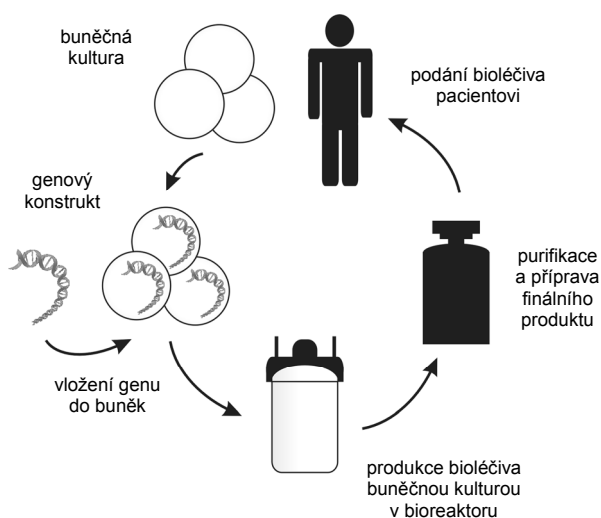
4. Nové technologické přístupy pro produkci bioléciv

Původně byly proteiny s terapeutickým účinkem získávány z přírodních zdrojů, např. srážecí faktory a lidský sérový albumin z lidské krevní plasmy, insulin ze slinivky prasete, lidský růstový hormon z lidské hypofýzy (postmortem) a glukocerebrosidasa z lidské placenty. Jak již bylo zmíněno v úvodu, přírodní zdroje s sebou nesou určitá rizika, jako je přenos prionových částic prostřednic-

Tabulka I

Klíčové produkty na biofarmaceutickém trhu

Produkt	Indikace
Insulin	léčba diabetes mellitus
Lidský růstový hormon	léčba nedostatku růstového hormonu (nanismu)
Erythropoetin	léčba anémie
Kolonie stimulující faktor (CSF)	při léčbě autologních transplantací kostní dřeně, při léčbě toxických stavů leukocytů po chemoterapiích aj.
Interferon α	léčba některých typů leukémie, Kaposiho sarkomu, hepatitidy aj.
Interferon β	léčba roztroušené sklerózy
Monoklonální protilátky	léčba rakoviny, autoimunitních onemocnění, prevence odmítnutí transplantovaných orgánů aj.



Obr. 3. Schéma přípravy bioléciv

tím hypofýzy nebo jiné, např. virové kontaminace. Genové inženýrství kromě zamezení těchto problémů navíc přináší možnosti úpravy proteinů „na míru“ tak, aby byly optimalizovány i jejich farmakologické vlastnosti. Z těchto důvodů se produkce terapeutických proteinů přesunula k rekombinantním expresním systémům. Nejčastěji používanými expresními systémy jsou bakterie, kvasinky, hmyzí buňky, savčí buňky a v poslední době se studuje i možnost využití rostlinných buněk pro expresi proteinů. Schéma přípravy bioléciv je na obr. 3.

Většina terapeutických proteinů jsou glykoproteiny, které pro správnou biologickou aktivitu vyžadují *N*-glykosylace, jež probíhají jako posttranslační modifikace u eukaryot. Mezi různými expresními systémy existují podstatné rozdíly v posttranslačních modifikacích. Např. v bakteriích glykosylace neprobíhá vůbec, proto se nehodí pro produkci glykoproteinů.

4.1. Produkce v bakteriích

Expres rekombinantních proteinů v bakteriálních buňkách (nejčastěji v bakteriích *Escherichia coli*) zpravidla umožňuje získání velkého množství požadovaného produktu. Výhodou bakterií je rychlý růst v poměrně levném médiu, který vede k vysokému výtěžku. Obecné metody produkce v těchto buňkách zahrnují přímou intracelulární expresi, sekreci proteinu do periplasmatického prostoru a expresi fúzních proteinů zajišťujících lokalizaci produktu buď v cytoplasmě, nebo v membráně hostitelské buňky⁵.

Bakterie neumí produkovat proteiny, které vyžadují posttranslační modifikace pro jejich biologickou aktivitu, jako jsou např. glykosylace. Další nevýhodou bakteriální exprese je to, že proteiny jsou často exprimovány ve formě inkluzních tělísek, z kterých se biologicky aktivní protein

získává poměrně obtížně (purifikace zahrnuje denaturaci a renaturaci) a tato cesta je i finančně náročná⁶.

Bakteriální buňky nicméně představují výhodný expresní systém pro proteiny nevyžadující posttranslační modifikace (viz tab. II). V bakteriích *E. coli* je exprimován lidský insulin nebo jeho analogy pro léčbu cukrovky (Humulin[®], Humalog[®], Lantus[®], Exubera[®]), lidský růstový hormon pro léčbu nanismu (Protropin[®], Humatrope[®], Nutropin[®], Norditropin[®], Genotropin[®], Omnitrope[®]), parathyroidní hormon pro léčbu osteoporózy (Forteo[®]), interferon α pro léčbu leukémie a hepatitidy C (Intron A[®], Peg-Intron[®], Pegasys[®]), interferon β pro léčbu roztroušené sklerózy (Betaseron[®]), faktor stimující kolonie granulocytů (G-CSF) používaný při chemoterapiích (Neupogen[®], Neulasta[®]). *E. coli* je také běžně používaným expresním systémem pro produkci fragmentů protilátek⁷.

4.2. Produkce v kvasinkách

Produkce proteinů v kvasinkách nabízí několik výhod. Je to rychlá a jednoduchá produkce s vysokým výtěžkem (který je ale nižší než v bakteriích), nízká cena kultačního média a v neposlední řadě existence posttranslačních modifikací, jako je *N*-glykosylace^{6,8}. Rekombinantní proteiny mohou být produkovány intracelulárně nebo může být upravena sekreční dráha tak, aby byly proteiny sekretovány do média⁶, což značně usnadňuje purifikaci proteinu. Jako kvasinkový expresní systém se zpravidla používá *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris*.

Nevýhodou kvasinek je odlišná glykosylace od savčích buněk, která tak potenciálně může způsobit i nežádoucí imunogenitu produkovaných proteinů. Přítomnost mannosy – specifického cukru kvasinek – limituje využití kvasinkového expresního systému pro produkci proteinů, které *N*-glykosylace nevyžadují⁸.

Kvasinkový expresní systém *Saccharomyces cerevisiae* je používán pro produkci několika terapeutických proteinů (viz tab. II), jako je lidský insulin a jeho analogy pro léčbu cukrovky (Novolin[®], NovoLog[®]), lidský růstový hormon pro léčbu nanismu (Valtropin[®]), faktor stimující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) používaný při chemoterapiích (Leukine[®]) a další.

Inženýrství glykosylace kvasinek *Pichia pastoris* zaznamenalo v poslední době veliký pokrok. U kvasinek *Pichia pastoris* byla docílena eliminace syntézy nežádoucích cukrů během glykosylace a ukázalo se, že kvasinky mohou být upraveny tak, aby jejich glykosylace byly velmi podobné glykosylacím lidských proteinů⁸. Choi a spol.⁹ docílili humanizaci glykanů v kvasinkách *Pichia pastoris* tak, že inaktivovali gen pro α -1,6-mannosyltransferasu a naopak aktivovali gen pro α -1,2-mannosidazu a β -1,2-*N*-acetylglukosaminyltransferasu. Upravená kvasinka *Pichia pastoris* tak poskytuje knihovnu individuálních kmenů k produkci proteinů se specifickými humánními glykoformami s vysokým stupněm homogenity⁸. Např. byl použit panel navržených *Pichia pastoris* k produkci různých glykoforem monoklonální protilátky se stejnou aminokyselinovou sekvencí jako má komerční

Tabulka II
Výběr bioléciv schválených v Evropě a USA

Produkt	Protein	Oblast terapie	Expresní systém	Schváleno v roce	Firma uvádějící produkt na trh
Humulin [®]	lidský insulin	diabetes mellitus	<i>E. coli</i>	1982	Eli Lilly
Protropin [®] (Somatrem)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	1985	Genetech
Intron A [®]	interferon α -2b	některé typy leukémie, Kaposiho sarkom, hepatitída C aj.	<i>E. coli</i>	1986	Schering-Plough
Humatrope [®] (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	1987	Eli Lilly
Epogen [®] (Epoetin- α)	erythropoetin α	anémie	CHO	1989	Amgen
Procrit [®] (Epoetin- α)	erythropoetin α	anémie	CHO	1990	Ortho Biotech / J&J
Novolin [®]	lidský insulin	diabetes mellitus	<i>S. cerevisiae</i>	1991	Novo Nordisk
Neupogen [®] (Filgrastim)	faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF)	neutropenie indukovaná chemoterapií	<i>E. coli</i>	1991	Amgen
Leukine [®] (Sargramostim)	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), jedna mutace	autologní transplantace kostní dřeně, toxické stavy leukocytů po chemoterapiích, chemoterapie aj.	<i>S. cerevisiae</i>	1991	Bertex
Nutropin [®] (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	1993	Genetech
Betaseron [®]	interferon β -1b	roztroušená skleróza	<i>E. coli</i>	1993	Bertex / Chiron
Cerezyme [®] (Imiglucerase)	β -glukocerebrosidasa	Gaucherova choroba typu 1	CHO	1994	Genzyme
ReoPro [®] (Abciximab)	chimerický Fab fragment protilátky proti receptoru fibrinogenu na krevních destičkách	snížení nebezpečí tvorby trombů u pacientů léčených angioplastikou a při koronárních operacích	myší limie Sp2/0	1994	Eli Lilly / Centocor / J&J
Norditropin [®] (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	1995	Novo Nordisk
Genotropin [®] (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	1995	Pfizer/Pharmacia
Humalog [®] (Insulin Lispro)	analóg lidského insulinu	diabetes mellitus	<i>E. coli</i>	1996	Eli Lilly
Avonex [®]	interferon β -1a	roztroušená skleróza	CHO	1996	Biogen Idec
Retavase [®] (Reteplase)	neglykosylovaná mutantní forma lidského tkáňového aktivátoru plasminogenu	trombolýza	<i>E. coli</i>	1996	Centocor / J&J

Tabulka II
Pokračování

Produkt	Protein	Oblast terapie	Expresní systém	Schváleno v roce	Firma uvádějící produkt na trh
Gonal-F [®] (Folliotropin- α)	folliotropin α (folikuly stimulující hormon)	neplodnost	CHO	1997	Serono
BeneFIX [®]	faktor IX	hemofilie	CHO	1997	Genetics Institute / Wyeth Pharmaceuticals
Rituxan [®] (Rituximab)	chimerická protilátka proti receptoru CD20 na B-buňkách	rakovina lymfatického systému (Non-Hodgkin lymfom)	CHO	1997	Genetech / Biogen Idec
Simulect [®] (Basiliximab)	chimerická protilátka proti receptoru IL-2	prevence odmítnutí transplantovaných orgánů	myší linie NS0	1998	Novartis
Synagis [®] (Palivizumab)	humanizovaná protilátka proti fúznímu proteinu RSV (Respiratory Syncytial Virus)	prevence vážných onemocnění nižších dýchacích cest rizikových pediatrických pacientů	myší linie NS0	1998	Medimmune
Remicade [®] (Infliximab)	chimerická protilátka proti TNF α (Tumor Necrosis Factor α)	Chrohnova nemoc, revmatoidní artritida	Myší linie Sp2/0	1998	Centocor / J&J
Hereptin [®] (Trastuzumab)	humanizovaná protilátka proti HER-2 receptoru	rakovina prsu	CHO	1998	Genetech
Enbrel [®] (Etanercept)	vázající doména TNF (Tumor Necrosis Factor) receptoru fúzovaná s Fc fragmentem lidských IgG1	revmatoidní artritida a další autoimunitní nemoci jako psoriasis, spondylitida	CHO	1998	Amgen / Wyeth
Lantus [®] (Insulin glargine)	analog lidského insulínu (sekvence je na 3 místech odlišná od nativního insulínu)	diabetes mellitus 2. typu	<i>E. coli</i>	2000	Aventis
NovoLog [®] (Insulin Aspart)	analog lidského insulínu (mutace aminokyseliny v pozici 28)	diabetes mellitus	<i>S. cerevisiae</i>	2000	Novo Nordisk
ReFacto [®] (Moroctocog- α)	faktor VIII	hemofilie	CHO	1999	Genetics Institute / Wyeth Pharmaceuticals
Mylotarg [®] (Gemtuzumab Ozogamicin)	humanizovaná protilátka proti CD33 konjugovaná s chemoterapeutikem calicheamicinem	akutní myeloidní leukémie	myší linie NS0	2000	Wyeth / Celtech
Peg-Intron [®] (Peginterferon α -2b)	pegylovaný interferon α -2b	hepatitida C	<i>E. coli</i>	2001	Schering-Plough / Enzon
Humira [®] (Adalimumab)	lidská protilátka proti TNF α (Tumor Necrosis Factor α) připravená technikou fúgového displeje	revmatoidní artritida	CHO	2001	Abbot Laboratoires / Cambridge Antibody Technologies

Tabulka II
Pokračování

Produkt	Protein	Oblast terapie	Expresní systém	Schváleno v roce	Firma uvádějící produkt na trh
Forteo [®] (Teriparatide)	parathyroidní hormon	osteoporóza	<i>E. coli</i>	2002	Eli Lilly
Aranesp [®] (Darbepoetin- α)	mutantní erythropoetin	anémie	CHO	2002	Amgen
Neulasta [®] (Pegfilgrastim)	pegylovaný faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF)	neutropenie při chemoterapiích	<i>E. coli</i>	2002	Amgen
Rebif [®]	interferon β -1a	roztroušená skleróza	CHO	2002	Serono / Pfizer
Pegasys [®] (Peginterferon α -2a)	pegylovaný interferon α -2b	hepatitida C	<i>E. coli</i>	2002	Hoffmann-La Roche
Zevalin [®] (Ibritumomab Tiuxetan)	myší protilátka proti CD20 konjugovaná s radioaktivním Y ⁹⁰	rakovina lymfatického systému (Non-Hodgkin lymfom)	CHO	2002	Biogen Idec
Somavert [®] (Pegvisomant)	mutantní somatotropin s aktivitou antagonisty somatotropinu kovalentně vázaný na polyethylenglykol	akromegalie (chorobné zvětšení okrajových částí těla) u pacientů po chirurgických zákrocích, po radioterapii	<i>E. coli</i>	2002	Pfizer/Pharmacia
Xolair [®] (Omalizumab)	humanizovaná protilátka proti lidským IgE	astma	CHO	2003	Genetech / Novartis / Tanox
Bexxar [®] (Tositumomab)	myší protilátka proti CD20 konjugovaná s radioaktivním I ¹³¹	rakovina lymfatického systému (Non-Hodgkin lymfom)	hybridomy	2003	GSK / Corixa
Erbitux [®] (Cetuximab)	chimerická protilátka proti receptoru EGF (Epidermal Growth Factor)	rakovina tlustého střeva	hybridomy	2004	ImClone / Bristol Myers Squibb
Avastin [®] (Bevacizumab)	humanizovaná protilátka proti VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	rakovina tlustého střeva	CHO	2004	Genetech
Exubera [®]	analog lidského insulinu (inhalovatelný)	diabetes mellitus	<i>E. coli</i>	2006	Pfizer / Aventis
Valtropin [®] (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>S. cerevisiae</i>	2006	Biopartners
Omnitrope [®] (Somatropin)	lidský růstový hormon	nedostatek růstového hormonu	<i>E. coli</i>	2006	Sandoz

protilátka Rituxan[®] (proti receptoru CD-20), která se využívá k léčbě rakoviny lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu¹⁰.

4.3. Produkce v hmyzích buňkách s použitím bakulovirových vektorů

Hmyzí buňky patří mezi účinné expresní systémy pro produkci glykoproteinů, zahrnující i monoklonální protilátky⁸.

Bakulovirový expresní systém je eukaryotický, jelikož exprese probíhá v hmyzích buňkách. Hmyzí buňky jsou tedy schopné posttranslačních modifikací, jako jsou glykosylace^{5,8}. Na rozdíl od bakterií, kde zůstávají produkováné proteiny většinou nerozpustné, jsou rekombinantní proteiny produkováné v hmyzích buňkách rozpustné. Další výhodou je velikost virového genomu (~130 kbp), což umožňuje vložení delšího úseku cizorodé DNA (cit.^{5,11}). Kultivace hmyzích buněk není tak drahá jako kultivace savčích buněk. Na rozdíl od savčích buněk hmyzí buňky nevyžadují zvýšený obsah CO₂ v atmosféře a pro jejich kultivaci tedy není zapotřebí drahý CO₂ inkubátor⁵.

Nevýhodou proteinů produkováných v hmyzích buňkách je rozdílný typ glykosylace od glykosylace lidských proteinů. Možnost přítomnosti nehumánní α -1,3-fukosy (zaleží na hmyzím druhu) může zvýšit imunogenitu proteinu. Hmyzí buňky navíc nejsou vhodné pro expresi glykoproteinů, u nichž je požadována dlouhá doba přítomnosti v séru, jelikož *N*-glykany hmyzích buněk jsou rychle eliminovány z organismu⁸.

Příkladem terapeutických proteinů produkováných hmyzími buňkami je erythropoetin¹² nebo různé monoklonální protilátky¹³.

4.4. Produkce v savčích buňkách

Nejčastěji používanou linií savčích buněk pro produkci terapeutických glykoproteinů jsou buněčné linie Chinese Hamster Ovary (CHO). Dále se pak používají myší buňky NS0 a Sp2/0 (cit.¹⁴).

Savčí buňky jsou preferovány z několika hledisek, z nichž nejdůležitější je produkce proteinů s *N*-glykany, které jsou velmi podobné lidským⁸.

Vedle výše uvedených výhod má exprese proteinů v savčích buňkách také řadu nevýhod. Jsou zde kladeny vysoké nároky na sterilitu, jejíž porušení se projeví mnohem výrazněji než při kultivaci mikrobiálních buněk. Růst kontaminace je také podporován složením velmi bohatých médií. Zásadním nedostatkem použití savčích buněk je finanční náročnost spojená s jejich kultivací. Ta je odvozena především od vysoké ceny složek médií a enormní spotřebou sterilního plastového materiálu⁵. Drahá je i následná purifikace terapeutického proteinu. Savčí buňky mohou také přenášet infekční částice, jako jsou viry nebo priony. Nevýhodou je také dlouhá doba potřebná k vytvoření produkční linie a obtížnost kontrolovat odpovídajícím způsobem *N*-glykosylace⁸.

CHO buňky jsou použitelné pro expresi glykoproteinů obsahujících kyselinu sialovou. Nicméně některé proteiny vyžadují glykoformy bez kyseliny sialové. Toho se dá docílit úpravou *in vitro*⁸.

Další problém může představovat přítomnost fukosylovaných glykanových struktur u monoklonálních protilátek produkovaných CHO buňkami. Odstranění fukosy vede ke zlepšení funkce protilátek. To bylo dosaženo některými vědeckými skupinami, jež připravily buněčné linie, které proteiny nefukosylují a produkují protilátky s vyšší ADCC aktivitou (buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách)⁸.

V CHO je produkována řada terapeutických proteinů (viz tab. II), např. srážecí faktor VIII pro léčbu hemofilie (ReFacto[®]), srážecí faktor IX pro léčbu hemofilie (BeneFIX[®]), erythropoetin a jeho analogy pro léčbu anémie (Epogen[®], Procrit[®], Aranesp[®]), interferon β pro léčbu roztroušené sklerózy (Avonex[®], Rebif[®]), tkáňový aktivátor plasminogenu nebo jeho analogy pro léčbu trombolýzy (Retavase[®]), β -glukocerebrosidasa pro léčbu Gaucherovy nemoci (Cerezyme[®]) a řada monoklonálních protilátek, např. pro léčbu rakoviny lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu (Rituxan[®], Zevalin[®]), pro léčbu rakoviny prsu (Herceptin[®]), pro léčbu rakoviny tlustého střeva (Avastin[®]), pro léčbu autoimunitních onemocnění (Enbrel[®], Humira[®], Raptiva[®]) nebo pro zmírnění astmatu (Xolair[®]).

V buňkách myších linií NS0 jsou produkovány např. monoklonální protilátky (viz tab. II) pro prevenci odmítnutí transplantovaných orgánů (Simulect[®]), pro prevenci onemocnění dýchacích cest (Synagis[®]) a pro léčbu akutní myeloidní leukémie (Mylotarg[®]).

V myších buňkách Sp2/0 jsou exprimovány monoklonální protilátky (viz tab. II) pro snížení nebezpečí tvorby trombů (ReoPro[®]) nebo pro léčbu autoimunitních onemocnění (Remicade[®]).

4.5. Produkce v transgenních zvířatech

V poslední době se pozornost obrací k transgenním zvířatům jako alternativním expresním systémům. Některé glykoproteiny, např. monoklonální protilátky, již v těchto systémech byly exprimovány⁸.

Proteiny produkováné transgenními živočichy obsahují více mannosy a glykany s nižším obsahem kyseliny sialové ve srovnání s lidskými glykoproteiny. To může omezit produkci proteinů, u kterých je vyžadována dlouhá doba přítomnosti v séru⁸.

Byla připravena transgenní myš produkující lidské monoklonální protilátky¹⁵. Van Berkel a spol.¹⁶ studovali možnost produkce rekombinantního lidského laktoferrinu v mléce transgenní krávy. Roku 2005 bylo docíleno produkce monoklonálních protilátek v kuřeti a jejich sekrece do vajec¹⁷.

Přes veškeré úspěchy je průmyslová produkce terapeutických proteinů transgenními zvířaty prozatím budoucností.

4.6. Produkce v transgenních rostlinách a rostlinných tkáňových kulturách

Transgenní rostliny pro produkci terapeutických glykoproteinů představují v současnosti důležitou oblast výzkumu. Rostliny jsou jako expresní systémy velkým a slibným potenciálem pro produkci monoklonálních protilátek, ale i dalších glykoproteinů⁸.

Rostliny mohou být kultivovány jako tkáňové kultury na aseptickém agarovém nebo tekutém médiu, jako protoplasty (tzn. bez buněčné stěny) a v neposlední řadě mohou být regenerovány v celou rostlinu, která již může být pěstována i v nesterilní půdě. V závislosti na zvolení signální sekvence lze ovlivnit lokalizaci rekombinantního proteinu. Protein může být asociován s cytoplasmatickou membránou nebo může být sekretován do média. Velkou výhodou rostlinné produkce proteinů jsou velké výtěžky za relativně nízkou cenu¹⁸.

Hlavní limitace rostlin jako expresních systémů je produkce nehumánních glykanových struktur. Rostlinné glykoproteiny postrádají galaktosu a sialovou kyselinu a navíc obsahují imunogenní cukry β -1,2-xylosu a α -1,3-fukosu. Potenciální alergická reakce k těmto cukrům může značně omezit vývoj transgenních rostlin pro produkci terapeutických proteinů. V této souvislosti byly zaznamenány snahy humanizace rostlinných *N*-glykanů. Na rostlinné glykoproteiny se dají enzymově připojit chybějící cukry (tzn. galaktosa a kyselina sialová) a naopak odstranit ty nežádoucí (tzn. β -1,2-xylosa a α -1,3-fukosa)⁸. Strasser a spol.¹⁹ připravili transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* s pozměněnou dráhou glykosylace, přičemž tyto rostliny produkují glykoproteiny blízké lidským – tzn. bez β -1,2-xylosy a α -1,3-fukosy.

Ve 2. fázi klinických testů je protilátka CaroRX (Planet Biotechnology, Kalifornie) produkovaná rostlinami. Jedná se o hybrid monoklonální protilátky, která váže streptokokální antigen I/II, což je hlavní povrchový glykoprotein bakterie *Streptococcus mutans*. *S. mutans* způsobují bakteriální zubní kaz. Zmíněná protilátka brání bakterii, aby se mohla udržet na zubním povrchu².

5. Cesty zdokonalení terapeutických vlastností bioléciv

Kromě rekombinantních verzí přírodních proteinů je také možné připravit proteiny, které jsou upraveny s cílem modifikovat jejich vlastnosti, a to z hlediska jejich terapeutické aktivity. To znamená zvýšit jejich stabilitu, snížit rychlost eliminace látky z organismu (tzv. clearance) apod. Modifikace proteinů zahrnují substituci aminokyselin v proteinech, odstranění určitých domén, úpravu glykosylací a další. Přibližně 50 % schválených bioléciv má modifikovanou genovou sekvenci právě z výše uvedeného hlediska¹.

Existuje několik metod, jak lze upravit primární pro-

teinovou strukturu. Jedná se např. o cílenou mutagenézi pro změnu specifické aminokyseliny proteinu. V případě insulínu bylo vyvinuto několik jeho analogů s pozměněnými aminokyselinovými sekvencemi, které ovlivňují rychlost působení hormonu. Přírodní forma insulínu existuje jako neaktivní hexamer, jenž se pomalu disociuje na aktivní monomer. Humalog[®] a NovoLog[®] jsou rychle působící analogy insulínu se specifickou aminokyselinou na C-konci, které omezují skládání insulínu na neaktivní hexamer. Na druhé straně Lantus[®] je dlouho působící varianta insulínu, která pomalu disociuje z mikrokrytalického precipitátu, což má za následek dlouhotrvající účinek.

Tkáňový aktivátor plasminogenu Retavase[®] je příkladem produktu, kde byla odstraněna celá proteinová doména. Tkáňový aktivátor plasminogenu aktivuje přeměnu plasminogenu na plasmin, který štěpí fibrin, a tím rozpouští trombus (krevní sraženinu). V preparátu Retavase[®] byla odstraněna doména, která zodpovídala za rychlou eliminaci tkáňového aktivátoru, čímž se prodloužil účinek jeho působení.

Dalším příkladem modifikace proteinových charakteristik je fúze genových sekvencí různých proteinů, což má za následek vznik nového proteinu s novými vlastnostmi. Takovým produktem je např. Enbrel[®]. Jedná se o fúzní protein používaný pro léčbu revmatoidní artritidy. Obsahuje vázající doménu TNF (faktor nekrotizující nádory) fúzovanou s Fc fragmentem lidských imunoglobulinů třídy IgG.

Podstatný vliv na různé funkce proteinů, zahrnující aktivitu, dobu působení, rychlost eliminace z organismu a stabilitu, může mít glykosylace. Počet produktů, u nichž glykosylace proteinů byla modifikována s cílem ovlivnit jejich terapeutické vlastnosti, stále roste. Příkladem takového produktu je Aranesp[®] (varianta erythropoetinu pro léčbu anémie) a Cerezyme[®] (β -glukocerebrosidasa pro léčbu Gaucherovy choroby typu I). V současnosti jsou uplatňovány tři přístupy úpravy glykosylací proteinů: 1) úprava glykosylačních míst v proteinu, např. zavedení nového glykosylačního místa; 2) enzymatické modifikace glykanů *in vitro*; 3) genové manipulace s buněčným glykosylačním mechanismem.

Pro omezení proteolytické degradace terapeutických proteinů a snížení rychlosti eliminace z organismu *in vivo* bývá používána metoda pegylace, což je proces, při kterém se na protein naváže polyethylenglykol. Příkladem schválených pegylovaných produktů je Pegasys[®] (léčba hepatitidy C), Peg-Intron[®] (léčba hepatitidy C), Neulasta[®] (léčba neutropenie při chemoterapiích) a Somavert[®] (léčba akromegalie). Vyvíjejí se i další pegylované proteiny, jako jsou např. pegylované fragmenty protilátek.

Dalším příkladem chemických modifikací je navázání radioisotopů nebo cytotoxických léčiv k monoklonálním protilátkám, používaným zejména při léčbě rakoviny. Takovým produktem je Bexxar[®] (léčba rakoviny lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu) – monoklonální protilátka konjugovaná s radioaktivním jodem I¹³¹, Zevalin[®] (léčba rakoviny lymfatického systému – tzv. non-

Hodgkin lymfomu) – monoklonální protilátka konjugovaná s radioaktivním yridiem Y^{90} , a Mylotarg[®] (léčba leukémie) – monoklonální protilátka konjugovaná s chemoterapeutikem calicheamicinem.

6. „Biosimilars“ – nová generace bioléciv

Generické léky jsou ekvivalenty originálních léčivých přípravků, které mohou být uvedeny na trh po expiraci jejich patentové ochrany, obsahují stejnou účinnou látku, odpovídají stejným náročným pravidlům při vývoji, výrobě a posuzování bezpečnosti a mají stejnou kvalitu, bezpečnost a účinnost jako originální značkové léky. Hlavním významem generických ekvivalentů je jejich nižší cena ve srovnání s originálními léčivy, čímž je zvýšena dostupnost těchto moderních léků. Hlavním důvodem nižší ceny je především nižší náročnost na testování těchto léčiv, neboť není třeba opakovat všechny preklinické a klinické zkoušky, ale je možné se odkázat na klinická data originálního produktu.

Vedle generických léčiv se na trhu začínají objevovat tzv. „biosimilars“, které jsou jejich obdobou a vychází ze stejného principu jako generická léčiva. „Biosimilars“ jsou účinná biofarmaceutika představující velké molekuly (protilátky až 150 kDa) se složitou 3D strukturou a k jejich přípravě jsou používány organismy. Často se jedná o heterogenní produkty, které je obtížné kompletně charakterizovat fyzikálně-chemickými analytickými metodami, a z těchto důvodů je i často velmi obtížné deklarovat jejich vždy stejné složení a strukturu. I malá změna při výrobním procesu, např. změna v produkční buněčné linii, může způsobit potenciální variace ve vlastnostech konečného biofarmaceutického produktu. Z tohoto hlediska je asi nejzávažnějším problémem nežádoucí imunogenita, jelikož i velmi malé rozdíly v těchto molekulách mohou způsobit rozdílné reakce organismu^{2,20}. Tím se „biosimilars“ liší od klasických chemických generických léčiv, u kterých není obtížné zajistit identické složení účinné látky, jako má originální produkt. Z výše uvedených hledisek vyplývá, že v současnosti nejde zajistit, aby dva různí výrobci produkovali dvě identická biofarmaceutika, přinejlepším mohou být podobná neboli bioekvivalentní. Jako bioekvivalentní můžeme označit produkty, které mají stejné kvalitativní a kvantitativní složení, tzn. že obsahují stejnou aktivní látku ve stejné farmaceutické formě, která se chová stejně i v pacientově těle (stejná absorpční rychlost, distribuce v těle, odbourávání a exkrece)²⁰.

Do roku 2009 řadě biolécivům expiruje jejich patentová ochrana. Několika schváleným biofarmaceutikům patent již vypršel (např. Nutropin[®] – lidský růstový hormon pro léčbu nanismu, Humulin[®] – insulin pro léčbu diabetes mellitus, Cerezyme[®] – β -glukocerebrosidasa pro léčbu Gaucherovy choroby, Intron A[®] – Interferon α -2b pro léčbu leukémie a hepatitidy C, Epogen[®] – erythropoetin α pro léčbu anémie a další). Někteří analytici předpokládají, že až 75 schválených terapeutických proteinů se

stane cílem generických společností. Prvním „biosimilar“ je léčivo Omnitrope[®] (lidský růstový hormon), které bylo schváleno v roce 2005 v Austrálii a v roce 2006 v Evropě a USA. Omnitrope[®] je obdobou léku Genotropin[®] od firmy Pfizer/Pharmacia, jehož patent již vypršel². Schválení Omnitropu[®] však zároveň přineslo několik rozporů, a to především otázku, nakolik je podobný originálnímu produktu Genotropinu[®], zda je stejně účinný a bezpečný.

Bylo nezbytné zavést novou legislativu týkající se „biosimilars“, která by zaručovala bezpečnost těchto nových produktů. V Evropě se touto problematikou zabývá EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) a v USA FDA (Food and Drug Administration). Od roku 2001 došlo k revizi legislativy týkající se farmacie. Ačkoliv v USA zůstává legislativa prozatím nejasná, v členských státech EU v roce 2005 a 2006 bylo přijato několik dokumentů týkající se „biosimilars“. Tyto dokumenty jsou dostupné na internetových stránkách EMEA: <http://www.emea.eu.int>. Pro zajištění bezpečnosti „biosimilars“ a jejich stejné účinnosti, jako mají originální produkty, je v oficiálních dokumentech kladen důraz na preklinické a klinické testování těchto nových bioléciv^{2,20}.

Evropské regulační orgány potvrdily, že akceptují principy „biosimilars“ tím, že v dubnu 2006 schválily druhý takový produkt – Valtropin[®] (lidský růstový hormon)².

7. Závěr

Bioléciva nabízí nové možnosti pro léčbu dříve neléčitelných nebo obtížně léčitelných onemocnění. Významný podíl aplikací biofarmaceutik je v oblasti terapie rakoviny, další důležité oblasti zahrnují imunitní onemocnění a infekční onemocnění. Mezi biolécivy zažívají obrovský rozmach monoklonální protilátky. V současné době je na trhu 165 schválených produktů a odhaduje se, že 2500 terapeutických proteinů je ve fázi výzkumu a 1600 v preklinických a klinických testech².

Mezi nejprodávanějšími biolécivy v současnosti zaujímají místo následující produkty (tab. II): erythropoetin pro léčbu anémie (Procrit[®], Epogen[®], Aranesp[®]), insulin pro léčbu diabetes mellitus (Novolin[®], Humulin[®], Humalog[®]), monoklonální protilátky pro léčbu autoimunitních onemocnění (Remicade[®], Enbrel[®]), faktor stimulující kolonie (CSF) používaný při chemoterapiích (Neupogen[®], Neulasta[®]), interferon α pro léčbu leukémie a hepatitidy C (Intron A[®]), monoklonální protilátky pro léčbu rakoviny lymfatického systému – tzv. non-Hodgkin lymfomu (Rituxan[®]) a interferon β pro léčbu roztroušené sklerózy (Avonex[®]).

Přes nesporný přínos biofarmaceutik je nutné připomenout i jejich problémy, které zatím čekají na řešení. Jedná se především o vysokou cenu produkce a potenciální imunogenitu. Klíčem pro snížení nákladů produkce by mohly být nové levnější expresní systémy, jako jsou kvasinky, hmyzí buňky nebo rostliny, jelikož kultivace nejčastěji používaných expresních systémů – savčích CHO buněk – je poměrně drahou záležitostí. Snížit cenu bioléciv

by se dalo docílit, vedle snížení nákladů kultivace v podobě levnějších expresních systémů, i zlevněním purifikačních procesů.

Snaha snížit imunogenitu nových biotechnologicky připravených produktů vedla k návrhu a úpravě některých organismů (např. kvasinka *Pichia pastoris*⁹ nebo rostlina *Arabidopsis thaliana*¹⁹) k využití pro produkci terapeutických proteinů⁸. Úpravy spočívají především v modifikaci glykosylačních drah, které zajišťují glykosylace proteinů vlastní lidským bílkovinám.

Bioléčiva představují stále rozvíjející se oblast, která má nesporný pozitivní význam. Cílem farmaceutických společností by mělo být snížení jejich ceny, a tím i rozšíření jejich dostupnosti široké veřejnosti.

Tato studie byla podpořena granty GA ČR 203/06/1038 a MZ NR/8355-3.

Zkratky

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)
CHO	ovariální buňky čínské křečka (Chinese Hamster Ovary)
CSF	faktor stimulující kolonie (Colony-Stimulating Factor)
EGF	epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor)
EMA	evropský úřad pro kontrolu léčiv (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)
FDA	americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor)
TNF	faktor nekrotizující nádory (Tumor Necrosis Factor)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

LITERATURA

- Birch J. R., Onakunle Y., v knize: *Methods in Molecular Biology* (Smales C. M., James D. C., ed.), sv. 308, kap. 1. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2005.
- Walsh G.: *Nat. Biotechnol.* 24, 769 (2006).
- Datamonitor Report 2002: <http://www.datamonitor.com/~71f089ad335e4c2d931ad9a22a34da04~/products/free/Report/DMHC1803/010dmhc1803.pdf>, staženo 15. listopadu 2006.
- Belsey M. J., Hartus L. M., Das R. R., Chertkow J.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 535 (2006).
- Ruml T., Rumlová M., Pačes V. (ed.): *Genove inženýrství*. VŠCHT, Praha 2002.
- Lee S. Y., Choi J. H. a Lee S. J., v knize: *Methods in Molecular Biology* (Smales C. M., James D. C., ed.), sv. 308, kap. 3. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2005.
- Popplewell A. G., Sehdev M., Spitali M., Weir A. N. C., v knize: *Methods in Molecular Biology* (Smales C. M., James D. C., ed.), sv. 308, kap. 2. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2005.
- Sethuraman N., Stadheim T. A.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 341 (2006).
- Choi B. K., Bobrowicz P., Davidson R. C., Hamilton S. R., Kung D. H., Li H., Miele R. G., Nett J. H., Wildt S., Gerngross T. U.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5022 (2003).
- Li H., Sethuraman N., Stadheim T. A., Zha D., Prinz B., Ballew N., Bobrowicz P., Choi B. K., Cook W. J., Cukan M., Houston-Cummings N.R., Davidson R., Gong B., Hamilton S. R., Hoopes J. P., Jiang Y., Kim N., Mansfield R., Nett J.H., Rios S., Strawbridge R., Wildt S., Gerngross T. U.: *Nat. Biotechnol.* 24, 210 (2006).
- Jin Z., Lusheng S., Yili W., v knize: *Methods in Molecular Biology* (Smales C. M., James D. C., ed.), sv. 308, kap. 7. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2005.
- Kim Y. K., Shin H. S., Tomiya N., Lee Y. C., Betenbaugh M. J., Cha H. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 92, 452 (2005).
- zu Pultz J., Kubasek W. L., Duchene M., Marget M., von Specht B. U., Domdey H.: *Biotechnology (NY)* 8, 651 (1990).
- Chu L., Blumentals I., Maheswari G., v knize: *Methods in Molecular Biology* (Smales C. M., James D. C., ed.), sv. 308, kap. 10. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2005.
- He Y., Honnen W. J., Krachmarov C. P., Burkhart M., Kayman S. C., Corvalan J., Pinter A.: *J. Immunol.* 169, 595 (2002).
- van Berkel P. H., Welling M. M., Geerts M., van Ven H. A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E. K., Pieper F., Nuijens J. H. a Nibbering P. H.: *Nat. Biotechnol.* 20, 484 (2002).
- Zhu L., van de Lavoie M. C., Albanese J., Beenhouwer D. O., Cardarelli P. M., Cuisson S., Deng D. F., Deshpande S., Diamond J. H., Green L., Halk E. L., Heyer B. S., Kay R. M., Kerchner A., Leighton P. A., Mather C. M., Morrison S. L., Nikolov Z. L., Passmore D. B., Pradas-Monne A., Preston B. T., Rangan V. S., Shi M., Srinivasan M., White S. G., Winters-Digiaccinto P., Wong S., Zhou W., Etches R. J.: *Nat. Biotechnol.* 23, 1159 (2005).
- Hiatt A., Ma J. K.-C.: *Int. Rev. Immunol.* 10, 139 (1993).
- Strasser R., Altmann F., Mach L., Glossl J., Steinkellner H.: *FEBS Lett.* 561, 132 (2004).

20. Edfjäll C.: *Eur. Biotech. News* 4, 33–34 (2003).
21. Business Insight: http://www.pharmalive.com/special_reports/sample.cfm?reportID=193, staženo 11. prosince, 2006.

Z. Chrastilová^{a,b}, M. Macková^a, J. Šotola^b, and V. Král^{a,b} (^a*Institute of Chemical Technology, Prague*, ^b*Zentiva Co., Prague*): **Biopharmaceuticals – What Is Their Real Potential?**

The current and future situation in the field of biopharmaceuticals is reviewed. The position of biopharmaceuticals on pharmaceutical market is still strengthening. Biopharmaceuticals cover many therapeutic areas involving treatment of cancer, autoimmune diseases, diabetes, anemia, disorders associated with lack of some proteins

(e.g. human growth hormone) and others. Production of therapeutic proteins has shifted to new biotechnologies such as recombinant DNA and hybridoma technologies for production of monoclonal antibodies. Different types of expression systems suitable for production of biopharmaceuticals are described and compared. Mammalian cells, which are currently the most often used production system for glycoproteins, have several disadvantages including high production costs. This is why several cheaper expression systems are now being explored as alternatives. Yeast, plant and insect expression systems provide a new approach and potential for reduction of cost of biopharmaceuticals. The expiration of patents on original biopharmaceuticals give a chance to develop production of new drugs – biosimilars. Production of biosimilars can also reduce the cost of biopharmaceuticals, but under the condition that the safety and efficiency of biosimilars are the same as those of the original products.

AMYLASY – VÝZNAM STANOVENÍ JEJICH AKTIVITY

LUDMILA ZAJONCOVÁ a MAREK ŠEBELA

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
ludmila.zajoncova@upol.cz*

Došlo 26.10.06, přijato 7.11.06.

Klíčová slova: amylasa, inhibitory amylas, aktivita amylas, škrob, akutní pankreatitida

Obsah

1. Úvod – význam enzymu α -amylasy v lidské výživě
2. Škrob jako substrát α -amylasy
3. Rozdělení amylas
4. Trávení škrobů v lidském těle
5. Molekulové vlastnosti α -amylasy
6. Aktivátory a inhibitory α -amylas a jejich význam
7. Význam monitoringu aktivity α -amylasy v průmyslu a v klinické biochemii
8. Metody stanovení aktivity α -amylasy
 - 8.1. Metody amyloklastické
 - 8.2. Metody sacharogenní
 - 8.3. Metody chromogenní
 - 8.4. Metody s biosenzorem
9. Závěr – význam amylas

1. Úvod – význam enzymu α -amylasy v lidské výživě

Živiny obsažené v lidské potravě lze rozdělit na tři základní skupiny: sacharidy, tuky a bílkoviny. Tyto živiny se štěpí na menší a jednodušší částice, jež se poté vstřebávají stěnou tenkého střeva, aby se nakonec dostaly do krevního oběhu. Ne všechno, co sníme, je stráveno. Část stravy, kterou se nepovede organismu rozložit, je z něj vyloučena. Nejmenší skupinu živin v lidské stravě tvoří proteiny, které jsou v ní zastoupeny asi z 20–25 %, a jsou rozloženy působením enzymů proteas. Trávení tuků, které tvoří 20–30 % v lidské stravě, katalyzují enzymy lipasy. Hlavní a nejdůležitější složku lidské výživy představují sacharidy (50–60 %). Sacharidy jsou hlavně ve formě škrobů, které trávicí systém štěpí za účasti enzymů amylas.

2. Škrob jako substrát α -amylasy

Škroby jsou hlavní složkou lidské potravy a podobně také pro mnoho dalších živočichů. Jsou syntetizovány v rostlinných buňkách jako nerozpustné granule složené z amylosy a amylopektinu¹. Vysoký obsah škrobu je v kukuřici, bramborách, rýži a obilí. Škrobové molekuly jsou glukosové polymery², kde glukosové jednotky jsou spojeny 1,4- α a 1,6- α glykosidovými vazbami. V tom se liší od celulosy, kde spojení glukosových jednotek je vytvořeno pomocí 1,4- β glykosidových vazeb. Škrob je tvořen dvěma druhy polysacharidů, a to amylosou a amylopektinem. Poměr obou polysacharidů je různý podle druhu a odrůdy rostlin. Amylosa je tvořena dlouhými nerozvětvenými řetězci, složenými s glukosových zbytků, vzájemně spojených 1,4- α glykosidovými vazbami, přičemž tento řetězec má strukturu šroubovice, do jejíhož nitra lze navázat až 20 % jodu. Toho se využívá v analytické chemii při důkazech jodu. Relativní molekulová hmotnost bývá v rozmezí 150 000 až 600 000. Amylopektin obsahuje také D-glukosu vázanou vazbou 1,4- α , na rozdíl od amylosy však připadá na každých 20 až 25 glukosových jednotek jedno rozvětvení, kdy se nový řetězec váže způsobem 1,6- α . Počet glukosových jednotek v molekule amylopektinu se liší a bývá od několika tisíc do milionu. Pokud jsou sacharidy přijímány do těla v nadbytečném množství, jsou přeměněny na glykogen, je-li příjem ještě vyšší, tělo je přeměněno na tuky a v této podobě je uloží. Polymer glykogen se nachází hojně v játrech (8–10 % váhy) a svalové hmotě (2–3 % váhy). Glykogen má podobnou strukturu jako amylopektin, je však častěji větven. Velký počet neredukujících konců v glykogenu dovoluje rychlou mobilizaci uskladněné energie.

3. Rozdělení amylas

Amylasy katalyzuje hydrolýzu 1,4- α -D-glykosidových vazeb v polysacharidech (amylosa, amylopektin, glykogen) obsahujících tři a více takto vázaných D-glukosových jednotek. Reaguje se škrobem, glykogenem a odpovídajícími polysacharidy za vzniku dextrinu, maltotriosy a maltosy. Podle místa působení a vznikajících produktů rozlišujeme tři základní druhy amylas: α -amylasy, β -amylasy a γ -amylasy.

α -Amylasy jsou extracelulární enzymy, které atakují 1,4- α -D-glykosidové vazby na kterémkoliv místě polymerů obsahujících tři a více těchto vazeb³. Dokážou obejít větvení s vazbou 1,6- α -D. Jedná se o endoglykosidasu,

systematicky o 1,4- α -D-glukan-glukanohydrolasu (EC 3.2.1.1). Produktem hydrolytického štěpení amylosy je směs glukosy a maltosy s hemiacetalovými hydroxyly uvolněnými jako α -anomery. Amylopektin a glykogen jsou štěpeny náhodně na 1,4- α -D-glykosidových vazbách, přičemž 1,6- α -D vazby zůstávají nedotčeny. Vznikají tak větvené i nevětvené oligosacharidy (α -dextriny). Rozlišují se dva druhy α -amylasy: zkapalňující a zcukrující³. Zkapalňující α -amylasa degraduje oligomery, které obsahují více jak 15 glukosových jednotek, zatímco zcukrující α -amylasa štěpí již tetramery glukosy.

β -Amylasy pravidelně štěpí 1,4- α -D-glykosidové vazby od neredukujícího konce polysacharidového řetězce³. Z amylosy vzniká prakticky kvantitativně maltosa, uvolňovaná jako β -anomer. β -Amylasy patří mezi exoglykosidasy, systematicky je tento enzym označován jako 1,4- α -D-glukan-maltohydrolasa (EC 3.2.1.2). Amylopektin a glykogen štěpí také z neredukujícího konce až k větvení 1,6- α -D, které enzym štěpit nemůže. Dextrin, vzniklý takovou hydrolyzou amylopektinu, se nazývá limitní dextrin a je to rovněž β -anomer. Amylasy postupně rozkládají dextriny dále, přičemž větvení 1,6- α -D-glykosidové vazby pomáhá hydrolyzovat amylo-1,6-glykosidasa.

γ -Amylasy hydrolyzují samostatné glukosové jednotky z neredukujícího konce amylosy nebo amylopektinu. Systematicky se označuje jako 1,4- α -D-glukan-glukohydrolasa (EC 3.2.1.3). Je termostabilní³ a štěpí polysacharidy na rozdíl od α -amylasy nejen na vazbách 1,4- α -D-, ale i na vazbách 1,6- α -D (i když s mnohem menší rychlostí). Výsledkem její aktivity je β -D-glukosa, maltosa a limitní dextriny.

Vliv α -amylasy na maltotriosy⁴ za účelem vzniku maltosy a glukosy je slabý. Maltosa je zcela rezistentní vůči působení α -amylasy. Protože pouze monosacharid může projít střevní stěnou, maltosa je dále hydrolyzována membránově vázanými hydrolasami (α -glukosidasy) v kartáčovitém lemu enterocytů.

4. Trávení škrobu v lidském těle

Trávení škrobu v lidském těle probíhá v několika stupních. Štěpení škrobu začíná v ústech, kde slinný enzym α -amylasa zahajuje hydrolyzu 1,4- α glykosidových vazeb. Tento isoenzym je znám také jako ptyalin. Protože sousto setrvává v ústech jen velmi krátkou dobu, nemá pro trávení valný význam.

V tenkém střevě je trávení škrobu katalyzováno dvěmi různými skupinami hydrolas⁴. První skupinu tvoří pankreatické α -amylasy, které vstupují do střevní dutiny. Většina polysacharidů se rozkládá na směs obsahující maltosu, maltotriosy a určitý počet 1,6- α a 1,4- α oligosacharidů. Druhá skupina hydrolas je imobilizována v kartáčovitém lemu enterocytů a zahrnuje disacharidasy (maltasa [EC 3.2.1.20], laktasa [EC 3.2.1.108] a sacharasa [3.2.1.26]),

trisacharidasy a glukoamylasy [3.2.1.3]. Výsledná směs oligosacharidů prochází přes hlenové vrstvy na kartáčovitou membránu tenkého střeva. Zde se funkce ujímá další enzym α -glukosidasa (EC 3.2.1.20), která degraduje oligosacharidy na glukosu. Glukosa je absorbována a vstupuje do krevního oběhu. Člověk může strávit za 24 hodin až 2 kg škrobu⁴.

α -Amylasy se vyskytují nejen v rostlinných a živočišných buňkách, ale také v mikroorganismech³. Enzymy z různých zdrojů vykazují rozdílné fyzikální, chemické a katalytické vlastnosti. Nejlépe byly prostudovány α -amylasy bakterií, z vepřového pankreatu a lidská amylasa.

5. Molekulové vlastnosti α -amylasy

Lidská α -amylasa je enzym produkovaný a uskladňovaný především buňkami slinné žlázy a buňkami exokrinního pankreatu. Má tedy dva hlavní isoenzymy: slinný a pankreatický. Lidská α -amylasa⁵ je glykoprotein složený z 496 aminokyselin v jednom polypeptidovém řetězci. V molekule proteinu jsou dvě volné SH skupiny a čtyři disulfidové můstky. Gen kódující lidskou α -amylasu se nachází na chromosomu 1 a tvoří část multigenové rodiny. Geny pro α -amylasu jsou regulovány tak, že jeden isoenzym je syntetizován v slinných žlázách (S-isoenzym) a druhý ve pankreatu (P-isoenzym). Zatímco P-isoenzym se vyskytuje výhradně v pankreatu, S-isoenzym se objevuje také v slzách, potu a v lidském mléku. Slinná a pankreatická α -amylasa jsou vysoce homologní v primární struktuře (shoda 97 %, rozdíly pouze v 15 aminokyselinách). Jako glykoproteiny se však liší obsahem sacharidů, které mají vliv na konečnou molekulovou hmotnost (50 kDa – pankreatická a 51 kDa – slinná). α -Amylasa má optimální aktivitu⁶ v neutrální oblasti pH (6,9–7,0), podobné prostředí se nachází ve střevech. Každá enzymová molekula vyžaduje přítomnost alespoň jednoho vápenatého ionu, který má význam pro její enzymovou aktivitu a také prevenci její destrukce v lidském střevě působením proteolytických enzymů⁷. Pro funkci α -amylasy je také nezbytný chloridový ion⁸, optimální koncentrace Cl^- je asi 10 mM (cit.⁹).

Struktura lidské pankreatické α -amylasy byla potvrzena použitím rentgenové difrakční analýzy¹⁰. Molekula enzymu je tvořena třemi strukturálními doménami, označovanými A, B a C. Největší je doména A (1–99, 169–404), která je katalytickým jádrem. Její struktura je tvořena osmivláknovým β -barelovým motivem, na jehož jednom konci se nachází aktivní místo tvořené aminokyselinovými zbytky Asp 197, Glu 233 a Asp 300. Nejmenší doména B (100–168) je smyčkovou oblastí vycházející z domény A. Doména C (405–496) je pouze volně spojena s doménami A a B, jedná se o globulární jednotku s β -prvky. Domény A a B jsou spojeny třemi funkčně důležitými místy: aktivním místem a vazebnými místy vápenatých a chloridových iontů. Aktivní místo enzymu je prohlubeň ve tvaru V, lo-

kalizovaná na karboxylovém konci β -barelu domény A. Klíčové aminokyselinové zbytky tvořící vazebné místo chloridových iontů jsou Arg195, Asn298 a Arg337. Tyto zbytky jsou v přímé blízkosti aktivního místa a tvoří síť vodíkových vazeb, do níž jsou zapojeny také katalytické zbytky Asp197 a Asp300. Vazebné místo vápníku je důležité pro stabilitu polypeptidového řetězce. Vápenaté ionty nehrají přímou roli v katalýze, ale utváří správnou konformaci aktivního místa. Klíčovým aminokyselinovým zbytkem je Asn100, který je spojen vodíkovou vazbou s katalytickým Asp197 a ten následně interaguje s chloridovým iontem.

6. Aktivátory a inhibitory α -amylas a jejich význam

Aktivita α -amylas je ovlivňována celou řadou látek. Sloučeniny, které způsobují zvýšení aktivity, se nazývají aktivátory. Mezi ně patří např. chloridové ionty, které allosterickeým efektem⁸ zvyšují aktivitu vepřové pankreatické amylasy. Vápenatý ion, který je součástí α -amylas, má velký význam pro jejich aktivitu. Odstranění vápenatého ionu z enzymu vede ke ztrátě aktivity, která však může být zpětně částečně obnovena nahrazením vápenatého ionu¹¹ některým z iontů ze skupiny lanthanoidů (Lu^{3+} , Nd^{3+} , Dy^{3+} , Sm^{3+} , Pr^{3+}).

Sloučeniny, které snižují aktivitu α -amylas, jsou jejich inhibitory a lze je rozdělit do dvou základních skupin. První skupinu tvoří jednoduché neproteinové sloučeniny, do druhé řadíme peptidy a proteiny. V tabulce I jsou uvedeny příklady inhibicí α -amylas¹² z různých zdrojů neproteinovými sloučeninami. Aktivitu α -amylas snižují nejrůznější anorganické ionty, ale také např. 2-deoxyglukosa, maltosa, kyselina citronová, arabitol, xylitol, ethylenglykol a další.

V posledních letech se do popředí zájmu dostávají proteinové inhibitory α -amylas, které se využívají jako léčebné škrobové blokátory v lidském těle nebo mají význam při ochraně kulturních plodin před různými škůdci a patogeny. Škrobové blokátory^{13,14} jsou syntetizovány v rostlinách jako jsou např. fazole (*Phaseolus vulgaris*) nebo pšenice (*Triticum aestivum*). Purifikovaný extrakt škrobových blokátorů z těchto rostlin se dostává do těla společně s potravou a zabraňuje tak štěpení škrobů α -amylasami vylučovanými do střev buňkami pankreatu. Výsledkem tohoto působení je snížení hladiny krevního cukru, což kladně ovlivňuje život lidí trpících nemocí *diabetes melitus*, pomáhá také při léčbě obezity a vede ke ztrátě hmotnosti^{15–18}.

Vlivem působení hmyzu a různých patogenů (viry, houby, bakterie) na rostliny dochází k vážným škodám na kulturních plodinách. Luštěniny, které jsou bohatou zásobárnou škrobů a bílkovin, jsou ohroženy celou řadou škůdců, kteří v semenech lusek vytvářejí úkryty a dále se v nich rozmnožují. Během vývoje si rostliny vytvořily určité obranné mechanismy¹⁹ a staly se odolnější vůči působení

těchto škůdců. Tato obrana spočívá v syntéze určitých sloučenin (sekundárních metabolitů) jako jsou antibiotika, alkaloidy, terpeny, kyanogenní glykosidy a některé proteiny. Mezi tyto proteiny patří chitinasy, β -1,3-glukanasové enzymy, lektiny a enzymové inhibitory^{20–23}. Enzymové inhibitory jsou důležitou zbraní proti trávicím hydrolasám (α -amylasy a proteiny) hmyzu a dalších škůdců. Několik druhů α -amylasových a proteinasových inhibitorů přítomných v semenech a vegetativních orgánech rostlin reguluje působení fytopatogenního hmyzu^{24–26}. Proteinové inhibitory α -amylas byly nalezeny hlavně v obilovinách jako je pšenice (*Triticum aestivum*)²⁷, ječmen (*Hordeum vulgareum*)²⁸, čirok (*Sorghum bicolor*)²⁹, žito (*Secale cereale*)³⁰, rýže (*Oryza sativa*)³¹, ale také v luštěninách jako je vigna (*Vigna unguiculata*)³² a fazole (*Phaseolus vulgaris*)^{33,34}. Tyto inhibitory vykazují monomerní molekulovou hmotnost 5 kDa (cit.²⁹), 9 kDa (cit.³²) a 13 kDa (cit.³⁵), homodimerní a heterodimerní hmotnost je přibližně 26 kDa (cit.³⁵) a tetramerní hmotnost je okolo 50 kDa (cit.³⁶). Amylasové inhibitory z různých druhů rostlin vykazují rozdílné specifity¹⁹ vůči amylasám z různých zdrojů. Určení specifity inhibice je prvním krokem při vývoji inhibitoru, který by mohl být použitelný pro vytváření vůči hmyzu rezistentních transgenních rostlin. V některých případech α -amylasové inhibitory inhibují pouze savčí α -amylasy, v jiných případech tomu může být naopak a α -amylasové inhibitory inhibují jen α -amylasy hmyzu. Často bývá funkce amylasového inhibitoru doplněna o funkci proteinasového inhibitoru, pak hovoříme o bifunkčních inhibitech¹⁹.

7. Význam monitoringu aktivity α -amylas v průmyslu a v klinické biochemii

α -Amylasy je důležitý průmyslový enzym³⁷ a stanovení její aktivity je žádoucí v mnoha oborech. Enzym je součástí různých detergentů a pracích prášků a využívá se k odstraňování škrobových skvrn z textilií. V pekařském průmyslu působení amylasy na škrob slouží ke vzniku dextrinů. α -Amylasy se hojně používají v biotechnologických procesech k degradaci škrobu a v syntetické chemii při výrobě oligosacharidů transglykosylací. Největší význam má stanovení aktivity α -amylasy v klinické biochemii.

Změny v aktivitě α -amylasy v krevním séru a moči jsou příčinou řady onemocnění. Hodnoty aktivity α -amylasy mohou být jak zvýšené, tak naopak snižené³⁸. Jednou z příčin zvýšené aktivity α -amylasy v krvi je onemocnění slinných žláz – parotitida, sialolitíza, trauma či nádor. Zvýšená aktivita amylasy v krvi nastává po nástupu akutní pankreatitidy. Při akutní pankreatitidě dochází k poškození acinózních buněk pankreatu, onemocnění může ohrožovat život. Závažnost onemocnění spočívá v aktivaci pankreatických proteolytických enzymů přímo v produkujících buňkách s následnou destrukcí pankreatu. Aktivita α -amylasy stoupá v séru za 3 až 12 hodin po atace a dosahuje

Tabulka I
 Příklady neproteinových inhibitorů α -amylasy¹²

Inhibitor	Původ α -amylasy	Podmínky pro inhibici
(NH ₄) ₂ SO ₄	<i>Sacharomycopsis figuligera</i>	
1,10-Fenanthrolin	<i>Bacillus subtilis</i>	1 mM, 39% inhibice
2,4-Dinitro-1-fluorbenzen	<i>Aspergillus oryzae</i>	6 mM
2-Deoxyglukosa	<i>Struthio camelus</i>	
2-Merkaptoethanol	<i>Streptomyces megasporus</i>	1 mM, 23% inhibice
Acarbosa	<i>Homo sapiens</i>	
Ag ⁺	<i>Streptomyces megasporus</i>	1 mM, 77% inhibice
Al ³⁺	<i>Bacillus subtilis</i>	2 mM, 38,7% inhibice
Arabitol	<i>Aspergillus flavus</i>	Kompetitivní inhibice
Ba ²⁺	<i>Bacillus subtilis</i>	5 mM, 28% inhibice
Ca ²⁺	<i>Bacillus circulans</i>	5 mM, 21% inhibice
Cd ²⁺	<i>Bacillus sp.</i>	1 mM, 91% inhibice
Kyselina citronová	<i>Micrococcus luteus</i>	25 mM, 54% inhibice
Co ²⁺	<i>Bacillus circulans</i>	5 mM, 91% inhibice
Cu ²⁺	<i>Bacillus subtilis</i>	2 mM, kompetitivní inhibice
EDTA	<i>Bacillus sp.</i>	10 mM, 90% inhibice
Ethylenglykol	<i>Aspergillus flavus</i>	
Fe ²⁺	<i>Bacillus subtilis</i>	5 mM, 71% inhibice
Glycerol	<i>Aspergillus flavus</i>	Kompetitivní inhibice
Hg ²⁺	<i>Pseudomonas sp.</i>	2 mM, kompetitivní inhibice
Chelerythrin	<i>Homo sapiens</i>	2,5 mM, 23,3% inhibice
Jodacetat	<i>Bacillus sp.</i>	0,5 mM, 98% inhibice
KCN	<i>Micrococcus luteus</i>	25 mM, 70% inhibice
Maltosa	<i>Aspergillus awamori</i>	Akompetitivní inhibice
Mg ²⁺	<i>Thermomonospora vulgaris</i>	10 mM, 86% inhibice
Mn ²⁺	<i>Thermomonospora vulgaris</i>	1 mM, 84% inhibice
Močovina	<i>Homo sapiens</i>	
Ni ²⁺	<i>Bacillus circulans</i>	5 mM, 91% inhibice
Pb ²⁺	<i>Pseudomonas sp.</i>	2 mM, 53% inhibice
Sanguinarin	<i>Homo sapiens</i>	2,5 mM, 47,7% inhibice
Sorbitol	<i>Aspergillus flavus</i>	Kompetitivní inhibice
Sr ²⁺	<i>Bacillus subtilis</i>	5 mM, 36% inhibice
Xylitol	<i>Aspergillus flavus</i>	Kompetitivní inhibice
Zn ²⁺	<i>Bacterium</i>	1 mM, 87% inhibice

je pětinasobného zvýšení nad horní referenční mez. Vzhledem ke krátkému biologickému rozpadu enzymu (6 až 12 hodin) dochází u nekomplikovaného průběhu k normalizaci do 3 dnů. Vytvoří-li se ascites (výpotek), je v jeho tekutině aktivita amylasy ještě mnohem vyšší. Protože molekula α -amylasy je poměrně malá, lze ji prokázat také v moči, kde lze najít zvýšenou aktivitu s několika-

hodinovým zpožděním oproti nálezů v séru. V případě pankreatitidy je zvýšena aktivita pouze P-isoenzymu α -amylasy (pankreatického).

Další příčinou zvýšené aktivity α -amylasy projevující se jako akutní břišní příhoda je recidiva chronické pankreatitidy, penetrující žaludeční vřed, přetlak ve žlučových cestách při biliární kolice či po podání opiátů, úraz nebo

operace pankreatu.

Na druhé straně se v klinické biochemii sleduje snížení aktivity α -amylasy v moči, které může být zapříčiněno renální insuficiencí nebo makroamylazemií, které je způsobeno navázáním enzymu na imunoglobulin (IgG nebo IgA). V krvi se pak hromadí vzniklý makromolekulární komplex, který je tak velký, že neprojde glomerulem. Stav bývá doprovázen bolestmi v břiše a při neznalosti může vést k diagnóze pankreatitidy. Příčina je neznámá, snad jde o určitý typ autoprotilátky. Makroamylasa může kolovat v krvi roky, aniž by byla známkou porušené funkce pankreatu. Podezření na přítomnost makroamylasy budí snížení frakční exkrece amylasy pod 1%. K definitivnímu průkazu je třeba užít metodu určující velikost molekuly enzymu (např. gelovou chromatografií).

8. Metody stanovení aktivity α -amylasy

V literatuře bylo popsáno několik stovek metod pro monitorování aktivity α -amylasy. Požadavky na stanovení aktivity amylasy jsou kladeny zejména z oblasti klinické biochemie, kde změněná aktivita enzymu diagnostikuje závažné onemocnění. Metody stanovení aktivity amylasy jsou v literatuře děleny podle způsobu detekce na metody amyloklastické, sacharogenní, chromogenní. V posledních letech se objevila celá řada biosenzorů, které využívají některý z principů výše jmenovaných metod. Základ pro amyloklastické a sacharogenní metody položili v roce 1908 Wohlgemuth³⁹ a v roce 1938 Somogyi⁴⁰. Wohlgemuthova semikvantitativní metoda stanovení aktivity α -amylasy sloužila v klinické biochemii téměř půl století.

8.1. Metody amyloklastické

Metody amyloklastické měří změny koncentrace substrátu v reakční směsi. Substrátem je ve většině případů škrob, ale používá se také barvený amylopektin⁴¹ nebo amylosa⁴². Sleduje se ztráta nebo snížení některé vlastnosti škrobového substrátu, většinou se jedná o schopnost tvorby modrého komplexu s jodem^{41,43,44}, pak hovoříme o jodometrických metodách. Při těchto metodách je rozpustný škrobový roztok inkubován⁴⁵ se zkoumanou α -amylasou a poté je část reakční směsi přidána do jodového roztoku a při 620 nm je pozorován vznik barevného produktu. Při štěpení substrátu vznikají řetězce různé délky. Swanson⁴⁶ pozoroval, že řetězce 4–6 glukosových jednotek nedávají žádné zbarvení s jodem. Řetězce 8–12 glukosových jednotek se barví jodem do červena a řetězce delší jak 30 glukosových jednotek dávají s jodem modré zbarvení.

Vedle jodometrických metod lze změny koncentrace substrátu sledovat pomocí metod viskozimetrických, turbidimetrických či nefelometrických. Turbidimetrické metody měří snížení zářivého toku světelného paprsku, k němuž dochází rozptylem světla na částicích rozptýlených v kapalině. Měření lze provádět s běžnými fotometry nebo spektrofotometry. Při stanovení aktivity amylasy se

používá jako substrát nerozpustný amylopektin a sleduje se rychlost snížení turbidity při 340 nm (cit.⁴⁷). Na podobném principu jsou založeny i nefelometrická stanovení aktivity α -amylasy. Nefelometrie měří tok záření vzniklého rozptylem paprsků zdroje na částicích roztoku. Kinetická nefelometrická metoda^{48,49} je základem automatu Perkin-Elmer Model 91 Analyzer pro stanovení aktivity amylasy. Nefelometrické zařízení je však cenově nákladnější.

Škrobová hydrolyza katalyzovaná α -amylasou a gluukoamylasou může být monitorována před a po jejím průběhu metodou infračervené spektroskopie, kdy lze současně stanovit aktivitu obou zúčastněných enzymů. Intenzita výsledného rozdílu spektra je přímo úměrná enzymové aktivitě⁵⁰. Hydrolyza škrobu katalyzovaná oběma enzymy je monitorována ve střední oblasti infračerveného spektra pomocí Fourierových transformací spektroskopické detekce. Předností amyloklastických metod oproti metodám sacharogenním je rychlost, jednoduchost a v neposlední řadě možnost dosažení vysokého stupně přesnosti a přesnosti. Proces je aplikovatelný ke stanovení aktivity amylasy v krvi a moči beze změny základní techniky. Ve srovnání s metodami sacharogenními však nastávají problémy při výběru vhodného substrátu. Používaná koncentrace škrobu je suboptimální a zdánlivá aktivita amylasy se může lišit v závislosti na zdroji použitého škrobu⁵¹.

8.2. Metody sacharogenní

Sacharogenní metody stanovují množství vznikajících redukcujících sacharidů nejčastěji maltosy nebo glukosy, popřípadě dextrinů vzniklých enzymovým štěpením. Pro stanovení redukcujícího cukru maltosy lze využít spektrofotometrickou⁵² metodu, při níž vzniká reakcí s 3,5-dinitrosalicilovou kyselinou cihlově červený komplex, který má absorpční maximum při 540 nm. Metoda byla automatizována, umožňuje stanovení až 60 vzorků za hodinu a našla uplatnění v analýze potravin. Nevýhodou těchto měření je interference endogenní glukosy, která se může v biologických vzorcích vyskytovat. Proto byla navržena metoda, kde se glukosa v roztoku po enzymové reakci α -amylasy rozkládá za přítomnosti dvou enzymů⁵³ glukosaoxidasy a katalasy. Glukosaoxidasa přemění glukosu na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku. Peroxid vodíku je ze směsi odstraněn enzymem katalasou. Vzniklá směs je poté dialyzována a redukcující oligosacharidy, především maltosa, reagují s roztokem činidla měď-neocuproin (2,9-dimethyl-1,10-fenantrolinhydrochlorid) při 95 °C po dobu 3 min. Vzniká barevný komplex, jehož absorbance je měřena při 450 nm. Uvedená metoda byla dále modifikována⁵⁴ pro zvýšení přesnosti, citlivosti a zvýšení počtu analyzovaných vzorků. Nishidate a Miwa⁵⁵ eliminovali vliv endogenní glukosy v krevním séru úpravou vzorku s glukosaoxidasou a hexokinásou. Glukosaoxidasa katalyzuje oxidaci glukosy a vznikající peroxid vodíku reaguje s *N*-ethyl-*N*-sulfopropyl-*m*-toluidinem za katalýzy peroxidasou, vzniká bezbarvá sloučenina. Další část glukosy je přeměněna na glukoso-6-fosfát pomocí hexokinasy a ATP. Hexokinasa je pak inaktivována lipolanem. Lipolan jako

inhibitor hexokinasy neovlivňuje aktivitu α -amylasy až do koncentrace 250 mg l⁻¹.

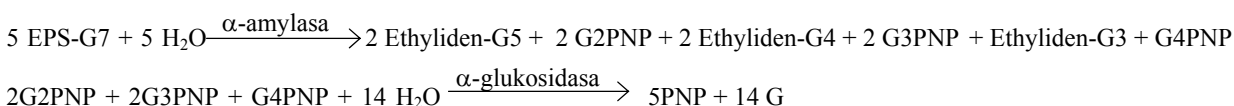
8.3. Metody chromogenní

Chromogenní metody využívají tvorbu barevného produktu, který vznikne po hydrolýze polysacharidového substrátu, který je značen chromogenem. Využívají se substráty značené 4-nitrofenolem, který je navázán na konec definovaného oligosacharidu, např. maltopentaosu nebo maltotetraosu⁵⁶. Nejčastěji se využívá α -D-maltoheptaosid označovaný jako G7, který po konjugaci se 4-nitrofenolem označujeme jako 4-NP-G7. Amylasy štěpí tento substrát na nižší oligosacharidy s navázaným 4-nitrofenolem. Přidá-li se do směsi α -glukosidasa, tyto jsou dále štěpeny na volné oligosacharidy, 4-nitrofenol a glukosu. Volný 4-nitrofenol absorbuje ve formě anionu při 405 nm. Kombinovaným působením obou enzymů na substrát vzniká více než 30 % volného 4-nitrofenolu. α -Glukosidasa reaguje převážně s oligosacharidy, které mají v řetězci méně než čtyři molekuly glukosy. Stabilitu reakční směsi lze zlepšit tzv. blokovanými substráty⁵⁷. Jedná se o 4-nitrofenylglykosidy s kovalentně navázanou blokující skupinou (4,6-ethyliden nebo 3-ketobutyliden) na neredukujícím konci oligosacharidu, která chrání řetězce před účinkem exoamylolytické aktivity (před α -glukosidasou, která je jako pomocný enzym přítomna v reakční směsi). Princip metody znázorňuje schéma 1.

Takto modifikované substráty eliminují vliv endogenní glukosy a pyruvátu.

8.4. Metody s biosenzorem

Biosenzory – analytická zařízení s citlivou biorekogniční vrstvou umožňují stanovení aktivity α -amylasy. Princip metody vychází většinou z metod sacharogenních využívajících při katalýze α -amylasy vznik oligosacharidů. Obvykle se pomocí biosenzoru stanovuje množství maltosy, která je konečným produktem při hydrolýze škrobů. Filipiak⁵⁸ využil ke stanovení aktivity α -amylasy kyslíkové elektrody, kterou pokryl enzymovou membránou s α -glukosidasou (štěpí maltosu na dvě molekuly glukosy) a glukosaoxidasou. Spotřeba kyslíku je pak úměrná aktivitě α -amylasy. α -Amylasová aktivita byla stanovena v lidském séru pomocí oligosachariddehydrogenasové grafitové elektrody⁵⁹ obsahující benzochinon. Přídavek α -glukosidasy do roztoku obsahujícího maltopentaosu a lidské sérum vytváří proud odpovídající aktivitě enzymu. V nedávné době byl konstruován průtokový biosenzor pro stanovení aktivity slinné amylasy, který obsahoval předkolonu⁶⁰, ve které byla imobilizována α -glukosidasa štěpící vznikající maltosu na dvě molekuly glukosy, jejíž koncentrace byla poté stanovena na peroxidové elektrodě s glukosaoxidasou. Pro zjišťování vlivu barevných inhibitorů jako jsou benzo[c]fenantridinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin byl konstruován biosenzor, jehož součástí nebyla předkolona^{61,62}. Štěpení škrobu α -amylasou probíhalo konstantní dobu, poté byla aktivita enzymu (vzniklá maltosa) stanovena pomocí peroxidové elektrody, která byla překryta enzymovou membránou s α -glukosidasou, mutarotasou a glukosaoxidasou. Vliv škrobového substrátu na stanovení byl eliminován použitím tohoto substrátu jako nosného roztoku. Princip je zřejmý ze schématu 2.



(EPS-G7 = 4,6-ethyliden-(G7)-*p*-nitrofenol-(G1)- α -D- maltoheptaosid, PNP = *p*-nitrofenol, G = glukosa)

Schéma 1

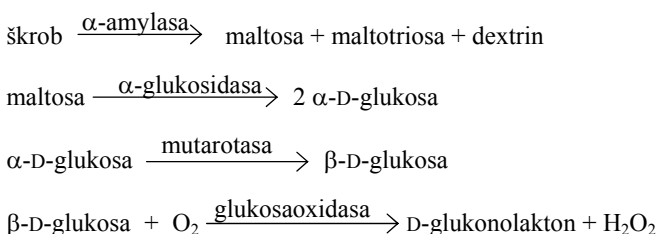


Schéma 2

9. Závěr – význam amylas

Amylasy patří mezi enzymy, jejichž funkce byly známy velmi dávno. V roce 1833 zjistil francouzský chemik⁶³ Anselme Payen, že hrubě vyčištěný extrakt z klíčků ječmene urychluje štěpení škrobu na jeho cukerné složky. Z hrubě vyčištěného extraktu izoloval první enzym v koncentrované podobě diastasu. Švédský chemik⁶⁴ Jon Jakob Berzelius o dva roky později názorně dokázal, že škrob může být efektivněji rozštěpen pomocí sladu než kyselinou sírovou a nazval tento jev katalýzou. Z těchto pokusů vyvodil obecný závěr, že chemická katalýza je oním trikem, kterým živé bytosti řídí ve svém organismu chemické přeměny. O tomto názoru se pak během 19. století vedly spory. Dnes je biochemická katalýza samozřejmým základem celé biochemie a molekulární biologie. Biologickými katalyzátory však nejsou chemické prvky, ale složitě vystavěné bílkovinné makromolekuly, které v mnoha případech obsahují atomy kovů. Tyto katalyzátory jsou známy pod pojmem enzymy.

Protože nejdůležitější složkou výživy „západního světa“ je polysacharid škrob, je zřejmý primární význam enzymu α -amylasy jako katalyzátoru, který umožňuje štěpit škrob v potravinách do podoby, aby byla využitelná v organismu. Amylasy jsou tvořeny v lidském těle v pankreatu a slinných žlázách. Na trhu se v posledních letech objevila celá řada komerčních preparátů, různých potravinových doplňků, které v sobě zahrnují sadu enzymů pro správnou funkci těla. Například firma⁶⁵ „Zest for life“ nabízí suplementy, které obsahují enzymové preparáty proteas, amylas, lipas a laktas.

S objevením proteinových inhibitorů α -amylas souvisí vývoj a nabídka dalších potravinových doplňků, které inhibují aktivitu α -amylas přímo v tenkém střevě a tím snižují množství přijatých sacharidů do organismu. Na tomto principu se dnes prodává řada komerčních preparátů⁶⁶ (Phaseolamin 2250TM, Phase'oLean Forte aj.), kde účinná látka se nachází ve formě tablet, kapslí, práškového nápoje či žvýkácké gumy a konzumuje se společně se škrobovou potravou. Tyto suplementy mají význam při léčbě cukrovky nebo se uplatňují v rámci různých dietních programů sledujících redukci hmotnosti. Inhibitory α -amylas a proteas přítomné v semenech a vegetativních částech rostlin chrání rostliny před působením hmyzu. Cílem studia těchto inhibitorů je tvorba transgenních rostlin¹⁹ odolných vůči fytopatogenům.

Při onemocnění pankreatu nebo slinných žláz nastává v lidském organismu změna ve fyziologické aktivitě α -amylasy, a právě monitorování hladiny aktivity α -amylasy v klinické biochemii vede k odhalení a potvrzení diagnózy určitého onemocnění těchto orgánů. Aktivitu α -amylas je potřeba sledovat také v mnoha průmyslových odvětvích jako je průmysl textilní, potravinářský, výroba pracích prášků apod. Z toho důvodu se stále zdokonalují metody stanovení aktivity α -amylasy. Využívají se většinou stávající principy, ale aplikují se na nové instrumentální metody a nové přístroje s využitím počítačového zpracování vý-

sledků. Většinou jsou metody nabízeny s možností automatizace.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM 6198959216.

LITERATURA

1. Voet D., Voet J. G., Pratt Ch. W.: *Fundamentals of Biochemistry. Life at the Molecular Level*. Wiley, 2005.
2. McKee T., McKee J. R.: *Biochemistry. An Introduction*. Wm. C. Brown Publisher, Boston 1996.
3. Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. T., Singh D., Mohan R.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 135 (2000).
4. Rendleman J. A. Jr.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 171 (2000).
5. Beaupoil-Abadie B., Raffalli M., Cozzone P., Marchis-Mouren G.: *Biochim. Biophys. Acta* 297, 436 (1973).
6. Conway R. L., Hood L. F.: *Stärke* 28, 341 (1976).
7. Vallee B. L., Stein E. A., Sumerwell W. N., Fischer E. H.: *J. Biol. Chem.* 234, 2901 (1959).
8. Levitzki A., Steer M.: *Eur. J. Biochem.* 41, 171 (1974).
9. Walker G. J., Hope P. M.: *Biochem. J.* 86, 452 (1963).
10. Bayer G. D., Luo Y., Withers S. G.: *Protein Sci.* 4, 1730 (1995).
11. Darnall W., Birnbaum R.: *Biochemistry* 12, 3489 (1973).
12. <http://www.expasy.ch/enzyme>, staženo 10.10.2005
13. Marshall J. J., Lauda C. M.: *J. Biol. Chem.* 250, 8030 (1975).
14. Choudhury A., Maeda K., Murayama R., DiMaggio E. P.: *Gastroenterology* 111, 1313 (1996).
15. Boivin M., Zinsmeister A. R., Go V. L., DiMaggio E. P.: *Mayo Clin. Proc.* 62, 249 (1987).
16. Boivin M., Flourie B., Rizza R. A.: *Gastroenterology* 94, 387 (1988).
17. Lankisch M., Layer P., Rizza R. A., DiMaggio E. P.: *Pancreas* 17, 176 (1998).
18. Holt P. R., Thea D., Yang M. Y., Kotler D. P.: *Metabolism* 37, 1163 (1988).
19. Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Grossi-de-Sá M. F.: *Eur. J. Biochem.* 269, 397 (2002).
20. Ryan C. A.: *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425 (1990).
21. Ryan C. A., Pearce G.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 1 (1998).
22. Bishop J. G., Dean A. M., Mitchell-Olds T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5322 (2000).
23. Sales M. P., Gerhardt I. R., Grossi-de-Sá M. F., Xavier-Filho J.: *Plant Physiol.* 124, 515 (2000).
24. Konarev A. V.: *Euphytica* 92, 89 (1996).
25. Chrispeels M. J., Grossi-de-Sá M. F., Higgins T. J. V.: *Seed Sci. Res.* 8, 257 (1998).
26. Gatehouse A. M. R., Gatehouse J. A.: *Pest. Sci.* 52, 165 (1998).
27. Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch Jr. C.,

- Silva C. P., Grossi de-Sá M. F.: *Eur. J. Biochem.* 267, 1466 (2000).
28. Abe J. I., Sidenius U., Svensson B.: *Biochem. J.* 293, 151 (1993).
29. Bloch Jr. C., Richardson M.: *FEBS Lett.* 279, 101 (1991).
30. Iulek J., Franco O. L., Silva M., Slivinski C. T., Bloch Jr. C., Rigden D. J., Grossi de-Sá M. F.: *Int. J. Biochem. Cell Physiol.* 32, 1195 (2000).
31. Yamagata H., Kunimatsu K., Kamasaka H., Kuramoto T., Iwasaki T.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 62, 978 (1998).
32. Melo F. R., Sales M. P., Silva L. S., Franco O. L., Bloch C. Jr., Ary M. B.: *Prot. Pept. Lett.* 6, 387 (1999).
33. Grossi de-Sá M. F., Mirkov T. E., Ishimoto M., Colucci G., Bateman K. S., Chrispeels M. J.: *Planta* 203, 295 (1997).
34. Young N. M., Thibault P., Watson D. C., Chrispeels M. J.: *FEBS Lett.* 446, 203 (1999).
35. Feng G. H., Richardson M., Chen M. S., Kramer K. J., Morgan T. D., Reeck G. R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 419 (1996).
36. Kasahara K., Hayashi K., Arakawa T., Philo J. S., Wen J., Hara S., Yamaguchi H.: *J. Biochem.* 120, 177 (1996).
37. Shaw J. F., Lin F. P., Chen S. Ch., Chen H. Ch.: *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36, 195 (1995).
38. Racek J.: *Klinická biochemie*. Galén, Praha 1999.
39. Wohlgemuth J.: *Biochem. Z.* 9, 1 (1908).
40. Somogyi M.: *J. Biol. Chem.* 125, 299 (1938).
41. Babson A. L., Tenney S. A., Meglaw R. E.: *Clin. Chem.* 16, 39 (1970).
42. Street H. V., Close J. R.: *Clin. Chim. Acta* 1, 256 (1956).
43. Pimstone N. R.: *Clin. Chem.* 10, 891 (1964).
44. Gomori G.: *Am. J. Clin. Pathol.* 27, 714 (1957).
45. Hirokado M., Hirata K., Uematsu Y., Sadamasu Y., Ito K., Suzuki S.: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 38, 341 (1997).
46. Swanson M. A.: *J. Biol. Chem.* 172, 825 (1948).
47. Malkus H., Ibanez J., Castro A., DiCesare J. L.: *Clin. Chem.* 23, 122 (1977).
48. Shipe J. R., Savory J.: *Clin. Chem.* 18, 1323 (1972).
49. Zinterhofer L., Wardlaw S., Jatlow P., Seligson D.: *Clin. Chim. Acta* 43, 5 (1973).
50. Schindler R., Lendl B., Kellner R.: *Anal. Chim. Acta* 366, 35 (1998).
51. Somogyi M.: *Clin. Chem.* 6, 23 (1960).
52. van Staden J. F., Mulaudzi L. V.: *Anal. Chim. Acta* 421, 19 (2000).
53. O'Neal W. R., Gochman N.: *Clin. Chem.* 16, 985 (1970).
54. Matthews W. S., Sterling R. E., Boyd T., Flores O. R.: *Clin. Chem.* 19, 1384 (1973).
55. Nishidate K., Miwa S.: *Jpn. J. Clin. Pathol.* 29, 259 (1981).
56. Rauscher E., Neumann E. S., Bulow S., Wahlefeld A. W.: *Clin. Chem.* 31, 14 (1985).
57. Kruse-Jarres J. D., Kaiser C., Hafkenschied J. C., Hohenwallner W., Stein W., Bohner J.: *J. Clin. Chem. Biochem.* 27, 103 (1998).
58. Filipiak M., Fludra K., Gošćimińska E.: *Biosens. Bioelectron.* 11, 355 (1996).
59. Kinoshita H., Usui T., Kaneda Y., Ikeda T.: *Bunseki Kagaku* 41, 145 (1992).
60. Yamaguchi M., Kanemaru M., Kanemori T., Mizuno Y.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 835 (2003).
61. Zajoncová L., Kosina P., Vičar J., Ulrichová J., Peč P.: *J. Enzyme Inhib.* 20, 261 (2005).
62. Zajoncová L., Jilek M., Beranová V., Peč P.: *Biosens. Bioelectron.* 20, 240 (2004).
63. <http://www.britannica.com/eb/article-9058831>, staženo 10.10.2006.
64. <http://www.anbio.org.br/english/worksh52.htm>, staženo 10.10.2006.
65. <http://www.anyvitamins.com>, staženo 10.10.2006.
66. <http://naturalproductsinsider.com/articles/1a1braning1.html>, staženo 10.10.2006.

L. Zajoncová and M. Šebela (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*): **Amylases – Significance of Determination of their Activity**

α -Amylases (EC 3.2.1.1), catalyzing the hydrolysis of α -1,4-D-glucan linkages in starch, are widely distributed in nature, being found in bacteria, plants and animals. Starch is the most extensively used polysaccharide in the diet of the Western world. Starch digestion occurs primarily in the small intestine, where two families of degradation enzymes are found. The first family is introduced into the intestinal lumen and is represented by α -amylases – salivary and pancreatic. Members of the other family (including disaccharidases) are immobilized on the brushborder membrane. Amylase activity assays in blood serum are useful as a diagnostic tool, because markedly elevated serum amylase levels are associated with pancreatitis. There are two most common procedures for the determination of α -amylase activity: amyloclastic and saccharogenic. Many other methods have been introduced, in which either soluble or insoluble chromogenic substrates for α -amylase are used. Recently, a biosensor for α -amylase activity assay was constructed, based on the determination of α -amylase-generated maltose using a peroxide electrode with glucose oxidase, α -glucosidase and mutarotase immobilised on a cellophane membrane. The biosensing method offers a great advantage over traditional spectrophotometry because it is highly sensitive and there is no interference of coloured compounds. Some plants, particularly wheat and beans, contain specific inhibitors of animal α -amylase. The use of these inhibitors can help to improve carbohydrate tolerance in diabetics and aid in weight control. The inhibitors may also find application in imparting pest resistance to crop plants.

NECUKERNÉ PŘÍRODNÍ LÁTKY SLADKÉ CHUTI

OLDŘICH LAPČÍK^{a*}, JANA ČOPIKOVÁ^b,
MICHAL UHER^c, JITKA MORAVCOVÁ^a
a PAVEL DRAŠAR^{a,d}

^a Ústav chemie přírodních látek, ^b Ústav chemie a technologie sacharidů, FBPT, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c Fakulta chemické a potravinářské technologie, STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^d Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6

Došlo 25.9.06, přijato 14.11.06.

Klíčová slova: sladidlo, přírodní sladidlo, potravní doplněk, obnovitelné zdroje

Obsah

1. Úvod
2. Proteiny
3. Deriváty aminokyselin
4. Terpeny
5. Flavonoidy, chalkony a deriváty kumarinu
6. Steroidy
7. Závěr

1. Úvod

Článek navazuje na přehledy, které popisují diversitu přírodních látek, a může být chápán i jako vhodná učební pomůcka^{1–7} při výuce oboru.

Je dostatečně známo, že cukr (sacharosa) je v potravinách nahrazován, neboť je důležité zásobovat trh potravinami vhodnými pro diabetiky, je moderní snižovat energetickou hodnotu potravin a nepřispívat jejich složením ke kazivosti zubů⁸. Bohatost přírodních látek může přitom posloužit nejen jako zdroj pro farmaceutický průmysl, ale i jako inspirace pro průmysl potravinářský a chemický.

2. Proteiny

Thaumatin

Thaumatoin I a thaumatoin II jsou proteiny o téměř identické sekvenci; oba se skládají ze 207 aminokyselin

a liší se v pouhých pěti polohách. Jejich směs se získává z hmoty semenných míšků africké rostliny *Thaumatococcus daniellii* Benth (čeleď Marantaceae, marantovité) nazývané též katamfe a dále se nepurifikuje. V katamfe z některých oblastí Ghany⁹ výrazně převládá thaumatoin I a jako minoritní složka separovatelná ionexovou chromatografií nebo isoelektrickou fokusací se udává ještě thaumatoin O, který je méně bazický. Směs thaumatoinů je podle okolností 3000–15 000krát sladivější než sacharosa. Obvykle se získává ze zmražených plodů, v nichž může tvořit až více než polovinu obsahu všech proteinů. Gen pro thaumatoin II byl úspěšně exprimován ve více druzích rekombinantních organismů, např. *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans*, *Penicillium roquefortii* a *Aspergillus niger*, z nichž nejvyšší výtěžky poskytl *A. niger*^{10,11}. Thaumatoiny jsou dobře rozpustné ve vodě i ve směsích vody s alkoholem, snesou pasterizaci i krátkodobý var. Směs je schváleným potravinářským sladidlem v Evropě (E957). V USA je řazen mezi substance, jejichž využití v potravinách je považováno za bezpečné, a vedle přírodního thaumatoinu je na seznamu FDA (Food and Drug Administration) v kategorii GRAS (Generally Recognized As Safe) uveden i rekombinantní thaumatoin II (cit.^{11,12}).

Monellin

Monellin z plodů západoafrické liány *Dioscoreophyllum cumminsii* Diels. (čeleď Menispermaceae, chebulovité) je tvořen dvěma podjednotkami složenými ze 44 a 50 aminokyselin. Monellin, 3000krát sladší než sacharosa, je tepelně nestálý a je také citlivý vůči kyselým roztokům (při hodnotách pH pod 5,0 postupně degraduje), proto je jeho praktické využití omezené¹¹.

Brazzein a pentadin

Brazzein z plodů *Pentadiplandra brazzeana* Baillon (čeleď Capparaceae, kaparovité) je 1200krát sladší než sacharosa. Skutečnost, že jde o nejjednodušší (54 aminokyselin) z intenzivně sladkých přírodních proteinů a dále že je termostabilní, z něj činí vděčný předmět výzkumu zaměřeného jak teoreticky, tak na možné komerční využití. Gen pro brazzein byl izolován a úspěšně exprimován v bakterii *Escherichia coli* a kvasince *Saccharomyces cerevisiae*^{13,14}. Komerční využití se očekává od nedávno vytvořené transgenní kukuřice, v jejíž zrnech tvoří brazzein až 4 % všech rozpustných proteinů¹⁵.

Z dužniny *Pentadiplandra brazzeana* Baillon byl podle literatury izolován protein (12 kDa), který je 500krát sladší než sacharosa. Vzhledem ke svému zdroji byl nazván pentadin¹⁶. Může však jít o artefakt nebo i omyl autorů, protože jinak se v literatuře vyskytuje pentadin (sodná sůl kyseliny 2,3,4,5,5-pentachlor-2,4-pentadienové CAS

Tabulka I
Sladké proteiny

Protein	Podjednotky	Počet aminokyselin	m.h. [kDa]	Počet disulfidových můstků	Relativní sladivost	Pozn.
Thaumatococin I	1	207	22,2	8	3–15 tisíc (směs obou thaumatococinů)	E957
Thaumatococin II	1	207	22,2	8	3–15 tisíc (směs obou thaumatococinů)	E957
Monellin	2	44 + 50	10,7	0	3000	
Brazzein	1	54	6,5	4	1200	
Mabinlin I	2	32 + 72	12,3	4		
Mabinlin II	2	33 + 72	12,4	4	1000	
Mabinlin III	2	32 + 72	12,3	4		
Mabinlin IV	2	28 + 72	12,1	4		
Kurkulín	2	114 + 114	23	4	500	
Neokulín	2	114 + 113	23–24	4		
Mirakulín	4	191	24,6		sám je bez chuti	
Lysozym (slepičí)	1	211	14,4	4		

RN 61391-05-7), používaný jako agrochemikálie a defoliant. Bohužel, aby bylo toto zmatení kompletní, rešerše o sladkých proteinech citují tento defoliant mezi sladkými přírodními látkami¹⁷.

Mabinliny

Čtyři homologní sladké proteiny byly identifikovány v semenech jihočínské kapary *Capparis masaiikai*, která patří v místě svého výskytu mezi tradiční sladidla. Nejvíce zastoupený mabinlin II je tvořen dvěma podjednotkami o 33 a 72 aminokyselinách propojenými dvojicí disulfidových můstků, další dva disulfidové můstky stabilizují delší řetězec B. Je výjimečně termostabilní, beze změny vydrží i 48 hodinový var. Relativně termostabilní jsou i mabinlin III a IV, naproti tomu mabinlin I ztrácí chuť již po hodinovém zahřátí na 80 °C (cit.^{18,19}).

Kurkulín

Kurkulín z plodů malajské rostliny *Curculigo latifolia* (Liliaceae, liliovitě) je složen ze dvou identických polypeptidů o 114 aminokyselinách, propojených dvěma disulfidovými můstky²⁰. Je 500krát sladší než sacharosa a obdobně jako mirakulín (viz níže) převrací kyselou chuť na sladkou. Strukturální variantou je nedávno popsán neokulín^{21,22}. Jeho jeden peptidový řetězec je podjednotkou kurkulínu, druhý s ním vykazuje vysoký stupeň homologie (77 % aminokyselin identických), je o jednu aminokyselinu kratší a je glykosylovaný. Kurkulín je homologem lektinu vázajícího D-mannosu, který se nachází v řadě rostlinných taxonů, sám ale lektinovou aktivitu nemá²³.

Lysozym

Sladkou chuť vykazují v nativním stavu některé lysozymy. Tyto hydrolytické enzymy (EC 3.2.1.17) hrají důležitou roli při nespecifické obraně proti bakteriím. Přes významný stupeň homologie určitých domén jsou lysozymy z jednotlivých živočišných druhů značně rozdíly v aminokyselinovém složení a velikosti molekuly. Lysozym ze slepičích vaječných bílků je sladký při koncentracích nad 7 $\mu\text{mol l}^{-1}$, obdobně jsou vnímány i lysozymy husí, krocaní a želví, zatímco lidský lysozym je bez chuti. Redukce disulfidových můstků nebo tepelná denaturace ruší jak enzymovou aktivitu, tak i chuť slepičího lysozymu. Naproti tomu modifikace karboxylových skupin aminomethansulfonovou kyselinou způsobí ztrátu enzymové aktivity, ale chuť zůstane zachována²⁴.

Mirakulín

Mirakulín z bobulí západoafrického keře *Synsepalum dulcificum* (synonymum *Richardella dulcifica*, čeled' Sapotaceae, zapotovité) je glykoprotein o 119 aminokyselinách. Ačkoli je bez chuti, mění vnímání kyselé chuti ve sladkou. Jeho účinky jsou poměrně trvanlivé, změna vnímání chuti vyvolaná mirakulínem může trvat desítky minut¹¹.

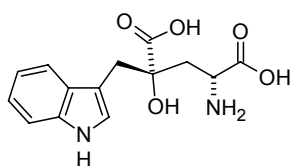
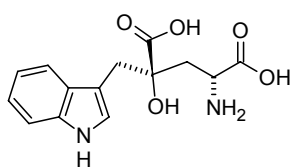
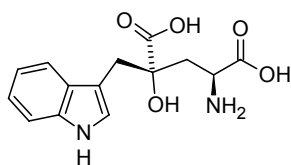
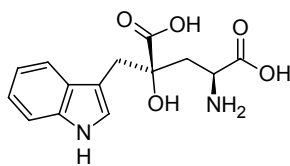
Struktura proteinů sladké chuti

Až na téměř identickou sekvenci obou thaumatococinů a vysoký stupeň homologie uvnitř skupiny mabinlinů nebyla nalezena žádná jasná strukturální souvislost mezi jednotlivými sladkými proteiny. V jejich primárních strukturních neexistují žádné společné sekvence, sladké proteiny

se liší jak velikostí, tak počty disulfidových můstků a dalšími strukturními prvky. Imunochemická data i počítačové modely svědčí o vzájemné podobnosti na úrovni terciárních struktur. Byly popsány monoklonální protilátky proti monellinu, které zkříženě reagovaly s thaumatinem²⁵, a jiná protilátka, která vedle kurkulínu reagovala i s mirakulinem²⁶. Je zřejmé, že o chuti proteinů rozhoduje rozložení kladně nabitých aminokyselin – L-lysinu, L-glutaminu a L-asparaginu. Pokud byly tyto aminokyseliny chemicky modifikovány (methylací lysinů), ztratily thau-
matin i monellin chuť²⁷. U brazzeinu se podařilo vytvořit výrazně sladší analogy záměnou záporně nabitě kyseliny L-asparagové za neutrální nebo kladně nabitě aminokyseliny v určitých místech molekuly (mutace Asp29Ala, Asp29Asn, Asp29Lys, Glu41Lys), obdobná modifikace na jiném místě (mutace Glu36Ala, Glu36Gln, Glu36Lys) naopak vedla k mutantům zcela bez chuti²⁸. Ze šesti molekul L-lysinu a šesti L-argininu přítomných ve slepičím lysozymu se pro chuť jeví důležité Lys13, Lys96, Arg14, Arg21 a Arg73, jejichž záměna za L-alanin nebo chemická modifikace vedly ke ztrátě sladkosti²⁹.

3. Deriváty aminokyselin

Monatin, derivát kyseliny glutamové 1200–1400krát sladší než sacharosa, byl izolován z kořenů keře *Sclerochiton ilicifolius* (čeleď Acanthaceae, paznechtíkovité) vyskytujícího se v hornatých oblastech jihoafrické provincie Transvaal³⁰. Jeho struktura byla stanovena jako (2*S*,4*S*)-4-hydroxy-4-(indol-3-yl)methylglutamová kyselina. Všechny čtyři možné stereoisomery monatinu byly nedávno připraveny synteticky³¹. Intenzivně sladké byly tři z nich (2*R*,4*S*; 2*R*,4*R*; 2*S*,4*S*), zatímco (2*S*,4*R*)-monatin byl

(2*R*,4*S*)-monatin(2*R*,4*R*)-monatin(2*S*,4*S*)-monatin(2*S*,4*R*)-monatin

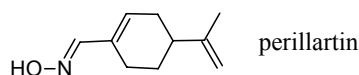
bez chuti. Souběžně byl analyzován preparát monatinu extrahovaný z přírodního zdroje a proti původnímu popisu byl ve směsi identifikován jako majoritní stereoisomer (2*R*,4*R*). Od roku 2002 byla v souvislosti se syntézou monatinu a jeho možným využitím jako průmyslového sladidla podána řada patentových přihlášek.

4. Terpeny

Monoterpeny

Perillartin

Látka podobná limonenu, perillartin, používaná ve voňavkářství má sladkou chuť a někdy je považován za stimulator mozkové činnosti. Nachází se v *Perilla frutescens* (L.) Britton (čeleď Lamiaceae, hluchavkovité)³².

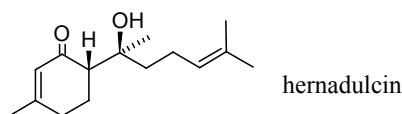


perillartin

Udává se, že je 350krát sladší než sacharosa, používá se v Japonsku ke slazení tabáku a chuťovým úpravám kávy. Jeho použití v potravinářství limituje hořká pachut' (aftertaste) a nízká rozpustnost ve vodě.

Seskviterpeny

V roce 1985 byl izolován z listů a květů mexické rostliny *Lippia dulcis* Trevir (Verbenaceae, sporýšovité) intenzivně sladký seskviterpen hernandulcin (1000krát sladší než sacharosa). V odrůdě stejného druhu získané v Panamě identifikovali v roce 1992 ještě jeho další sladký derivát, (+)-4β-hydroxyhernandulcin^{33–35}. Hernandulcin je potentní sladidlo, je ale málo rozpustný v polárních rozpouštědlech a je termolabilní. Kromě toho vykazuje podchuť a hořký chuťový dozvuk³⁶. Jako chuťový princip oplodí jihoasijského stromu *Sapindus rarak* (mýdelník, čeleď Sapindaceae, mýdelníkovité) byl identifikován seskviterpenový glykosid mukuroziosid IIb, jenž sladkostí odpovídá sacharose a v plodech raraku je obsažen³⁷ v koncentraci více než 6 %.

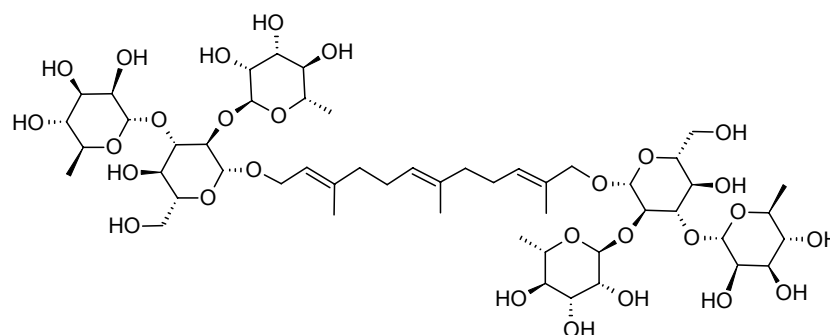


hernandulcin

Diterpeny

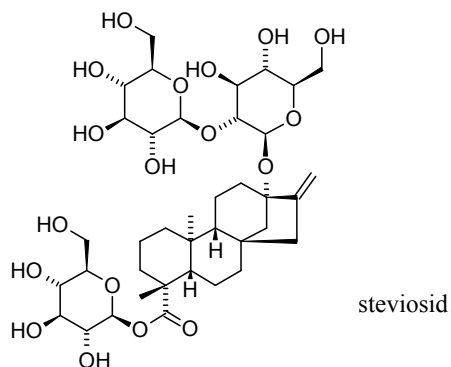
Steviosid

Stevia rebaudiana (čele Astraceae, hvězdnicovité) je z rostlin poskytujících sladidla s terpenovou strukturou komerčně nejvýznamnější. Tato trvalka s nevýraznými drobnými květy a množstvím podlouhlých vroubkovaných lístků pochází z Brazílie a Paraguaye. Nyní se pěstuje také v Izraeli, Japonsku, Koreji, Číně a některých dalších zemích³⁸. Chuťovými principy stvie jsou glykosidy diterpenů



mukuroziosid IIb

ent-kaurenového typu: steviosid, rebaudiosidy A až D a dulkosidy A a C, jejichž obsah v sušině listů může dosahovat 4–20 %. Nejvýznamnější z nich, steviosid, je 200 až 300krát sladší než sacharosa, bez vedlejších chuťových dozvuků. Drcené lístky, jednoduše připravené extrakty nebo i rafinovaný steviosid se používají jako sladidlo, které je nekalorické, nepřispívá k zubnímu kazu a je vhodné např. pro diabetiky, osoby s vysokým krevním tlakem nebo pacienty s fenylketonurií. V roce 2001 se na světových trzích (převážně Japonsko, Korea, Čína, Brazílie) uplatnilo 1250 tun stevie (odpovídá sladivému ekvivalentu 250 000 tun cukru) v celkové ceně 63 mil EUR. K její oblíbě přispívá jak široké spektrum možných aplikací umožněné stabilitou steviosidu, tak i renomé přírodní látky a skutečnost, že po sacharinu je stevie nejlevnějším sladidlem (šestkrát levnější než sacharosa, vyjádřeno v ekvivalentech sladivosti)³⁸.



steviosid

V Evropě i v USA brání využívání stevie legislativní překážky. Evropská komise jednala o stevii a steviosidu v roce 2000 a odmítla je uznat za nové potraviny kvůli nedostatku dat prokazujících jejich bezpečnost. V USA se od roku 1995 se stevii v omezeném množství obchoduje. Díky určité mezeře v legislativě může být nabízena a prodávána jako „přírodní potravní doplněk“³⁹. Nebyla však schválena FDA, a proto nesmí být propagována a prodávána jako sladidlo. FDA na dodržování tohoto omezení přísně dbá a ty, kdo je přestoupí, důrazně napomíná, případně trestá pokutami, došlo už prý i na zabavení nákladu kuchařské knihy.

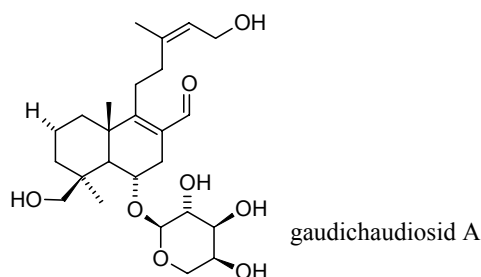
V současnosti bylo publikováno několik studií, které

naznačují, že stevie by se mohla stát podpurným léčivem při diabetu II. typu. U laboratorních potkanů steviosid zlepšoval parametry glykemické křivky a snižoval rozsah vrozené nebo streptozotocinem vyvolané rezistenci vůči insulinu. Rebaudiosid A stimuloval sekreci insulinu β -buňkami Langerhansových ostrůvků *in vitro* (cit.^{40–45}).

Glykosidy odvozené od steviolu byly identifikovány jako sladké principy rovněž v několika druzích ostružiníků (*Rubus* sp., Rosaceae, růžovité) využívaných v čínském lidovém léčitelství a k přípravě bylinných čajových směsí⁴⁶. Samotný steviosid byl nalezen též v taxonu *Stevia phlebophylla* A. Gray⁴⁷, jako v jediném dalším zástupci ze 108 druhů rodu *Stevia*.

Gaudichaudiosid A

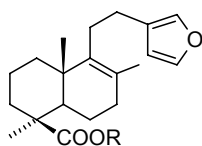
Z paraguayské léčivé rostliny *Baccharis gaudichaudiana* (čeleď Astraceae, hvězdnicovité) byl⁴⁸ v roce 1991 izolován sladký terpenový glykosid labdanového typu, gaudichaudiosid A. Je 55krát sladší než sacharosa, dostatečně rozpustný ve vodě, má příjemnou chuť. Je ale doprovázen strukturně obdobnými gaudichaudiosidy B–E, které jsou hořkosladké. Jiné druhy rodu *Baccharis* jsou hořké. *B. gaudichaudiana* bývá v lidovém léčitelství používána při léčení diabetu.



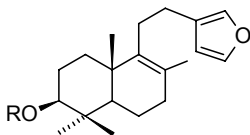
gaudichaudiosid A

Baiyunosid a flomisosidy

Kořeny léčivých rostlin *Phlomis younghusbandii* a *P. medicinalis* (čeleď Lamiaceae, hluchavkovité) jsou v tradičním léčitelství Tibetu a západního Sečuanu používány jako antipyretika a antitusika, příbuzný druh *P. betonicoides* je v podobných indikacích využíván v Číně. Vedle jiných látek z nich byly izolovány sladké diterpeny furanolabdanového typu⁴⁹ baiyunosid a flomisosid I.



baiyunosid I R = Glc - Xyl
baiyunosid II R = Glc - Rha



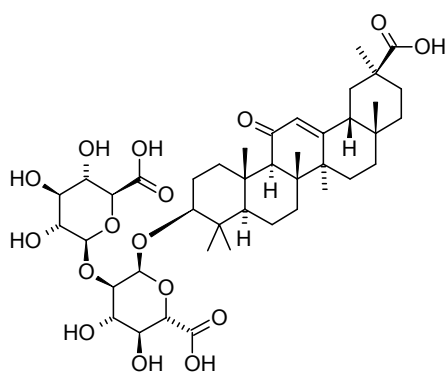
flomisosid I R = Glc - Xyl
flomisosid II R = Glc - Rha
flomisosid III R = Glc - Glc

Triterpeny

Glycyrrhizová kyselina

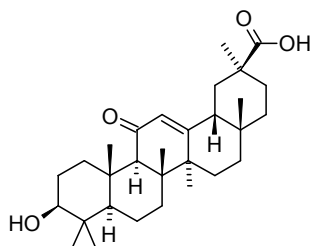
Lékořici lysou (*Glycyrrhiza glabra*, čeled' Fabaceae, bobovité) a několik příbuzných druhů (např. *G. echinata*, *G. uralensis*) lidstvo využívá více než dva tisíce let jednak jako léčivé rostliny, jednak k přípravě cukrovinek a k ochucování pokrmů a nápojů. Lékořici je např. věnována stať v Mathioliho herbáři (česky 1562). Sladkost lékořice je způsobena antivirálně a antifungálně působící kyselinou glycyrrhizovou, diglukuronosidem, jehož triterpenový aglykon oleananového typu se nazývá kyselina glycyrrhetinová (popř. 18-β glycyrrhetinová kyselina, enoxolon, glycyrrhetin), která se m.j. užívá jako protizánětlivé léčivo. Její obsah v kořenech lékořice může dosahovat až 14 % sušiny.

Kyselina glycyrrhizová je 100–200krát sladší než sacharosa ale má znatelnou lékořicovou příchut'. Jako sladidlo se využívá amonná sůl kyseliny glycyrrhizové; obchod s touto komoditou dosáhl v asijských zemích v roce 2003 objemu 1000 tun v ceně 50 mil EUR. Kyselina gly-



glycyrrhizová kyselina

glycyrrhetinová kyselina

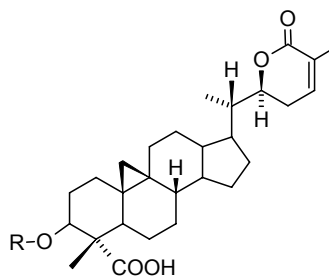


cyrrhizová je účinným inhibitorem několika isoenzymů cytochromu P450. Fyziologicky nejvýznamnější je inhibice dehydrogenasy 11-β hydroxysteroidů. Glycyrrhetová kyselina bývá v laboratorních studiích často využívána jako modelový inhibitor tohoto enzymu. U vnímavých osob může glycyrrhizová kyselina způsobit závažnou poruchu v hospodaření s minerály – tzv. syndrom zdánlivého nadbytku mineralokortikoidů (Apparent Mineralocorticoid Excess, AME)⁵⁰. V Evropě ani v USA její používání není schváleno.

Abrusosidy

Sotorek obecný (*Abrus precatorius*, čeled' Fabaceae, bobovité) je popínavá rostlina původem z tropů a subtropů Asie, roste ale i v Americe a Africe. Na sladkost jeho listů a kořenů upozorňuje jeden z anglických názvů – Indian licorice. Z listů sotorku a z příbuzného druhu *A. fruticulosus* byla izolována pětice sladkých glykosidů odvozených od téhož aglykonu oleananového typu, abrusogeninu. Abrusosidy A-D vykazují 30–100krát vyšší sladivost než sacharosa. Jejich sladkost je mírně opožděná, bez nepříjemných vedlejších tónů a bez hořkosti. Abrusosid E je jenom slabě nasládlý, ale jeho semisyntetický 6-O-monomethylester je 150krát sladší než sacharosa^{51,52}.

Kromě abrusosidů je sotorek zdrojem řady dalších významných biologicky aktivních látek. Některé jeho terpenové saponiny působí protizánětlivě. Extrakty ze stonků a kořenů používají léčitelé v Zimbabwe jako relativně účinný prostředek proti schistosomiáze. Semena obsahují čtveřici toxických proteinů, abrinů A až D, které se stavbou i funkcí podobají ricinu a spolu s ním patří mezi nejpřudší bílkovinné jedy vůbec. Skládají se ze dvou podjednotek. Lektinová podjednotka zodpovídá za navázání abrinu na povrch buňky a za vyvolání jeho internalizace, druhou podjednotkou je specifická ribonukleasa, která štěpí ribosomální RNA. Smrtící dávka abrinu při parenterálním podání je 10–30 μg kg⁻¹ (cit.⁵⁴). Přestože je takto jedovatý, pestrá semena sotorku se často používají k výrobě dekorativních předmětů – náramků, náhrdelníků a amuletů. Použití sotorku jako zdroje sladkých látek je tedy problematické.



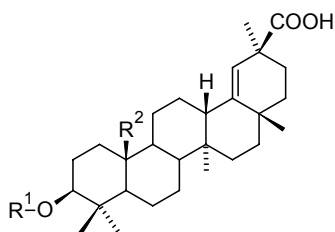
abrusosid A R = Glcβ-
abrusosid B R = GlcA6Meβ-2Glcβ-
abrusosid C R = Glcβ-2Glcβ-
abrusosid D R = Glcβ-2GlcAβ-
abrusosid E R = GlcAβ-2Glcβ-

Tabulka II
Sladké terpeny

Terpeny	Typ	Výskyt	m.h.	Relativní sladivost	Pozn.
Hernandulcin	seskviterpen	<i>Lippia dulcis</i> (Verbenaceae)	236	1000	
Mukuroziosid	seskviterpen	<i>Sapindus rarak</i> (Sapindaceae)	1147	1	
Gaudichaudiosid A	seskviterpen	<i>Baccharis gaudichaudiana</i> (Astraceae)	468	55	
Steviosid	diterpen	<i>Stevia rebaudiana</i> (Astraceae)	805	200	
Baiyunosid	diterpen	<i>Phlomis betonicoides</i> , <i>P. younghusbandii</i> , <i>P. medicinalis</i> (Lamiaceae)	587	250	
Phlomisosid I	diterpen	<i>Phlomis betonicoides</i> , <i>P. younghusbandii</i> , <i>P. medicinalis</i> (Lamiaceae)	611		
Abrusosid A	triterpenový glykosid	<i>Abrus precatorius</i> , <i>Abrus fruticulosus</i> (Fabaceae)	646	30	
Abrusosid B	triterpenový glykosid	<i>Abrus precatorius</i> , <i>Abrus fruticulosus</i> (Fabaceae)	836	100	
Abrusosid C	triterpenový glykosid	<i>Abrus precatorius</i> , <i>Abrus fruticulosus</i> (Fabaceae)	808	50	
Abrusosid D	triterpenový glykosid	<i>Abrus precatorius</i> , <i>Abrus fruticulosus</i> (Fabaceae)	806	75	
Periandrin I - V	triterpenový glykosid	<i>Periandra dulcis</i> (Fabaceae)	806	100–200	
Pterokaryosid A	triterpenový glykosid	<i>Pterocarya paliurus</i> (Juglandaceae)	636	50	
Pterokaryosid B	triterpenový glykosid	<i>Pterocarya paliurus</i> (Juglandaceae)	622	100	
Mogrosid V	triterpenový glykosid	<i>Siraitia grosvenori</i> (Cucurbitaceae)	1286	400	
Carnosiflosid V, IV	triterpenový glykosid	<i>Hemsleya carnosiflora</i> (Cucurbitaceae)	944		
Glycyrrhizin	triterpenový glykosid	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Fabaceae)	822	100	E958

Periandriny

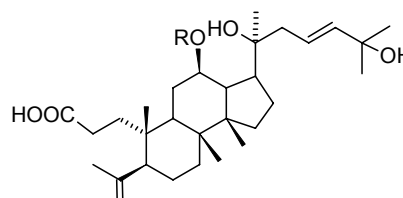
Série sladkých glykosidů s aglykonem oleananového typu byla izolována z kořenů brazilské rostliny *Periandra dulcis* (čeleď Fabaceae, bobovité). Periandriny I až IV jsou 90–100krát sladší než sacharosa, periandrin V je 200krát sladší^{55,56}.



periandrin I $R^1 = \text{Glc}\beta\text{-2GlcA}\beta\text{-}$ $R^2 = \text{CHO}$
 periandrin II $R^1 = \text{Xyl}\beta\text{-2GlcA}\beta\text{-}$ $R^2 = \text{CHO}$

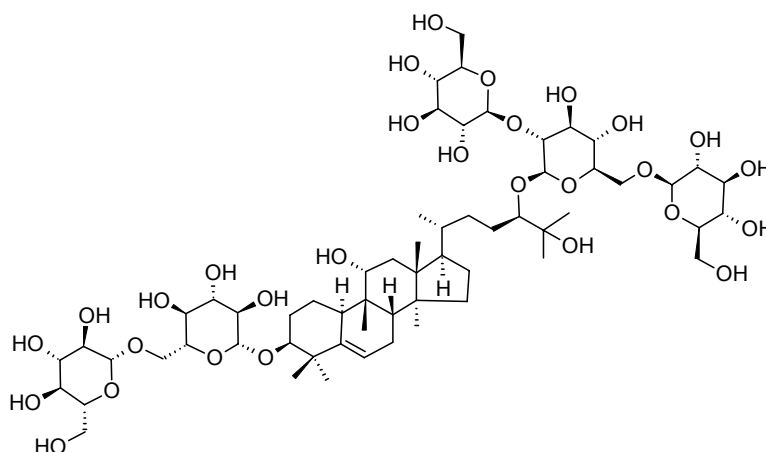
Pterokaryosidy

Listy jihočínského stromu *Pterocarya paliurus* (čeleď Juglandaceae, ořešákovité) patří v oblasti jeho přirozeného výskytu mezi tradiční sladidla. V roce 1995 z nich byly izolovány dva glykosidy (arabinosid a isorhamnosid) odvozené od téhož 3,4-*seco*-dammaranového aglykonu, pterokaryosidy A a B. Alternativní název je cyklokaryosid A a B, podle druhé varianty latinského názvu rostliny *Cyclocarya paliurus*. Jsou 50–100krát sladší než sacharosa, oba se však vyznačují mírně hořkým chuťovým dozvukem^{52,57}.



Pterokaryosid A $R = \text{Qui}\beta\text{-}$
 Pterokaryosid B $R = \text{L-Ara}\alpha\text{-}$

mogrosid V



Kukurbitanoglykosidy

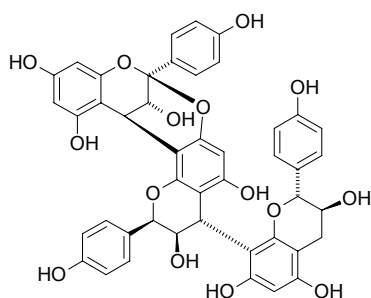
Momordica grosvenori Swingle (čeleď Cucurbitaceae, tykvovité), synonyma *Thladiantha grosvenori*, *Siraitia grosvenori* je tykvovitá rostlina⁵⁸, která se pěstuje v jihočínské provincii Guangxi pro plody nazývané *Lo Han Kuo*. Tyto plody se používají sušené, případně se z nich připravují vodně-ethanolové extrakty. Sladkými sloučeninami z *Lo Han Kuo* jsou kukurbitanové glykosidy nazývané mogrosidy. V oplodí je jejich obsah vyšší než v dužnině. Nejvýznamější, mogrosid V je 400krát sladší než sacharosa, minoritní siamensid I dokonce 560krát (viz.⁵⁹). V poslední době je mogrosid V studován pro své potenciální protizánětlivé a antioxidační účinky^{60,61}. Sladké triterpeny kukurbitanového typu byly nalezeny také v dalších zástupcích čeledi tykvovitých, rostlinách druhu *Hemsleya carnosiflora* a *H. panacis-scandens*^{62,63}.

5. Flavonoidy, chalkony a deriváty kumarinu

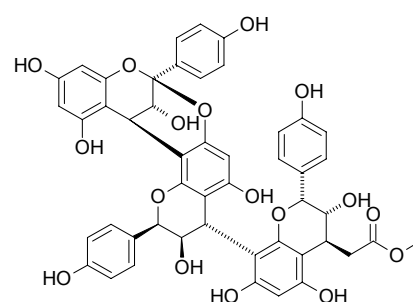
Selligueainy

Pokud mají flavonoidy nějakou chuť, patří většinou mezi látky hořké nebo mírně adstringentní (svíravé), nicméně i v této skupině se vyskytují sloučeniny sladké chuti.

Selligueain, který byl ve vysokém výtěžku (0,7 %) izolován z oddenků *Selliguea feii* syn. *Polypodium feii* (čeleď Polypodiaceae, osladičovitě), patří mezi trimerické proanthocyanidiny. Je 35krát sladší než sacharosa, bez výrazné hořké nebo trpké podchuti. Tato látka byla identifikována v dalších pěti druzích rodu *Polypodium* rostoucích v Hondurasu⁶⁴.



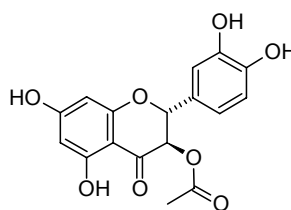
selligueain A



selligueain B

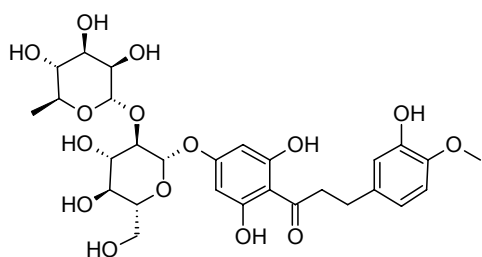
(+)-3-O-Acetyldihydrokvercetin

Čtyři sladké dihydroflavonoly byly identifikovány v bylině *Hymenoxys turneri* (Compositae)⁶⁵. Nejintenzivnější sladkou chuť, odpovídající osmdesátinásobku sladkosti sacharosu, vykazoval (2*R*,3*R*)-dihydrokvercetin-3-acetát [(+)-3-*O*-acetyldihydrokvercetin]. Jeho výskyt byl zaznamenán i v dalších zástupcích čeledi Astraceae – paraguayské léčivé rostlině *Tessaria dodoneifolia*⁶⁶ a v druzích *Baccharis varlans*⁶⁷ a *Inula viscosa*⁶⁸.

(2*R*,3*R*)-dihydrokvercetin-3-acetát

Dihydrochalkon neohesperidinu

Glykosidy flavanonů se podílejí na hořkých chutích řady citrusových plodů. V kůře bigarádie neboli sevillských pomerančů (*Citrus aurantium*) se nachází neohesperidin, podstatu hořkosti grapefruitů (*Citrus paradisi*) dodává podobný naringin. V roce 1963 byly připraveny⁶⁹ jejich alkalickou hydrolyzou a následnou katalytickou hydrogenací na paladiu sladké dihydrochalkony. Dihydrochalkon

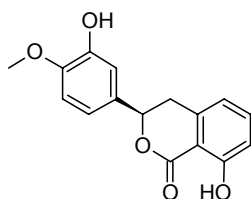


dihydrochalcon neohesperidinu

neohesperidinu (neohesperidin DHC) je 1000krát sladší než sacharosa, ale má znatelnou lékořicovou příchut'. Je termostabilní a relativně odolný i vůči kyselé hydrolyze až do pH 2. Je schváleným sladidlem v EU (E959), v USA je řazen do kategorie GRAS. Používá se často v kombinaci s jinými sladidly⁷⁰, zejména v nápojích, džemech, potravinách s podílem ovoce (jogurty apod.), žvýkacích gumách, léčivých přípravcích aj.

Fylodulcin

Jako derivát kumarinu je prezentován fylodulcin (phylodulcin) z listů *Hydrangea macrophylla* Seringe var. *thunbergii* (Siebold) Makino (Saxifragaceae, lomikámenovitě), ze kterých se v Japonsku vaří čaj. Fylodulcin je 400krát sladší než sacharosa, jako sladidlo se nepoužívá pro hořkou pachut' a malou rozpustnost ve vodě.



fylodulcin

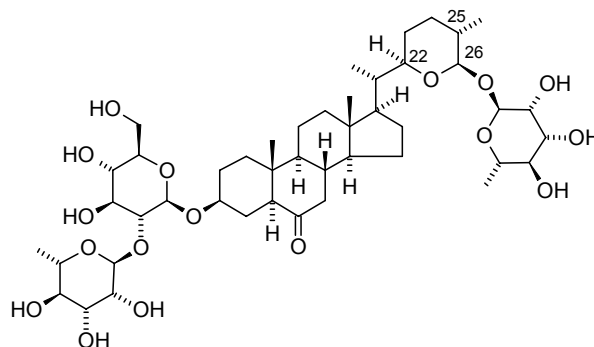
6. Steroidy

Steroidní saponiny

Osladič obecný (*Polypodium vulgare*, čeleď Polypodiaceae, osladičovitě) je tradiční středoevropská léčivá rostlina zmiňovaná již v Mathioliho herbáři. Lze připomenout, že rod *Polypodium* je chráněným taxonem.

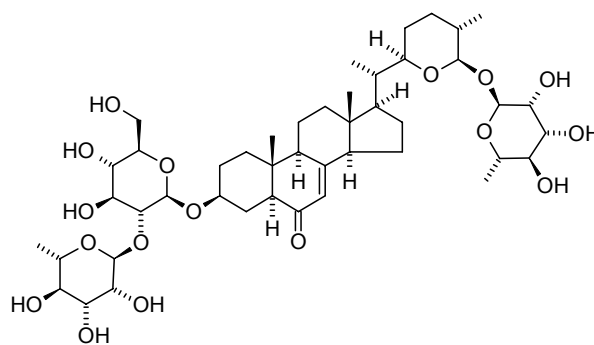
Z oddenku osladiče s kořeny byl r. 1970 v Ústavu

organické chemie a biochemie ČSAV v Praze izolován steroidní glykosid osladin⁷¹. Jeho struktura byla stanovena o čtyři roky později⁷², ovšem později se ukázalo, že s několika nepřesnostmi. Původně popsána látka byla v roce 1992 připravena synteticky, tento preparát však při senzoričkových testech nevykazoval žádnou chuť. Nová izolace osladinu z přírodního materiálu umožnila revizi struktury⁷³ na konfiguraci 22*R*,25*S*,26*R* z původně předpokládané 22*S*,25*R*,26*S*.



osladin, revidovaná struktura

Z oddenků severoamerického osladiče *Polypodium glycyrrhiza* byly izolovány steroidní saponiny obdobné struktury jako osladin, které byly pojmenovány polypodosidy. Polypodosidy jsou 600krát sladší než sacharosa, netoxické a nejsou mutagenní, jejich obsah v oddencích⁷⁵ je však relativně nízký (do 0,3 %).



polypodosid A

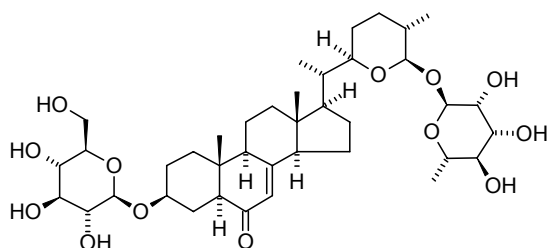
Tabulka III

Sladké steroidy

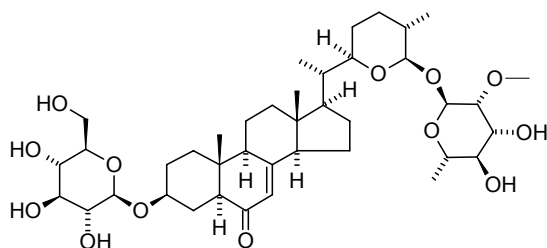
Steroidy	Typ	Výskyt	m.h.	Relativní sladivost
Osladin	Steroidní saponiny	<i>Polypodium vulgare</i> (Polypodiaceae)	887	500
Polypodosid	Steroidní saponiny	<i>Polypodium glycyrrhiza</i>	885	600
Telosmosid A ₁₅	Polyoxypregnanové glykosidy	<i>Telosma procumbens</i> (Asclepiadaceae)	1378	1000

Tabulka IV
Sladké flavonoidy a dihydrochalkony

Flavonoidy a dihydrochalkony	Typ	Výskyt	m.w.	Relativní sladivost	Pozn.
(+) dihydrokvercetin -3- acetát	flavonoid	<i>Tessaria dodoneliifolia</i> , <i>Hymenoxios turneri</i> , <i>Inula viscosa</i> (Astraceae)	346	80	
Selliguaein A	flavonoid	<i>Polypodium feii</i> (Polypodiaceae)	816	35	
Neohesperidin DHC	dihydrochalkon	polosyntetický, z <i>Citrus aurantium</i> (Rutaceae)	582	1000	E959



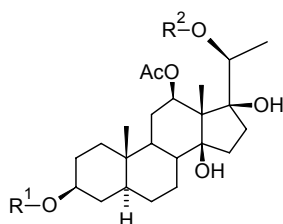
polyposid B



polyposid C

Polyoxypregnan y

Ve vietnamské léčivé rostlině *Telosma procumbens* (čeleď Asclepiadaceae, tolitovitě), která je v tradičním léčitelství používána jako expektorans, antitusikum a náhražka lékořice, bylo identifikováno 18 glykosidů odvozených od stejného polyoxypregnanového aglykonu (telosmosidy A₁-A₁₈). Jedenáct z nich je sladkých, jeden hořký (telosmosid A₂) a šest je bez chuti. Nejvíce zastoupený telosmosid A₁₅ je 1000krát sladší než sacharosa. Jeho sumární vzorec je C₆₈H₁₁₃O₂₈, kromě aglykonu obsahu-

telosmosidy A₁-A₁₈

je ve své molekule cymarosu, oleandrosu, digitoxosu, 6-deoxy-3-*O*-methylallosu a D-glukosu. Z lodyh telosmy byl izolován ve výtěžku přes 1 %. Sladivost minoritních telosmosidů A₈-A₁₄ a A₁₆-A₁₈ nebyla přesně stanovena⁷⁶.

7. Závěr

Přehled přírodních necukerných látek sladké chuti ukazuje zajímavost této skupiny obnovitelných materiálů, přispívá k poznání biodiversity sekundárních metabolitů a může přispět k inspiraci, např. potravinářských a farmaceutických chemiků při hledání nových možností využití takových látek v praxi.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM6046137305. Dále si dovoluují poděkovat doc. RNDr. Lubomiru Opletalovi, CSc. za pomoc při správném použití botanických názvů a termínů.

LITERATURA

- Čopíková J., Lapčík O., Uher M., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 100, 778 (2006).
- Fišar Z.: Chem. Listy 100, 233 (2006).
- Fišar Z.: Chem. Listy 100, 314 (2006).
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 100, 495 (2006).
- Benešová E., Marková M., Lipovová P., Králová B.: Chem. Listy 99, 324 (2006).
- Harmatha J.: Chem. Listy 99, 622 (2006).
- Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99, 802 (2006).
- Hamilton-Miller J. M. T.: J. Med. Microbiol. 50, 299 (2001).
- Mackenzie A., Pidham J. B., Saunders N. A.: Phytochemistry 24, 2503 (1985)
- Faus I., del Moral C., Adroer N., del Rio J. L., Patino C., Sisniega H., Casas C., Blade J., Rubio V.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, 393 (1998).
- Faus I.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 145 (2000).
- <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html> (staženo 15.2.2006).
- Guan ZY, Hellekant G, Yan W: Chem. Senses 20, 99

- (1995).
14. Assadi-Porter F. M., Aceti D. J., Cheng H., Markley J. L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 252 (2000).
 15. Lamphear B. J., Barker D. K., Brooks C. A., Delaney D. E., Lane J. R., Beifuss K., Love R., Thompson K., Mayor J., Clough R., Harkey R., Poage M., Drees C., Horn M. E., Streatfield S. J., Nikolov Z., Woodard S. L., Hood E. E., Jilka J. M., Howard J. A.: *Plant. Biotechnol. J.* 3, 103 (2005).
 16. Van der Wel H., Larson G., Hladik A., Hladik C. M., Hellekant G., Glaser D.: *Rhoon, Neth. Chemical Senses* 14, 75 (1989); *Chem. Abstr.* 110, 171932 (1989).
 17. Kant R.: *Nutrition J.* 4, 5 (2005).
 18. Nirasawa S., Liu X., Nishino T., Katahira M., Uesugi S., Hu Z., Kurihara Y.: *Eur. J. Biochem.* 223, 989 (1994).
 19. Nirasawa S., Liu X., Nishino T., Kurihara Y.: *Biochim. Biophys. Acta* 1202, 277 (1993).
 20. Yamashita H., Theeraslip P., Aiuchi T., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y.: *J. Biol. Chem.* 265, 15770 (1990).
 21. Shirasuka Y., Nakajima K., Asakura T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1403 (2004).
 22. Suzuki M., Kurimoto E., Nirasawa S., Masuda Y., Hori K., Kurihara Y., Shimba N., Kawai M., Suzuki E. I., Kato K.: *FEBS Lett.* 573, 135 (2004).
 23. Barre A., VanDamme E. J. M., Peumans W. J., Rouge P.: *Plant Molec. Biol.* 33, 691 (1997).
 24. Masuda T., Ueno Y., Kitabatake N.: *J. Agric. Food. Chem.* 49, 4937 (2001).
 25. Antonenko S., Zanetti M.: *Life Sci.* 55, 1187 (1994).
 26. Nakajo S., Akabane T., Nakaya K., Nakamura Y., Kurihara Y.: *Biochim. Biophys. Acta* 1118, 293 (1992).
 27. Suami T., Hough L., Machinami T., Watanabe N.: *Food Chem.* 56, 275 (1996).
 28. Jin Z., Danilova V., Assadi-Porter F. M., Aceti D. J., Markley J. L., Hellekant G.: *FEBS Lett.* 544, 33 (2003).
 29. Masuda T., Ide N., Kitabatake N.: *Chem. Senses* 30, 667 (2005).
 30. Vleggaar R., Ackerman L. G. J., Steyn P. S.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1992, 3095.
 31. Bassoli A., Borgonovo G., Busnelli G., Morini G., Drew M. G. B.: *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 1652.
 32. Uher M., Wojtowicz H.: *Wiadom. Chem.* 57, 505 (2003).
 33. Compadre C. M., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D., Kamath S. K.: *Science* 227, 417 (1985).
 34. Kaneda N., Lee I. S., Gupta M. P., Soejarto D. D., Kinghorn A. D.: *J. Nat. Prod.* 55, 1136 (1992).
 35. Compadre C. M., Robbins E. F., Kinghorn A. D.: *J. Ethnopharmacol.* 1986, 1589.
 36. Kinghorn A. D., Soejarto D. D.: *Pure Appl. Chem.* 74, 1169 (2002).
 37. Chung M. S., Kim N. C., Long L., Shamon L., Ahmad W. Y., Sagrero-Nieves L., Kardono L. B. S., Kennelly E. J., Pezzuto J. M., Soejarto D. D., Kinghorn D. D.: *Phytochem. Anal.* 8, 49 (1997).
 38. <http://www.uni-hohenheim.de/~www440/VTP/stevia/B0/B5> (staženo 15.2.2006).
 39. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fdsugar.html> (staženo 15.2.2006).
 40. Geuns J. M. C.: *Phytochemistry* 64, 913 (2003).
 41. Dyrskog S. E., Jeppesen P. B., Colombo M., Abudula R., Hermansen K.: *Metabolism* 54, 1181 (2005).
 42. Chang J. C., Wu M. C., Liu I. M., Cheng J. T.: *Horm. Metab. Res.* 37, 610 (2005).
 43. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fdsugar.html> (staženo 15.2.2006).
 44. <http://www.fda.gov/> (staženo 15.2.2006).
 45. Abudula R., Jeppesen P. B., Rolfsen S. E. D., Xiao J. Z., Hermansen K.: *Metabolism Clin. Exp.* 53, 1378 (2004).
 46. Ohtani K., Aikawa Y., Kasai R., Chou W. H., Yamasaki K., Tanaka O.: *Phytochemistry* 31, 1553 (1992).
 47. Kinghorn A. D., Soejarto D. D., Nanayakkara N. P., Compadre C. M., Makapugay H. C., Hovanec-Brown J. M., Medon P. J., Kamath S. K.: *J. Nat. Prod.* 47, 439 (1984).
 48. Fullas F., Hussain R. A., Bordas E., Pezzuto J. M., Soejarto D. D., Kinghorn A. D.: *Tetrahedron* 47, 8515 (1991).
 49. Katagiri M., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Yang C.-R., Tanaka O.: *Phytochemistry* 35, 439 (1994).
 50. Stormer F. C., Reistad R., Alexander J.: *Food Chem. Toxic.* 31, 303 (1993).
 51. Kinghorn A. D., Kaneda N., Baek N. I., Soejarto D. D.: *Med. Res. Rev.* 18, 347 (1980).
 52. Kenelly E. J., Cai L., Long L., Shamon L., Zaw K., Zhou B. N., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 2602 (1995).
 53. Lin J. Y., Lee T. C., Hu S. T., Tung T. C.: *Toxicol.* 19, 41 (1981).
 54. Lin J. Y., Lee T. C., Hu S. T., Tung T. C.: *Toxicol.* 19, 41 (1981).
 55. Suttisiri R., Chung M. S., Kinghorn A. D., Sticher O., Hashimoto Y.: *Phytochemistry* 34, 405 (1993).
 56. Kinghorn A. D., Kaneda N., Baek N. I., Kennelly E. J., Soejarto D. D.: *Med. Res. Rev.* 18, 347 (1998).
 57. Kinghorn A. D., Soejarto D. D.: *Pure Appl. Chem.* 74, 1169 (2002).
 58. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/articles/momordica%20swingle.html> (staženo 8.2.2006).
 59. Chen J. C., Chiu M. H., Nie R. L., Cordell G. A., Qiu S. X.: *Nat. Prod. Rep.* 22, 386 (2005).
 60. Hossen M. A., Shinmel Y., Jiang S., Takubo M., Tsumuro T., Murata Y., Sugiura M., Kamei C.: *Biol. Pharm. Bull.* 28, 238 (2005).
 61. Takasaki M., Konoshima T., Murata Y., Sugiura M., Nishino H., Tokuda H., Matsumoto K., Kasai R., Yamasaki K.: *Cancer Lett.* 198, 37 (2003).
 62. Kasai R., Matsumoto K., Nie R. L., Morita T., Awazu A., Zhou J., Tanaka O.: *Phytochemistry* 26, 1371 (1987).
 63. Kubo H., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Nie R.

- L., Tanaka O.: *Phytochemistry* 41, 1169 (1996).
64. Baek N. I., Chung M. S., Shamon L., Kardono L. B. S., Tsauri S., Padmawinata K., Pezzuto J. M., Soejarto D. D., Kinghorn A. D.: *J. Nat. Prod.* 56, 1532 (1993).
65. Gao F., Wang H., Mabry T. J., Kinghorn A. D.: *Phytochemistry* 29, 2865 (1990).
66. Nanayakkara N. P. D., Hussain R. A., Pezzuto J. M., Soejarto D. D., Kinghorn A. D.: *J. Med. Chem.* 31, 1250 (1988).
67. Bohlmann F., Zdero C., Grenz M., Dhar A. K., Robinson H., King R. M.: *Phytochemistry* 20, 281 (1981).
68. Grande M., Piera F., Cuenca A., Torres P., Bellido I. S.: *Planta Med.* 51, 414 (1985).
69. Horowitz R. M., Gentili B.: U.S. Patent 3,087,821 (1963).
70. Tomás-Barberán F. A., Borrego F., Ferreres F., Lindley M. G.: *Food Chem.* 52, 263 (1995).
71. Jizba J., Dolejš L., Herout V., Šorm F., Felhaber H. W., Snatzke F., Tschesche R., Wulff G.: *Chem. Ber.* 104, 837 (1971).
72. Havel M., Černý V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 40, 1579 (1975).
73. Yamada H., Nishizawa M., Ktayama C.: *Tetrahedron Lett.* 33, 4009 (1992).
74. Yamada H., Nishizawa M., Ktayama C.: *Tetrahedron Lett.* 33, 4009 (1992).
75. Kim J. W., Kinghorn A. D.: *Phytochemistry* 28, 1225 (1989).
76. Huan V. D., Ohtani K., Ksai R., Yamasaki K., Tuu N. V.: *Chem. Pharm. Bull.* 49, 453 (2001).

O. Lapčík^a, J. Čopíková^b, M. Uher^c, J. Moravcová^a, and P. Drašar^{a,d} (^a Department of Chemistry of Natural Compounds, ^b Department of Carbohydrate Chemistry and Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^c Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava, ^d Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): **Sweet Non-saccharide Natural Compounds**

A brief survey of sweet non-saccharide natural compounds aims to show their importance and to contribute to the knowledge of the biodiversity of secondary metabolites, which can be utilized in food and pharmaceutical industry. The beauty and biodiversity of the compounds are illustrated.

Děkan přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze
vypisuje konkurs na přijetí do doktorského studia v následujících
oborech:

- analytická chemie
- anorganická chemie
- biochemie
- fyzikální chemie
- makromolekulární chemie
- modelování chemických vlastností nano- a biostruktur
- organická chemie
- chemické vzdělávání

Studium bude zahájeno 1. 10. 2007. Podmínkou přijetí je absolvování VŠ
ve shodném nebo blízkém studijním oboru.

Příhlášky a podrobné informace jsou na adrese: PčF UK, oddělení
doktorského studia, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel. 221 951 162, 221 951 163.
Příhlášky se přijímají do 30. 4. 2007.

VYUŽITÍ INSTRUMENTÁLNÍHO MĚŘENÍ BAREVNOSTI VE VÝVOJI A V KONTROLE JAKOSTI LÉČIV

JAN ŠUBERT a JOZEF ČIŽMÁRIK

*Katedra farmaceutickej chémie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika
cizmarik@fpharm.uniba.sk*

Došlo 2.10.06, přijato 4.12.06.

Klíčová slova: měření barevnosti, trichromatický systém, vývoj léčiv, kontrola jakosti léčiv

Obsah

1. Úvod
2. Číselný popis barev v trichromatickém systému
3. Aplikace
 - 3.1. Vývoj léčivých přípravků
 - 3.2. Kontrola jakosti léčiv, léčivých přípravků a pomocných látek
4. Závěr

1. Úvod

Měření barevnosti je založeno na číselném vyjádřování barev v trichromatickém systému^{1–3}. Východiskem k instrumentálnímu měření barevnosti je spektrální propustnost nebo spektrální odraz vzorku ve viditelné spektrální oblasti. Trichromatický systém je nutno odlišovat od komplementárního trichromatického systému, který vychází z hodnot absorpance⁴. Tento systém byl používán zejména při studiu chemických rovnováh a reakcí doprovázených barevnými změnami, včetně studia barevných přechodů indikátorů používaných v odměrné analýze⁴, případně i v kvantitativní analýze⁵. Později však jeho aplikace nebyly příliš rozvíjeny.

Instrumentální měření barevnosti dosud není ve výrobě a v kontrole jakosti léčiv běžně používanou metodou. Tradičně konzervativní lékopisy^{6–8} se většinou dosud spokojují s vizuálním hodnocením za pomoci porovnávacích barevných roztoků. Výjimkou je lékopis USA (cit.⁹), ve kterém jsou mimoto uvedeny samostatně základní vztahy a některé praktické pokyny k instrumentálnímu měření barevnosti v trichromatickém systému. Tento přístup se uplatňuje již ve vydání platném od roku 1980 (cit.¹⁰), zatímco v souvislosti s Evropským lékopisem se objevují příznaky možné harmonizace zavedením instrumentálního měření barevnosti až v posledních letech¹¹. Vzhledem k tomu, že problematika využití instrumentálního měření barevnosti ve vývoji, výrobě a v kontrole jakosti

léčiv nebyla delší dobu přehledně zpracována, shrnuje tento referát výběrově práce publikované v posledních dvou desetiletích, čímž volně navazuje na předcházející zpracování problematiky^{12,13}.

2. Číselný popis barevnosti v trichromatickém systému

Současná kolorimetrická měrná soustava, přijatá Mezinárodní komisí pro osvětlování (Comission Internationale de l'Eclairage, dále CIE) v roce 1931 (cit.^{1–3}), je v podstatě založena na skutečnosti, že aditivním mísením tří vhodně volených měrných barevných světél lze vzbudit vjem libovolné barvy. Kolorimetrická množství těchto měrných světél jsou pak měřítkem, pomocí něhož lze danou barvu číselně charakterizovat. Ta je vystižena buď velikostí trichromatických složek v pravoúhlém systému X, Y, Z, nebo jejich poměrem. Definičním základem trichromatické soustavy CIE jsou hodnoty trichromatických členitelů $\bar{x}(\lambda)$, $\bar{y}(\lambda)$, $\bar{z}(\lambda)$, které jsou tabelovány. Tyto distribuční funkce také do určité míry charakterizují proces barevného vidění průměrného lidského oka. Vzhledem k tomu, že na vzniku barevného vjemu se podílejí mimo pozorovaný předmět i zdroj světla a pozorovatel, je pro měření barevnosti nutno specifikovat standardní podmínky osvětlování a pozorování. Zatímco dříve byl převážně uvažován CIE normalizovaný zdroj světla C, který odpovídá průměrnému dennímu světlu bez přímého slunečního světla, v současnosti je používáno nejčastěji světlo D65, které rovněž odpovídá svým spektrálním složením průměrnému dennímu světlu. Původně byly hodnoty trichromatických členitelů CIE definovány pro úhel pozorování 2°, později lze konstatovat přechod k použití hodnot pro tzv. doplňkového pozorovatele, odvozených z měření pro zorný úhel 10°. Základní způsob vyčíslení trichromatických složek X, Y, Z je jejich výpočet z výsledků spektrofotometrických měření hodnot spektrálního činitele odrazu nebo prostupu ve viditelné části spektra podle vztahů

$$X = k \int_{\lambda} E(\lambda) R(\lambda) \bar{x}(\lambda) d\lambda$$

$$Y = k \int_{\lambda} E(\lambda) R(\lambda) \bar{y}(\lambda) d\lambda$$

$$Z = k \int_{\lambda} E(\lambda) R(\lambda) \bar{z}(\lambda) d\lambda$$

v nichž $E(\lambda)$ je spektrální distribuce energie zdroje světla, $R(\lambda)$ spektrální odraz, místo kterého v případě měření propustnosti figuruje transmitance T a k je normalizační faktor. Integrace se provádí přes vlnové délky λ viditelného

spektra, často od 380 do 780 nm. Původně pracně vyčíslování hodnot X , Y , Z podle těchto vztahů dnes řeší používání vhodných výpočetních programů pro PC, které jsou dostupné i komerčně. Jiným možným přístupem je použití srovnávacích kolorimetrů, které pracují na odlišném principu a umožňují přímé získání hodnot trichromatických složek X , Y , Z bez nutnosti jejich výpočtu. Tato měření jsou rychlejší a pohodlnější, obvykle ale méně přesná. Při řadě aplikací však vyhovují. Barevný prostor CIE XYZ není rovnoměrný. To značí, že stejným barevným rozdílem v jeho různých částech neodpovídají stejné vzdálenosti. K řešení tohoto nedostatku jsou používány různé transformace trichromatických souřadnic X , Y , Z . V posledních desetiletích je to zejména rovnoměrný barevný prostor $L^*a^*b^*$ CIE 1976. Vztahy potřebné k transformaci hodnot souřadnic X , Y , Z do tohoto prostoru jsou uvedeny např. v^{1–3,9,11}. V kolorimetrickém prostoru CIE $L^*a^*b^*$ hodnoty souřadnic a^* a b^* charakterizují barevný odstín vzorku a L^* jeho jas. Vzdálenost dvou bodů ΔE^* v tomto prostoru, kterou lze vyčíslet podle vztahu $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$, odpovídá v různých částech prostoru podstatně lépe vizuálně vnímaným rozdílům barevnosti, než analogicky vyčíslená vzdálenost v prostoru CIE XYZ. Podrobnější informace k teorii číselného popisu barevnosti a jejího měření lze nalézt v literatuře^{1–3}.

3. Aplikace

3.1. Vývoj léčivých přípravků

Důležitou etapou ve vývoji léčivých přípravků je testování stability léčiv, léčivých přípravků a farmaceutických pomocných látek jako vlastnosti zachovat si ve stanovených mezích po určitou dobu a za stanovených podmínek určené jakostní znaky. Vzhledem k tomu, že v průběhu testů stability dochází nezdědky k jistým, organoleptickým posouzením však obtížně hodnotitelným změ-

nám zbarvení vzorků, lze pozorovat snahu objektivizovat toto hodnocení použitím instrumentální techniky měření a číselného popisu. Instrumentální měření barevnosti v trichromatickém systému CIE je sice metodou nespecifickou, v některých případech však může být citlivější, než je HPLC¹⁴. Ve stabilitních studiích léčiv bylo použito instrumentální měření barevnosti např. při sledování rozkladu kyseliny askorbové působením vlhkosti¹⁴. Hodnoty souřadnic L^* , a^* , b^* byly měřeny přímo a z nich byly vyčísleny barevné rozdíly ΔE^* vzorků, jejichž zbarvení se měnilo v průběhu studie z bílého do hnědého, v závislosti na podmínkách experimentu (procento vlhkosti a doba uchovávání). V příspěvku¹⁵ bylo použito přímé měření rozdílu zbarvení jako ΔE ke sledování stability cefixim trihydrátu v pevné fázi, při jeho rozměňování v automatickém moždíři, v závislosti na době rozměňování a teplotě. Ve studii¹⁶ byly hodnoty souřadnic L^* , a^* , b^* a zejména rozdílu barevnosti ΔE^* použity při sledování vlivu různé povrchové úpravy na fotostabilitu methyldopy jako modelové látky. Příklady použití instrumentálního měření barevnosti při sledování stability léčivých přípravků jsou uvedeny v tabulce I. Pokud jde o farmaceutické pomocné látky, bylo instrumentální měření barevnosti použito při sledování stability olivového oleje, který je zařazen v Českém lékopise, vůči oxidaci. Oxidace měla u všech vzorků za následek změny kolorimetrického parametru C^* charakterizujícího barevný odstín vzorku v systému cylindrických souřadnic^{1,2} a pouze u některých vzorků pokles hodnoty L^* . U různých vzorků byla zjištěna lineární závislost změn ΔE^* na době jejich uchovávání při 20 °C (cit.²²). Ve sdělení²³ byla sledována fotostabilita barviv z přírodních zdrojů v tabletách. Byla zjištěna lineární závislost hodnot ΔE^* na době uchovávání tablet a na základě menších změn ΔE^* byla vybrána dvě ze tří testovaných barviv jako vhodná k barvení tablet.

Mezi odlišné aplikace patří použití instrumentálního měření barevnosti při sledování kompatibility součástí a dalších vlastností dvousložkových směsí žlutě zbarvené kyseliny niflumové s různými deriváty celulosy, anebo

Tabulka I

Využití instrumentálního měření barevnosti při stabilitních testech léčivých přípravků

Testovaný přípravek	Použitý kolorimetrický parametr a další údaje	Lit.
Tableta metoprololu	ze spektrálního odrazu hodnoty L^* , a^* , b^* a ΔE^* , v testu stability se měnily hodnoty L^* a b^*	17
Tableta kaptoprilu, tobolka sodné soli flukloxacilinu, sodná sůl cefoxitinu k injekci, tableta theofylinu	ze spektrálního odrazu hodnoty X , Y , Z , z nich L^* , a^* , b^* a ΔE^* , nárůst hodnot ΔE^* v testu závisel u prvních tří přípravků lineárně na poklesu obsahu léčiva	18
Tableta blíže nespecifikované látky (derivát piperidinu)	technikou odrazu měřeny hodnoty L^* , a^* , b^* , ΔE^* a další, během testů narůstaly zejména hodnoty b^*	19
Castellanův roztok bez fuchsinu	ze spektru propustnosti hodnoty ΔE^* , sledována stabilita a možnosti stabilizace nízké úrovně zbarvení přípravku edetanem disodným	20, 21

s ibuprofenem²⁴. Jako ukazatel byly v této práci použity hodnoty poměru indexu bělosti a indexu žlutosti podle ASTM (cit.^{1,2}) vypočtených z trichromatických složek X, Y, Z. Souřadnice barevného prostoru $L^*a^*b^*$ zjištěné instrumentálním měřením byly použity ke sledování procesu krystalizace²⁵. Zatímco hodnota L^* poskytla informace o kinetice a dynamice krystalizačního procesu, hodnoty a^* a b^* umožnily rozlišení mezi různými hydráty. V práci²⁶ bylo instrumentální měření barevnosti použito při hledání optimálních podmínek pro barevné pokrytí pelet. Bylo měřeno zbarvení jednotlivých pelet a k charakterizaci rovnoměrnosti jejich barevného pokrytí za různých pracovních podmínek byla použita hodnota směrodatné odchylky ΔE^* . Metodika měření byla dále zdokonalována v navazující studii²⁷ zaměřené na kontrolu stejnoměrnosti barevného pokrytí pelet. Autoři²⁸ měřili hodnoty L^* , a^* , b^* a sledovali vzájemný vztah rozdílů barevnosti ΔE^* a změn objemu při bobtnání adhezivních tablet obsahujících klotrimazol, ornidazol (anebo jen pomocné látky) ve vodě po dobu 24 hodin. Navrhli používat v dané aplikaci měření rozdílů barevnosti jako alternativní méně pracný postup. V práci²⁹ byly použity kolorimetrické parametry (ΔE^* a další) chlorofylu a riboflavinu jako barevných indikátorů v roztocích k desinfekci kontaktních čoček, založených na účinku peroxidu vodíku. Výsledky byly diskutovány také v kontextu barevného vidění lidského oka.

3.2. Kontrola jakosti léčiv, léčivých přípravků a pomocných látek

Aplikace instrumentálního měření barevnosti v trichromatickém systému byly původně zaměřeny zejména na sledování kvality barevných přechodů indikátorů používaných při vizuální indikaci v odměrné analýze. Poznatky publikované před rokem 1994 jsou shrnuty v přehledu³. V souvislosti s nahrazováním vizuální indikace titrací potenciometrickou indikací však tyto aplikace nebyly v posledním desetiletí rozvíjeny. Příkladem práce nezahnuté v literatuře³ může být studie zabývající se kvalitou barevných přechodů různých indikátorů při titraci sulfanilamidu dusitanem sodným³⁰. Větší pozornost ve sledovaném období byla věnována problematice porovnávání barevných roztoků používaných lékopisy při vizuálním hodnocení zbarvení tekutin. Ve sdělení³¹ byly změněny a vyčísleny kolorimetrické parametry L^* , a^* , b^* , ΔE^* a další porovnávání barevných roztoků používaných Maďarským lékopisem a jako nejvýznamnější ukazatel byl označen rozdíl barevnosti ΔE^* . Tyto roztoky byly připravovány ze čtyř základních barevných roztoků, zatímco současné lékopisy používají tři základní barevné roztoky (chlorid železitý, chlorid kobaltnatý a síran měďnatý). Stabilita zbarvení některých porovnávání barevných roztoků připravených z těchto základních roztoků podle Českého lékopisu⁷ byla sledována za podmínek jejich uchovávání předepsaných lékopisem jako rozdíl hodnot ΔE^* od hodnoty zjištěné ze spekter transmitance měřených bezprostředně po přípravě roztoků proti čištěné vodě³². Rozdíly hodnot ΔE^* v průběhu sledování byly

u koncentrovanějších porovnávání barevných roztoků menší než u zředěnějších, změny však byly zjištěny ve všech případech. Z výsledků vyplývá, že není důvod tolerovat při vizuálním hodnocení zbarvení tekutin podle Českého lékopisu metodou I použití roztoků s časově neomezenou dobou uchovávání a k provedení zkoušky metodou II pro roztoky identického složení požadovat jejich přípravu vždy až těsně před použitím. Porovnávání barevné roztoky podle Evropského lékopisu⁸ byly proměřeny a popsány kolorimetrickými parametry CIE L^* , a^* , b^* autory¹¹. Blíže byly vlastnosti těchto roztoků sledovány pomocí parametrů barevného prostoru CIE $L^*a^*b^*$ v práci³³. Hodnoty ΔE^* zjištěné proti čištěné vodě se s výjimkou červených porovnávání barevných roztoků měnily v závislosti na koncentraci barevné složky nelineárně. Malé hodnoty ΔE^* zjištěné u nejméně koncentrovaných hnědých a hnědožlutých porovnávání barevných roztoků mohou být příčinou problémů při jejich použití k vizuálnímu hodnocení³³.

Jiným zkoumadlem používaným v kontrole jakosti léčiv je vodný roztok naftylethylendiamindihydrochloridu. Tento roztok je nestálý a rozkládá se za vzniku barevných produktů. Sledováním stability a možností stabilizace s použitím hodnot ΔE^* bylo zjištěno, že již uchovávání roztoku v obalu z hnědého zbarveného skla přináší zlepšení a příprava roztoku pouze v čas potřeby není nutná³⁴.

Autoři³⁵, na rozdíl od předcházejících prací, získávali hodnoty rozdílů barevnosti ΔE^* z měření vzorků v pevné fázi technikou odrazu a upozorňují na vyšší citlivost postupu ve srovnání s měřením z transmitance roztoků. V příspěvku³⁶ byly z měření spektrálního odrazu stanoveny kolorimetrické parametry X, Y, Z, L^* , a^* , b^* a další u řady barevných léčiv, např. ethakridin-laktátu, kyseliny listové, rutinu a taninu jako jejich charakteristiky. Současně bylo upozorněno na větší objektivnost měření barevnosti v trichromatickém systému v porovnání s vizuálním hodnocením. V navazujícím sdělení³⁷ bylo instrumentální měření barevnosti použito při kontrole jakosti léčivých přípravků typu tablet a obdruktet. K objektivnímu popisu zbarvení olivového oleje byly použity souřadnice barevných prostorů CIE XYZ a $L^*a^*b^*$ a méně běžného barevného prostoru CIE $L^*u^*v^*$ (cit.^{1,2}) získané ze spekter transmitance se závěrem, že nejhodnější v dané aplikaci se z nich jevil prostor $L^*a^*b^*$ (cit.³⁸). Ve sdělení³⁹ byly technikou odrazu změřeny a vyčísleny hodnoty X, Y, Z a L^* , a^* , b^* různých vzorků mastku pro farmaceutické použití a jako ukazatele jeho čistoty byly zvažovány hodnoty souřadnic Z, L^* a indexu bělosti CIE (cit.^{1,2}), který se ukázal jako nejhodnější. Byla stanovena limitní hodnota tohoto indexu pro mastek odpovídající lékopisu USA (cit.³⁹). Některé další aplikace instrumentálního měření barevnosti, které by mohly být uvedeny v souvislosti s kontrolou jakosti léčiv, léčivých přípravků a pomocných látek byly zmíněny již v části 3.1. Jiný směr možného budoucího uplatnění metody je při zkouškách čistoty léčiv, jako alternativy k metodám instrumentálně náročnějším. Naznačují jej práce^{40–42}, v nichž byly metodou odrazu měřeny kolorimetrické parametry produktů barevných reakcí některých

anorganických iontů s vhodnými činidly po zakoncentrování na pevném nosiči a následně byly použity ke stanovení malých množství příslušných iontů. U hlinitých iontů byl činidlem eriochromcyanin R a nejvyšší citlivosti bylo dosaženo při použití indexu žlutosti počítaného z hodnot souřadnic X, Y, Z (cit.^{1,2}). Limit detekce byl v tomto případě $4 \mu\text{g l}^{-1}$, při použití hodnot souřadnice Y a dalších kolorimetrických parametrů byla citlivost nižší⁴⁰. Analytický postup byl aplikován na stanovení hlinitých iontů jako znečištěnin v octanu sodném, který je uveden jako léčivo v Českém lékopise. V příspěvku⁴¹ byla stanovována malá množství rtuťnatých iontů po jejich barevné reakci s thiothenoyltrifluoracetone a vhodným parametrem měnicím se s koncentrací analytu byla hodnota souřadnice b*. Stopová množství kobaltnatých, nikelnatých, železnatých a železitých iontů byla stanovována po jejich reakci s jiným chromogenním činidlem s využitím hodnot Δa^* a Δb^* (cit.⁴²). Při stanovení stopových množství arsenu s využitím analogického principu byl dosažen limit detekce $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ a výsledky byly v dobré shodě s výsledky dosaženými AAS (cit.⁴³).

4. Závěr

Měření barevnosti se přes poměrně snadnou dostupnost potřebné instrumentace dosud nestalo metodou používanou při řešení problémů vývoje a kontroly jakosti léčiv, léčivých přípravků a pomocných látek stejně často, jako v některých jiných oborech (viz např. přehled⁴³). Přispívá k tomu i fakt, že tradičně konzervativní lékopisy se většinou dosud spokojují se subjektivním vizuálním hodnocením. Vzhledem k výhodnosti objektivního hodnocení a číselné specifikace barevnosti a jejich rozdílů lze však očekávat nárůst aplikací, mimo jiné při sledování stability léčiv a léčivých přípravků. Pravděpodobně je také brzké zařazení instrumentálního měření barevnosti v trichromatickém systému CIE jako pracovní metody do Evropského lékopisu.

LITERATURA

1. Wyszecki G., Stiles W. S.: *Color Science. Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae*. Druhé vydání, Wiley, New York 2000.
2. Berger – Schunn A.: *Practical Color Measurement*. Wiley, New York 1994.
3. Krishna Prasad K. M. M., Raheem S., Vijayalekshmi P., Kamala Sastri C.: *Talanta* 43, 1187 (1996).
4. Vytrás K., Vytrásová J., Kotrlý S.: *Chem. Listy* 70, 234 (1976).
5. Yoshida S., Oda K., Hirose S.: *Chem. Pharm. Bull.* 32, 1011 (1984).
6. *Český lékopis 2005*, první díl, str. 145. Grada Publishing a.s., Praha 2005.
7. *Český lékopis 2002*, první díl, str. 106–110. Grada Publishing a.s., Praha 2002.
8. *European Pharmacopoeia*, páté vydání, svazek první, str. 24–26. Council of Europe, Strasbourg 2004.
9. *The United States Pharmacopeia*, dvacátá osmá revize (USP 28), str. 2616–2618. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville 2004.
10. *The United States Pharmacopeia*, dvacátá revize (USP XX), str. 994–995. United States Pharmacopoeial Convention, Rockville 1979.
11. Ali S. L., Castle P.: *Pharmeuropa* 15, 262 (2003).
12. Šubert J., Kučera J., Fečák B., Čížmárik J., Mandák M.: *Česk. Farm.* 27, 152 (1978).
13. Lukács G., Szalay E., Vincze-Pál Berezvai E., Horváth Kovács M.: *Hung. Sci. Instrum.* 1985, (60), 13.
14. Shephard A. B., Nichols S. C., Braitwaite A.: *Talanta* 48, 585 (1999).
15. Kitamura S., Miyame A., Koda S., Morimoto Y.: *Int. J. Pharm.* 56, 125 (1989).
16. Ramadan A., El-Massik M., El-Khordagui L., Daabis N., Hammouda Y.: *Int. J. Pharm.* 307, 141 (2006).
17. Wirth M.: *J. Pharm. Sci.* 80, 1177 (1991).
18. Stark G., Fawcett J. P., Tucker I. G., Wheatherall I. L.: *Int. J. Pharm.* 143, 93 (1996).
19. Berberich J., Dee K.-H., Hayauchi Y., Pörtner C.: *Int. J. Pharm.* 234, 55 (2002).
20. Šubert J., Cieslarová M.: *Čes. Slov. Farm.* 55, 29 (2006).
21. Šubert J., Farsa O., Cieslarová M.: *Pharmazie* 61, 1049 (2006).
22. Ceballos C., Moyano M. J., Vicario I. M., Alba J., Heredia F. J.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80, 257 (2003).
23. Dehner E. J., Shiromani P. K.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 19, 1659 (1993).
24. Barra J., Ullrich A., Falson – Rieg F., Doelker E.: *Pharm. Dev. Technol.* 5, 87 (2000).
25. Campbell K., Clapham D., Thomas K.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 4, Supplement 1, S163 (1996).
26. Heng P. W. S., Chan L. W., Chan W. Y.: *S.T.P. Pharm. Sci.* 9, 554 (1999).
27. Chan L. W., Chan W. Y., Heng P. W. S.: *Int. J. Pharm.* 213, 63 (2001).
28. Balogh E., Hizarcioglu S. Y., Karavana H. A.: *Pharm. Dev. Technol.* 9, 233 (2004).
29. García – Monlleó R. M., Rivas M. J., Huertas R., Melgosa M.: *Optom. Vis. Sci.* 83, 160 (2006).
30. Sastry C. S. P., Srinivas K. R., Rao D. N. Krishna Prasad K. M. M.: *Mikrochim. Acta* 118, 51 (1995).
31. Stampf G., Jelinekné Nikolics M.: *Acta Pharm. Hung.* 59, 42 (1989).
32. Šubert J., Farsa O., Gajdošová Z.: *Čes. Slov. Farm.* 55, 189 (2006).
33. Šubert J., Farsa O., Gajdošová Z.: *Pharmazie* 61, 1047 (2006).
34. Šubert J., Farsa O., Cieslarová M.: *Farm. Obzor* 75, 323 (2005).
35. Oram P. D., Strine J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40, 1021 (2006).
36. Azizov I. K., Popkov V. A., Rešetnjak V. J.: *Farmacija* 36, (2), 37 (1987).
37. Azizov I. K., Popkov V. A., Movšovič I. M., Rešetnjak V. J.: *Farmacija* 36, (2), 37 (1987).

- jak V. J.: Farmacija 37, (5), 43 (1988).
38. Escolar D., Haro M. R., Saucedo A., Ayuso J., Jimenez A., Alvarez J. A.: J. Am. Oil Chem. Soc. 71, 1337 (1994).
 39. Soriano M., Melgosa M., Sánchez – Maranon M., Delgado G., Gámiz E., Delgado R.: Color Res. Appl. 23, 178 (1998).
 40. Ershova N. I., Ivanov V. M.: Anal. Chim. Acta 408, 145 (2000).
 41. Yokota F., Abe S.: Bunseki Kagaku 46, 689 (1997).
 42. Yokota F., Endo M., Abe S.: Bunseki Kagaku 48, 1135 (1999).
 43. Rahman M., Seike Y., Okumura M.: Anal. Sci. 22, 475 (2006).
 44. Ivanov V. M., Kuznecova O. V.: Uspechi chimii 70, 411 (2001).

J. Šubert and J. Čižmárik (*Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Application of Instrumental Colour Measurement in Development and Quality Control of Drugs**

This review covers applications of instrumental colour measurement using the tristimulus system in development, production and quality control of drugs in the last two decades. Although it has not been a commonly used method, the number of its applications in stability testing of drugs, medicinal preparations and excipients increases. Incorporation of instrumental colour measurement into the European Pharmacopoeia is also probable.

APROCHEM 2007

16. Konference • Chemické technologie • Ropa • Petrochemie • Polymery

Udržitelný rozvoj průmyslu • Výzkum • Školství • Prostředí • Bezpečnost • Legislativa
16. – 18. duben 2007 • Milovy – Sněžné na Moravě • Hotel Devět Skal

ODPADOVÉ FÓRUM 2007

2. Symposium • Výsledky výzkumu a vývoje pro odpadové hospodářství

Nebezpečné, chemické, biodegradabilní a inertní odpady • Termické využití • Recyklace
Sanace zátěží • Systémové otázky • Odpadní vody • Odpadní plyny • Čištění exhalací
18. – 20. duben 2007 • Milovy – Sněžné na Moravě • Hotel Devět Skal

Doprovodná technická výstava • Firemní prezentace • Možnosti inzercí

Plná znění příspěvků na CD i v tištěné formě • Pro obě dílčí akce jediná registrace

Nabídky odborných příspěvků prosíme do 15.1.2007, výjimečně 31. 1. 2007 nebo jako dodatečně pro Konečný program. Plná znění příspěvků pro tištěný sborník a CD budou třeba do 15.3.2007.

2. Cirkulář – Pozvánka, Přihláška účasti a Program: na webových stránkách a poštou v únoru 2007

Připravuje: PCHE s ČSPCH, ČSCH, ČSCH, VŠCHT Praha, SCHP ČR, ÚCHP AV ČR a CEMC

Kontakty: PCHE – PetroCHemEng, Ing. Jaromír Škarka, CSc., Na Dračkách 13, 162 00 Praha 6
T/F: 220 518 698 • M: 607 671 866 • T/F: 233 336 138 (jen do 31. 5. 2007)

www.aprochem.cz • pche@csvts.cz

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

ANTIOXIDAČNÁ AKTIVITA POTENCIÁLNÝCH ANTIHYPERTENZÍV S DUÁLNYM ÚČINKOM

FRANTIŠEK ŠERŠEŇ^a, DUŠAN LOOS^b, JOZEF
CSÖLLEI^c, IGOR POPA^d, JÁN VANČO^c
a FRIDRICH GREGÁŇ^e

^a Chemický ústav, ^b Katedra organickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina CH2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika. ^c Ústav chemických liečiv, Farmaceutická fakulta, Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika, ^d Laborať rústových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci a AV ČR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Česká republika., ^e Katedra chémie, Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica, Slovenská republika
sersen@fns.uniba.sk, vancoj@vfu.cz,
gregan@fpv.umb.sk

Došlo 19.12.05, prijaté 6.4.06.

Kľúčové slová: antihypertenzíva, antioxidanty, bufuralol, duálny účinok

Úvod

Hypertenzia je jedným z najčastejších ochorení kardiovaskulárneho systému. Postihuje približne 20 % populácie v rozvinutých krajinách a jej prevalencia sa zvyšuje s vekom. Dlhodobou neliečená hypertenzia vedie k rozvoju aterosklerózy, poškodeniu vnútorných orgánov a výrazne zvyšuje riziko infarktu myokardu a cievnej mozgovej príhody. Účinná antihypertenzná terapia znižuje morbiditu i mortalitu a zvyšuje kvalitu života chorých. K normalizá-

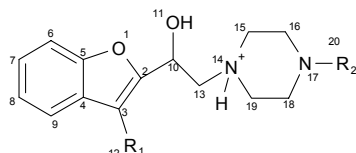
cii krvného tlaku sa používajú liečivá rôznych farmakologických skupín, a to buď samostatne alebo v kombinácii¹. U pacientov s rozvíjajúcim sa kombinovaným poškodením organizmu je efektívnu a tiež ekonomickejšou alternatívou použitie duálnych liečiv – látok, ktoré pôsobia niekoľkými mechanizmami účinku súčasne. Pôsobenie zároveň na rôznych miestach organizmu spôsobuje účinnejšie zníženie krvného tlaku a v niektorých prípadoch môže viesť aj ku zníženiu nežiaducich účinkov.

V posledných rokoch sa dostáva do popredia tiež úloha reaktívnych foriem kyslíka a dusíka (RONS z angličtiny „reactive oxygen and nitrogen species“) v patogeneze hypertenzie. RONS sa podieľajú na porušení funkcie endotelu, podieľajú sa na rozvoji aterosklerózy a ischemicko-reperfúznom poškodení tkanív²⁻⁵. U hypertonikov boli zaznamenané tiež znížené koncentrácie prirodzených antioxidantov (vitamín E) a znížená aktivita antioxidantných enzýmov (superoxiddismutáza, glutatiónpoxidáza)⁶. Kombinácia s antioxidantami alebo priamo antihypertenzíva so schopnosťou zhasť RONS by preto mohli byť v dlhodobej antihypertenznej terapii veľmi perspektívne.

Niektoré deriváty propafenónu sú biologicky aktívne zlúčeniny s významnou negatívnou inotropnou a antidysrhythmickou účinnosťou a slabým lokálne anestetickým efektom⁷. V tejto práci študované látky napodobňujú do určitej miery štruktúru propafenónu s vytvorením rigidného benzofuranového skeletu, ktorý, ako sa ukázalo v testoch hypotenzívnej aktivity, nepôsobí dysterapeuticky. Naopak v poslednom období sa objavujú aj deriváty benzofuran-2-yl-etanolamínu, ktoré sa postupne dostávajú do klinickej praxe ako napríklad bufuralol^{8,9}.

V návaznosti na predchádzajúce štúdie *in vivo* antiradikálovej aktivity¹⁰, v tejto práci sú študované (*in vitro*) antioxidačné vlastnosti štyroch potenciálnych antihypertenzív s duálnym účinkom (Schéma 1).

Cieľom práce bolo zistiť schopnosť vychytávať niektoré druhy radikálov: 2,2-difeny-1-pikrylhydrazyl (DPPH), hydroxylových (HO[•]) a superoxidových aniónových radikálov (O₂^{•-}) vyššie uvedenými zlúčeninami.



- I: R₁ = CH₃, R₂ = 4-fluórfenyl
 II: R₁ = CH₂CH₃, R₂ = 4-fluórfenyl
 III: R₁ = CH₃, R₂ = 2-fluórfenyl
 IV: R₁ = CH₂CH₃, R₂ = 2-fluórfenyl

Schéma 1

Materiál a metódy

Chemikálie a prístroje

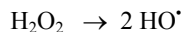
Metanol, 2,2-difényl-1-pikrylhydrazyl (DPPH), 5,5-dimetyl-1-pyrrolín-*N*-oxid (DMPO), sodná soľ β -nikotínamid adenín dinukleotid fosfátu (NADH), 2-merkaptotanol, D_2O a dimetylsulfoxid- d_6 (DMSO- d_6) boli od firmy Sigma-Aldrich Ltd. Peroxid vodíka, EDTA a $MnCl_2$ boli od firmy Lachema ČR. Absorpčné spektrá boli snímané prístrojom Specord UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Germany). Spektrá elektrónovej paramagnetickej rezonancie (EPR) boli zaznamenávané prístrojom ERS 230 (ZWG Akad. Wiss. Berlin, Germany), ktorý pracuje v pásme X ($\sim 9,3$ GHz), pri modulačnej amplitúde 0,1 mT, a mikrovlnom výkone 5 mW. NMR spektrá boli zaznamenávané prístrojom Bruker Avance 300 (Bruker, USA) s pracovnou frekvenciou 300 MHz. Potenciálne antihypertenzíva s duálnym účinkom boli syntetizované na Ústave chemických liečiv, Farmaceutickej fakulty VFU Brno¹¹.

Vychytávanie DPPH radikálov

Do 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ metanolového roztoku DPPH sa pridávali rôzne množstvá testovaných látok, čím dochádzalo k poklesu intenzity absorpčného pásu pri 517 nm. Z lineárnej závislosti tohto poklesu od koncentrácie boli vypočítané hodnoty SC_{50} , t.j. koncentrácia, pri ktorej dochádza k 50% poklesu sledovanej absorpcie.

Vychytávanie hydroxylových radikálov

Ako zdroj HO^\bullet radikálov bol použitý samovoľný rozpad peroxidu vodíka pri 25 °C.



Pretože HO^\bullet radikály majú veľmi krátku dobu života, nemôžu byť zaregistrované bežným EPR spektrometrom s kontinuálnym vysokofrekvenčným žiarením, musia sa preto stabilizovať pomocou spinovej pasce. Po zachytení HO^\bullet spinovou pascou DMPO vznikne ich adukt, ktorého

doba života je niekoľko desiatok minút, takže môžu byť ľahko zaznamenané pomocou bežného EPR spektrometra. Reakčný roztok obsahoval 0,05 mol dm^{-3} DMPO, 0,05 mol dm^{-3} H_2O_2 a nasýtený roztok študovanej zlúčeniny. Intenzita EPR signálu bola zaznamenávaná vždy po 20 min po pridaní H_2O_2 .

Vychytávanie superoxidových aniónových radikálov

Generovanie superoxidových aniónových radikálov $O_2^{\bullet-}$ prebiehalo v súlade s prácou Paoletti a spol. (1990) (cit.¹²), t.j. oxidáciou NADH (5 mmol dm^{-3}) molekulovým kyslíkom, ktorý bol prítomný vo fosfátovom tlmivom roztoku (pH 7,4) v prítomnosti EDTA (2,2 mmol dm^{-3}) a $MnCl_2$ (1,1 mmol dm^{-3}) za katalytického účinku merkaptotetanolu (1 mmol dm^{-3}). V týchto experimentoch boli použité tiež nasýtené roztoky študovaných zlúčenín, pretože ich rozpustnosť vo vode je relatívne nízka. Reakcia bola odštartovaná pridaním merkaptotetanolu a bola sprevádzaná poklesom absorpčného pásu pri 340 nm. Intenzita tohto pásu bola zaznamenávaná vždy po 20 min po pridaní merkaptotetanolu.

Výsledky a diskusia

Antioxidačné vlastnosti študovaných látok sú prezentované v tabuľke I.

Zistili sme, že študované zlúčeniny sú schopné likvidovať DPPH radikály, ich účinnosť je však podstatne slabšia (68 500–118 000 krát) ako je účinnosť známeho antioxidantu vitamínu C ($SC_{50} = 2,21 \mu\text{mol dm}^{-3}$)¹³, pričom účinnejšie sú 4-fluórfenylové deriváty ako 2-fluórfenylové deriváty. Táto skutočnosť môže byť zapríčinená tým, že zánik DPPH radikálu spôsobuje zachytenie radikálu vodíka, ktorý poskytne antioxidant podľa Schémy 2. Slabšia schopnosť vychytávania DPPH radikálov 2-fluórfenylovými derivátmi je pravdepodobne spôsobená silnejšie viazaným vodíkom na hydroxylovej skupine v 2-fluór-

Tabuľka I
Antioxidačné vlastnosti látok I až IV

Zlúčenina	SC_{50} [mmol dm^{-3}]/ R^2 pre DPPH	% inhibície HO^\bullet radikálov	E_H [kJ mol^{-1}]	E_R [kJ mol^{-1}]	Q_{N17}	Q_F
I	144,0/0,955	*	5,674	253,788	-0,226	-0,109
II	163,8/0,921	*	6,209	253,747	-0,226	-0,109
III	229,3/0,994	33,2	6,034	254,289	-0,223	-0,104
IV	248,3/0,925	74,1	6,365	253,996	-0,222	-0,104

E_H je energia intramolekulovej vodíkovej väzby OH skupiny s furanovým kyslíkom, E_R je energia tvorby radikálu odtrhnutím vodíka z OH skupiny, Q_{N17} je nábojová hustota na atóme dusíka v piperazínovom kruhu, na ktorý je naviazaný fluórfenyl, Q_F je nábojová hustota na fluóre, * zlúčeniny stimulujúce tvorbu HO^\bullet radikálov

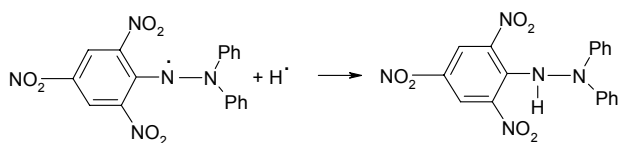
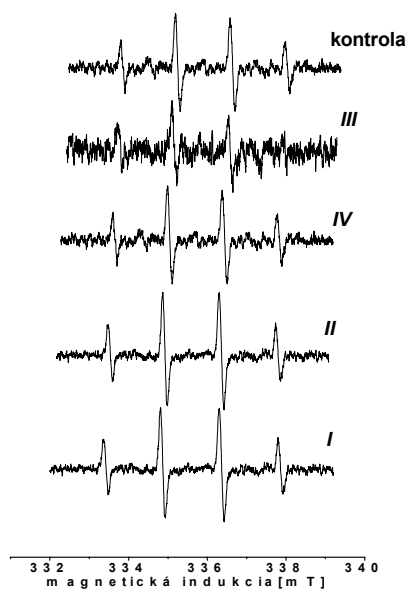


Schéma 2

fenylových derivátov ako v 4-fluórfenylových derivátov. Tento predpoklad sa potvrdil, keď sme pomocou kvantovochemickej metódy AM1^{14,15} vypočítali energie intramolekulovej vodíkovej väzby (E_H) OH skupiny s furanovým kyslíkom a energie tvorby radikálu (E_R) odtrhnutím vodíka z tejto OH skupiny (viď tab. I).

Test na vychytávanie O_2^{\bullet} radikálov ukázal, že všetky študované zlúčeniny pôsobili prooxidačne, t. j. urýchľovali vznik O_2^{\bullet} radikálov, dokonca pôsobili ako katalyzátor generovania O_2^{\bullet} radikálov v NADH roztoku bez prítomnosti merkaptetanolu.

Na obr. 1 sú prezentované EPR spektrá spinových



Obr. 1. EPR spektrá spinových aduktov DMPO s HO^{\bullet} radikálmi vo vode a vodných nasýtených roztokoch študovaných látok

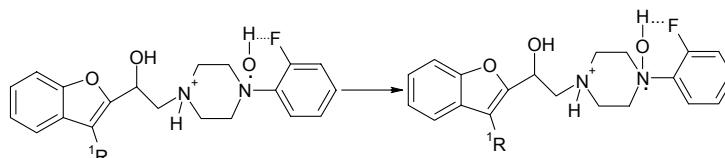


Schéma 3

aduktov DMPO s HO^{\bullet} radikálmi tak bez ako aj v prítomnosti študovaných látok. Spektrum pozostáva zo štyroch čiar hyperjemnej štruktúry s pomerom intenzít 1 : 2 : 2 : 1 (konštanty hyperjemnej interakcie sú $A_N = A_H = 1,48$ mT), $g = 2,0048$. Takéto EPR spektrum je typické pre spinový adukt DMPO s HO^{\bullet} (cit.¹⁶). Z tohto obrázku je vidieť, že z hľadiska vychytávania hydroxylových radikálov sú účinné iba zlúčeniny III a IV, t. j. 2-fluórfenylové deriváty, zatiaľ čo 4-fluórfenylové deriváty (I a II) naopak naznačujú zvýšenú tvorbu HO^{\bullet} radikálov (tab. I, 3. stĺpec). Predpokladáme, že záchyt HO^{\bullet} radikálov prebieha cez interakciu piperazínového dusíka N₁₇, na ktorom je naviazaný fluórfenyl podľa Schémy 3.

Tento predpoklad sa zdá byť veľmi pravdepodobný, lebo vysvetľuje aj skutočnosť, prečo 2-fluórfenyl deriváty vychytávajú HO^{\bullet} radikály, zatiaľ čo 4-fluórfenyl deriváty pôsobili prooxidačne, t. j. stimulovali vznik HO^{\bullet} radikálov. Vychytávanie HO^{\bullet} radikálov si možno vysvetliť nasledovnou úvahou: fluór v polohe 2 pôsobí ako „navigátor“ pre HO^{\bullet} radikály v dôsledku vodíkovej väzby medzi fluórom, ktorý nesie záporný náboj (tab. I) a vodíkom z HO^{\bullet} radikálu pri jeho zachytení na dusík N₁₇ v piperazínovom kruhu. Túto skutočnosť potvrdzujú NMR spektrá protónov zlúčeniny III v DMSO- d_6 , kde v 1H -NMR a ^{13}C -NMR spektrách týchto zlúčenín po pridaní peroxidu vodíka boli pozorovateľné výrazné zmeny v chemickom posune CH_2 skupín v piperazínovom kruhu a v ^{15}N -NMR spektrách tiež zmeny v chemických posunoch N₁₇ a N₁₄ (tab. II).

Chemické posuny, ppm, v 1H -NMR, v DMSO- d_6 , relat. TMS, bez aplikácie H_2O_2 , 11,37 bs, 1H,O11-H, 7,60 dd, $J_a = 7,5$ Hz, $J_b = 1,5$ Hz, 1H,C9-H, 7,53 d, $J = 7,5$ Hz, 1H,C6-H, 7,33 tt, $J_a = 7,5$ Hz, $J_b = 1,5$ Hz, 1H,C7-H, 7,27 tt, $J_a = 7,5$ Hz, $J_b = 1,2$ Hz, 2H,C22,24-H, 7,27 tt, $J_a = 7,5$ Hz, $J_b = 1,5$ Hz, 1H,C8-H, 7,02 dd, $J_a = 7,5$ Hz, $J_b = 1,2$ Hz, 2H,C21,25-H, 6,87 tt, $J_a = 7,5$ Hz, $J_b = 1,2$ Hz, 1H,C23-H, 5,74 bs, H^+ , 5,67 dd, $J_a = 10,3$ Hz, $J_b = 2,3$ Hz, 1H,C10-H, 3,91 d, $J = 10,8$ Hz, 1H,C15-H_a, 3,83 d, $J = 10,8$ Hz, 1H,C16-H_a, 3,83 d, $J = 10,8$ Hz, 1H,C18-H_a, 3,70 t, $J = 10,3$ Hz, 1H,C13-H_a, 3,68 d, $J = 10,8$ Hz, 1H,C19-H_a, 3,50 d, $J = 10,3$ Hz, 1H,C13-H_b, 3,32 d, $J = 10,8$ Hz, 1H,C15-H_b, 3,30 d, $J = 10,8$ Hz, 1H,C19-H_b, 3,27 d, $J = 10,8$ Hz, 1H,C18-H_b, 3,22 d, $J = 10,8$ Hz, 1H,C16-H_b, 2,30 s, 3H,C12-H, ^{13}C -NMR, 153,24 C5, 151,08 C2, 149,38 C20, 129,24 C4, 129,08 C22,24, 124,65 C7, 122,54 C8, 120,10 C23, 119,76 C9, 115,97 C21,25, 112,02 C3, 110,91 C6, 59,89 C10, 58,80 C13, 51,96 C15, 50,86 C19, 45,35 C16,18, 7,51 C12, 15N,N-HMBC/, 61,90 N17, 50,84 N14.

Tabuľka II
Rozdiely v chemických posunoch zlúčeniny III

Zmeny posunov	² H,C13-H	² H,C15-H	² H,C16-H	² H,C18-H	² H,C19-H	¹ H,C21-H	¹ H,C25-H
¹ H-NMR	0,66(a) 0,39(b)	0,61(a) 0,40(b)	0,57(a) 0,11(b)	0,55(a) 0,33(b)	0,38(a) 0,39(b)	0,84	–0,08
¹³ C-NMR	2,23	7,87	7,87	1,87	8,60	5,21	2,07
¹⁵ N-NMR	N14 –56,36	N17 –63,32					

Chemické posuny, ppm, v ¹H-NMR, v DMSO-d₆, relat. TMS, po aplikácii H₂O₂, ¹H-NMR, DMSO-d₆, /po aplikaci H₂O₂/, 7,86 dd, J_a = 20,0 Hz, J_b = 2,4 Hz, ¹H,C21-H, 7,60 t, J = 7,9 Hz, ¹H,C22-H, 7,52 dd, J_a = 7,3 Hz, J_b = 1,1 Hz, ¹H,C9-H, 7,42 dd, J_a = 7,3 Hz, J_b = 1,1 Hz, ¹H,C6-H, 7,26 tt, J_a = 7,3 Hz, J_b = 1,1 Hz, ¹H,C7-H, 7,24 t, J = 7,9 Hz, ¹H,C24-H, 7,19 tt, J_a = 7,3 Hz, J_b = 1,1 Hz, ¹H,C8-H, 6,94 dd, J_a = 7,9 Hz, J_b = 1,2 Hz, ¹H,C25-H, 6,86 tt, J_a = 7,9 Hz, J_b = 1,2 Hz, ¹H,C23-H, 5,69 d, J = 13,0 Hz, ¹H,C10-H, 4,52 d, J = 13,0 Hz, ¹H,C15-H_a, 4,40 d, J = 13,0 Hz, ¹H,C16-H_a, 4,38 d, J = 13,0 Hz, ¹H,C18-H_a, 4,36 t, J = 11,3 Hz, ¹H,C13-H_a, 4,06 d, J = 13,0 Hz, ¹H,C19-H_a, 3,89 d, J = 11,3 Hz, ¹H,C13-H_b, 3,72 d, J = 13,0 Hz, ¹H,C15-H_b, 3,69 d, J = 13,0 Hz, ¹H,C19-H_b, 3,60 d, J = 13,0 Hz, ¹H,C18-H_b, 3,33 dd, J_a = 13,0 Hz, J_b = 3,0 Hz, ¹H,C16-H_b, ¹³C-NMR, 154,89 C5, 150,47 C2, 149,20 C20, 132,47 C22, 130,82 C24, 130,48 C4, 126,59 C7, 124,30 C8, 122,68 C9, 121,48 C23, 121,18 C21, 118,04 C25, 115,01 C3, 112,52 C6, 61,03 C13, 60,74 C10, 59,83 C15, 59,46 C19, 47,33 C16, 47,22 C18, 8,42 C12, ¹⁵N/N-HMQC, n.p., N14, N17, ¹⁵N/N-HMBC, –1,42 N17, –5,52 N14.

Záver

Zo štúdia antioxidačných vlastností štyroch derivátov benzofurán-2-yletanolamínu bolo zistené, že študované zlúčeniny vykazujú veľmi špecifické redoxné vlastnosti:

- majú veľmi slabú účinnosť na vychytávanie DPPH radikálov,
- testované látky superoxidové aniónové radikály nevychytávajú, naopak pôsobia prooxidačne t.j. zvyšujú tvorbu O₂[•] radikálov.
- z hľadiska vychytávania hydroxylových radikálov pôsobia v závislosti na substitúcii fluórfenylpiperázínovej časti molekúl, pričom antioxidačnú aktivitu vykazujú iba 2-fluórfenyl deriváty zatiaľ čo 4-fluórfenyl deriváty pôsobia prooxidačne, Predpokladaný mechanizmus reakcie hydroxylového radikálu, potvrdený NMR spektroskopiou, je založený na interakcii s neprotonizovaným atómom dusíka N₁₇ a stabilizácii produktu vodíkovou väzbou s atómom fluóru 2-fluórfenylového substituenta.

Práca bola podporovaná grantmi MŠ SR VEGA č. 1/0516/03 03, 1/3411/06 a MŠMT ČR VZ MSM6198959218.

LITERATÚRA

- Koch-Weser J.: Am. Heart J. 90, 93 (1975).
- Cai H., Harrison D. G.: Circ. Res. 87, 840 (2000).
- Friedman J., Peleg E., Kagan, T., Shnizer, S., Rosenthal, T.: Am. J. Hypertens. 16, 1049 (2003).
- Ceaser E. K., Moellering D. R., Shiva S., Ramachandran A., Landar A., Venkartraman A., Crawford J., Patel R., Dickinson D. A., Ulasova E., Ji S., Darley-Usmar V. M.: Biochem. Soc. Trans. 32, 151 (2004).
- Hayden M. R., Tyagi S. C.: Cardiovasc. Diabetol. 1, 1 (2002).
- Mimić-Oka J., Simić D. V., Simić T. P.: Facta universitatis University of Niš. Ser. Med. Biol. 6, 11 (1999).
- Tumová I., Račanská E., Csöllei J., Ecker G., Otrusník R., Švec P. Čes. Slov. Farm. 44, 133 (1997).
- Fothergill G. A., Osbond J. M., Wickens J. C.: Arzneim.-Forsch. 27, 978 (1997).
- Hamilton T. C., Parkes M. W.: Arzneim.-Forsch. 27, 1410 (1977).
- Ráčanská E., Kurfürst P., Csöllei J.: Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae 51, 182 (2004).
- Kurfürst P., Marek J., Vančo J., Csöllei J.: Acta Cryst. C 60, o494 (2004).
- Paoletti F., Mocali A., Aldinucci D.: Chem.-Biol. Interactions 76, 3 (1990)
- Šeršeň F., Grančai D., Nagy M., Mučaji P.: Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae 52, 204 (2005).
- Dewar M. J. S., Zoebisch E. G., Healy E. F., Stewart J. P. P.: J. Am. Chem. Soc. 107, 3902 (1985).
- Dewar M. J. S., Zoebisch E. G.: Theochem. 180, 1 (1988).
- Li A. S. W., Cummings K. B., Roethling H. P., Buettner G. R., Chignell C. F.: J. Mag. Resonance. 79, 140 (1988). The database is available through internet at <http://epr.niehs.nih.gov/>.

F. Šeršeň^a, D. Loss^b, J. Csöllei^c, I. Popa^d, J. Vančo^e, and F. Gregář^e (^a *Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*, ^b *Department of Organic Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*, ^c *Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic*, ^d *Laboratory of Growth Regulators, Palacky University, Olomouc, Czech Republic*, ^e *Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Matej Bel University, Banská Bystrica, Slovak Republic*): **Antioxidative Activity of Potential Antihypertensives with Dual Effect**

The antioxidative properties of four 1-(2-benzofuran-2-yl-2-hydroxyethyl)-4-phenylpiperazines were studied

by indirect spectrophotometric and direct ESR spin-trap methods. The radical scavenging activity of the tested compounds was determined. The compounds exhibit interesting structure-specific redox properties. Scavenging of DPPH radicals gave very poor results. The studied compounds did not affect the elimination of superoxide anion radicals; however, they caused stimulation of $O_2^{\bullet-}$ radical production. The hydroxyl radicals, however, were scavenged only by 2-fluorophenyl derivatives, whereas the 4-fluorophenyl derivatives exhibited a slightly prooxidative effect. The capture of HO^{\bullet} radicals by 2-fluorophenyl derivatives was, according to the results of NMR analyses, attributed to the interaction with non-protonated piperazine nitrogen atom, which is stabilized by the hydrogen bond between the hydroxy group and fluorine atom.

17. seminář o separační chemii a analýze toxických látek

Termín: 18. – 20. června 2007

Místo: Institut ochrany obyvatelstva, Na Lužci, Lázně Bohdaneč (u Pardubic)

Seminář je pořádán ve spolupráci s odbornými skupinami jaderné chemie, toxikologické chemie a analytické toxikologie při České společnosti chemické

Seminář je zaměřen na:

- stopovou analýzu radionuklidů, anorganických a organických toxických látek v životním prostředí, toxikologii a při haváriích spojených s výronem nebezpečných škodlivin,
- metody separace a koncentrace isotopů, anorganických a organických toxických látek v životním prostředí a toxikologii,
- mobilní analýzu v toxikologii, kontrole životního prostředí a při haváriích spojených s výronem nebezpečných škodlivin,
- analýzu toxinů a BBP.

Odborní garanti: doc. Ing. Věra Křížová, DrSc., Vysoká škola chemicko-technologická Praha, Ústav analytické chemie, prof. Ing. Jiří Ševčík, DrSc., Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy Praha, Katedra analytické chemie

Organizační garant: RNDr. Bedřich Uchytíl, CSc., Institut ochrany obyvatelstva, e-mail: bedrich.uchytil@email.cz, mobil 724 355 197, pevná linka 950 860 134

Bližší informace jsou dostupné na www.ioolb.cz.

ŠTÚDIUM VYBRANÝCH EXTRA-CELULÁRNÝCH A IMOBILIZOVANÝCH AMINOPEPTIDÁZ LASTOVIČNÍKA

JÁN STANO^a, KAROL MIČIETA^b, MARCELA KOREŇOVÁ^a a VÍTAZSLAVA BLANÁRIKOVÁ^a

^a Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, ^b Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Révová 39, 811 02 Bratislava
micieta@fns.uniba.sk

Došlo 30.5.05, prepracované 15.9.06, prijaté 4.10.06.

Kľúčové slová: distribúcia, imobilizácia, permeabilizácia, lastovičník, aminopeptidázy

Venované pamiatke prof. MUDr. Zdenka Lojdu DrSc., F.I.A.C., h.c. multiplex, JUDr. h.c., vynikajúcemu odborníkovi na poli histochemie a cytochemie, ktorý bol dlhoročným organizátorom európskych sympózií v oblasti pokroku základnej, aplikovanej a diagnostickej histochemie (*7. 12. 1927 – † 24. 4. 2004).

Úvod

Zdroje prírodných látok sú limitované. Mnohé biologicky aktívne látky možno pripraviť pomocou moderných biotechnologických procesov. V poľnohospodárstve a mikropropagácii nachádzajú uplatnenie aj početné techniky kultivácie rastlinných buniek a pletív. Pri biosyntéze a biotransformácii prírodných látok sa využíva celý rad multifunkčných enzýmových komplexov. Kvalita potravín je vo veľkej miere podmienená a závislá na kvalite, kvantite, štruktúre a fyzikálno-chemických vlastnostiach peptidov, cukrov a iných zložiek potravín. Biotransformácia takýchto zlúčenín hrá dôležitú úlohu v rôznych biotechnologických procesoch^{1–3}. Ukázalo sa, že peptidy a peptidhydrolytické enzýmy majú dôležitú úlohu v rôznych oblastiach základného a aplikovaného výskumu^{2,4}.

Imobilizácia buniek a enzýmov reprezentuje efektívny spôsob ochrany mnohých biokatalyzátorov, ktoré nachádzajú uplatnenie vo výrobných procesoch. Rastlinné bunky imobilizoval prvý raz Brodelius⁵. Obaľovanie (enkapsulácia) buniek a enzýmov hydrogélmi sa zaraďuje medzi frekventované imobilizačné techniky. Spontánnu adhéziu, ako aj kovalentnú väzbu buniek na povrch nosičov popisali Jirků a spol.⁶, Gill a Ballesteros⁷. Pri imobilizácii buniek sa nedávno použil polyvinylalkohol⁸ a glutaraldehyd⁴.

Aminopeptidáza (aminoacylpeptidhydroláza EC 3.4.11)

katalyzuje hydrolýzu *N*-terminálnych aminokyselinových jednotiek peptidov resp. syntetických substrátov. V tejto práci je popísaná enzýmová hydrolýza *N*-terminálnych peptidových väzieb syntetických substrátov, *p*-nitroanilidov aminokyselín voľnými a glutaraldehydom alebo alginátom ako aj pektátom imobilizovanými bunkami lastovičníka. Pri imobilizácii sa využívajú rôzne techniky.

Dostupnosť jednoduchej a rýchlej skriningovej metódy detekcie aminokyselín má veľký význam pre vedecké a priemyselné účely. Pri tejto jednoduchej a rýchlej metóde dôkazu a stanovenia extracelulárnych aminopeptidáz sa používajú syntetické substráty β -naftylamidy aminokyselín.

Experimentálna časť

Rastlinný materiál

Kalusové a suspenzné kultúry lastovičníka väčšieho (*Chelidonium majus* L.) sa odvodili zo sterilných kľúčnych rastlín. Takto odvodené kultúry sa pestovali v kultivačnom médiu podľa Murashigeho a Skooga⁹ s prídavkom 1 mg l^{-1} kyseliny dichlórfenoxyoctovej, $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ kinetínu a 3 % sacharózy na rotačnej trepačke za štandardných podmienok ($24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 % relatívnej vlhkosti, pri difúznom osvetlení a 120 rpm min^{-1}) v priebehu 14 dní.

Permeabilizácia buniek Tweenom 80

Suspenzne pestované bunky sa po odfiltrovaní a premytí $1 \text{ l } 0,15 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl permeabilizovali 5 % Tweenom 80 (15 g/50 ml) 3 hodiny za pomalého miešania (60 rpm) pri laboratórnej teplote. Permeabilizované bunky sa premyli 2 l destilovanej vody a 3 l $0,15 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl.

Imobilizácia buniek glutaraldehydom

Permeabilizované bunky sa vložili do $0,15 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl (15 g/50 ml), pomaly sa pridalo 5 ml 25% glutaraldehydu a pri laboratórnej teplote sa za pomalého miešania (60 rpm) imobilizovali 2 hodiny. Imobilizované bunky sa premyli 2,5 l destilovanej vody, 3 l $0,15 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl a uchovali v $0,15 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Imobilizácia buniek pektátom a alginátom

Suspenzne pestované bunky sa po odfiltrovaní imobilizovali jednotlivito pektátom a alginátom (Na-soľ). 5 g buniek sa resuspendovalo jednotlivito v 20 ml 5 % pektátu alebo alginátu a potom sa pomaly kvapkalo (pomocou kapiláry) do $100 \text{ ml } 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ CaCl_2 (za stáleho miešania 50 rpm). Bunky imobilizované enkapsuláciou (obaľovaním) hydrogélom alginátu alebo pektátu sa nachádzajú v homogénnych guľičkách o priemere cca 4 mm. Gélové guľičky (100 guľičiek obsahuje 1 g buniek) s imobilizovanými bunkami sa potom odfiltrovali a premyli 500 ml $0,15 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl. Guľičky (3 g) sa potom preniesli do 20 ml kultivačného média a kultivovali v 100 ml Erlenmayerových bankách na rotačnej trepačke (80 rpm, cit.^{10,11}).

Stanovenie čerstvej hmotnosti a sušiny

Čerstvá hmotnosť a sušina suspenznej kultúry a imobilizovaných buniek sa stanovili gravimetricky po vysušení do konštantnej hmotnosti pri 105 °C.

Utilizácia glukózy

Utilizácia glukózy suspenznými a imobilizovanými bunkami sa sledovala 60 minút. Bunky suspenzných kultúr a imobilizované bunky sa preniesli do roztoku glukózy 200 mg l⁻¹ v 0,05 mol l⁻¹ Na-fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,0 a úbytok glukózy sa sledoval podľa Trindera¹².

Viabilita buniek

Viabilita buniek sa sledovala podľa Dixona¹³ za použitia trifenylnitrazólium chloridu (TTC), fluoresceín diacetátu a kyslíkovej elektródy.

Dôkaz extracelulárnych aminopeptidáz

Pri dôkaze extracelulárnej L-arginínaminopeptidázy (L-Arg-AP), L-fenylalanínaminopeptidázy (L-Phe-AP) a L-tyrozinaminopeptidázy (L-Tyr-AP) sa použili β-naftylamidy (βNA) týchto aminokyselín L-Arg, L-Phe a L-Tyr: L-Arg-βNA, L-Phe-βNA a L-Tyr-βNA. Enzymovo uvoľnený β-naftol kopuluje s Fast Garnet GBC soľou za tvorby odpovedajúceho azofarbiva. L-Arg-βNA, L-Phe-βNA alebo L-Tyr-βNA (2 mg) sa jednotlivo rozpustilo v 0,5 ml dimetylformamidu a 4,5 ml 0,1 mol l⁻¹ Na-fosfátového tlmivého roztoku pH 6,5 s prídavkom 10 mg Fast Garnet GBC soli. K tomuto roztoku sa pridalo 5 ml 2 % agaru v 0,1 mol l⁻¹ Na-fosfátovom tlmivom roztoku (pH 6,5), nalialo do Petriho misky a autoklávovalo.

Takto pripravené agarové platne sa inokulovali bunkami kalusových kultúr lastovičníka a sterilne vypestovanými kľúčnymi rastlinami lastovičníka (4–6 dní starých)¹³ a inkubovali 30–90 minút.

Stanovenie aktivity intra- a extracelulárnych aminopeptidáz

Príprava enzýmu

Pri stanovení intracelulárnej aktivity enzýmu sa použili bunky suspenzných kultúr. Bunky (10 g) sa premyli 2 l destilovanej vody, zhomogenizovalo v predchladenej trecej miske 1:1 (g ml⁻¹) s 0,1 mol l⁻¹ Na-fosfátovým tlmivým roztokom pH 7,0 pri 4 °C. Homogenát sa prefiltraval cez silonovú tkaninu, centrifúgoval (10 min, 15 000 g pri 4 °C) a použil ako enzýmový preparát.

Pri stanovení extracelulárnej aktivity sa použilo kultivačné médium bez buniek (centrifugácia 10 min, 2000 g).

Stanovenie aktivity aminopeptidázy

Aktivity L-Arg-AP, L-Phe-AP a L-Tyr-AP sa stanovili metódou podľa Kovácsa a spol.¹⁴ pomocou syntetických chromogénnych substrátov L-arginín-*p*-nitroanilid (L-Arg-pNA), L-prolín-*p*-nitroanilid (L-Pro-pNA) a L-tyrozin-*p*-nitroanilid (L-Tyr-pNA). Reakčná sústava pozostáva z 1,7 ml Theorell-Stenhagenovho tlmivého roztoku

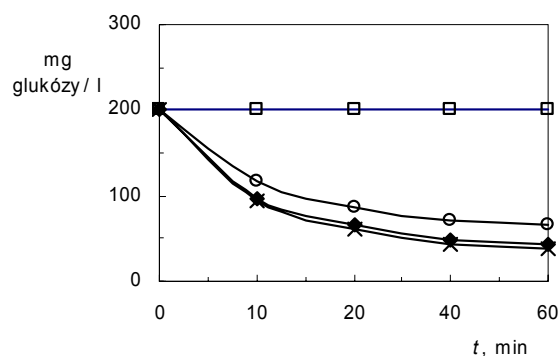
(0,1 mol l⁻¹ H₃PO₄-NaOH) pH 7,8, 6,8 a 7,2 jednotlivo, 0,3 ml substrátu: 2·10⁻³ mol l⁻¹ L-Arg-pNA, 7,6·10⁻³ mol l⁻¹ L-Phe-pNA a 1,9·10⁻³ mol l⁻¹ L-Tyr-pNA. Imobilizované a natívne bunky (0,1–0,3 g) alebo enzýmový preparát (0,1–0,3 ml) sa predinkubovali 10 minút pri 30 °C v tlmivom roztoku a potom sa pridal príslušný substrát. V kontrolných vzorkách bol enzýmový preparát tepelne inaktívovaný (5 min pri 100 °C). Reakčné sústavy inkubovali 30 minút pri 30 °C a reakcia sa zastavila pridaním 0,5 ml 30% kyseliny octovej. Koncentrácia enzýmuvo uvoľneného *p*-nitroanilínu sa hodnotila spektrofotometricky pri 410 nm. Enzýmová aktivita je vyjadrená v kataloch. Obsah bielkovín sa stanovil podľa Doumasa a spol.¹⁵ za použitia hovädzieho sérumalbumínu ako štandardnej bielkoviny.

Výsledky a diskusia

Rozvoj imobilizačných techník má veľký vplyv na vývoj technológií. Imobilizácia buniek resp. biokatalyzátorov reprezentuje veľmi dôležitý spôsob uchovávanania (stabilizácie) vysoko účinných biokatalyzátorov (enzýmov), ktoré sú dôležité pre biotransformačné procesy^{7,16}.

Enkapsulácia (obaľovanie) buniek resp. enzýmov hydrogélmi prírodného alebo syntetického pôvodu nachádza uplatnenie v základnom a aplikovanom výskume, ako aj v priemyselnom meradle. V tejto práci sme zamerali svoju pozornosť na štúdium imobilizačných techník pomocou alginátu, pektátu a glutaraldehydu.

Pri imobilizácii buniek lastovičníka glutaraldehydom sa v porovnaní s bunkami suspenzných kultúr pozorovali niektoré zmeny – mierna plazmolýza a zhlukovanie buniek. Pri glutaraldehydom imobilizovaných bunkách sa pri testovaní s 2,3,5-trifenylnitrazólium chloridom (TTC),



Obr. 1. Časový priebeh využitia glukózy v bunkách imobilizovaných glutaraldehydom, alginátom, pektátom a v bunkách suspenznej kultúry (10 g buniek, 20 ml tlmivého roztoku s glukózou⁻¹), □ glutaraldehyd, ○ suspenzná kultúra, ◆ pektát, × alginát

Tabuľka I

Aktivita arginínaminopeptidázy (L-Arg-AP), fenylalanínaminopeptidázy (L-Phe-AP) a tyrozinaminopeptidázy (L-Tyr-AP) v 14-dňových bunkách suspenznej kultúry lastovičnika permeabilizovanej Tweenom 80 a imobilizovanej glutaraldehydom

Bunky	Proteíny [mg g ⁻¹ sušiny]	Aktivita [nkat g ⁻¹ sušiny]			Špecifická aktivita [nkat mg ⁻¹ proteínu]		
		L-Arg-AP	L-Phe-AP	L-Tyr-AP	L-Arg-AP	L-Phe-AP	L-Tyr-AP
Suspenzia	12,8 ± 0,1	38,6 ± 0,1	31,4 ± 0,1	36,8 ± 0,1	3,16	2,45	2,88
Permeabilizované	5,6 ± 0,1	41,2 ± 0,1	36,4 ± 0,1	40,2 ± 0,1	7,36	6,50	7,18
Imobilizované	5,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1	0,47	0,42	0,44

fluoresceín diacetátom a meraní spotreby kyslíka nezaznamenala viabilita. Glutaraldehydom imobilizované bunky neutilizujú glukózu (obr. 1).

Po permeabilizácii Tweenom 80 a imobilizácii glutaraldehydom dochádza k výraznejšiemu poklesu obsahu bielkovín a k preukaznému poklesu aktivity aminopeptidáz (tabuľka I).

Srinivasan a spol.¹⁷ zistili, že po permeabilizácii bunkovej steny kvasiniek dochádza k preukaznému zvýšeniu fenylalanínaminokarboxylázy (PAL). Pri permeabilizácii bunkovej steny suspenzných kultúr (rastlinných) buniek sa také významné zvýšenie enzymovej aktivity nepozorovalo.

Imobilizáciu buniek pomocou glutaraldehydu na rozdiel od aminopeptidáz možno vhodne aplikovať pri α - a β -galaktozidáze, invertáze, L-tyrozindekarboxyláze a L-DOPA-dekarboxyláze^{3,4}. Pri imobilizácii buniek a bielkovín pomocou glutaraldehydu dochádza k ich vnútornému zosieťovaniu¹⁶. Táto skutočnosť poukazuje na možnosť reakcie imobilizačného agens glutaraldehydu s aktívnym centrom aminopeptidáz¹⁸. Predložené výsledky poukazujú na to, že ako permeabilizácia bunkovej steny suspenzných kultúr rastlinného pôvodu, tak aj imobilizácia bifunkčným agens glutaraldehydom si vyžaduje ďalšie štúdium.

Imobilizácia testovaných buniek hydrogélmi alginátu a pektátu (tabuľka II) naznačuje, že pre početné biokatalyzátory a bunky je táto metóda oveľa vhodnejšia než imobilizácia glutaraldehydom^{10,19,20}.

Imobilizované bunky majú v porovnaní s bunkami suspenzných kultúr tieto výhody: zabezpečenie nepretržitého prístupu, zlepšenie separácie biokatalyzátora, predĺže-

nie polčasu biokatalyzátora, fyzikálnu ochranu voči strižným silám, ochranu pred zhlukovaním, stimuláciu produkcie sekundárnych metabolitov, konzerváciu multifunkčného enzymového systému^{7,10,21,22}.

Biotransformácia pomocou imobilizovaných alebo voľných biokatalyzátorov neposkytuje iba alternatívne a účinné riešenie syntézy početných látok, ale tiež ponúka environmentálne nezávadné technológie, ktoré využívajú veľmi prijateľné reakčné podmienky²⁰.

Výsledky predloženého štúdia naznačujú, že imobilizácia glutaraldehydom vedie k vnútornému zosieťovaniu testovaného materiálu, čo spôsobuje významný pokles aktivity aminopeptidáz. Z tohto dôvodu je aplikácia hydrogélom oveľa vhodnejšia. Proteolytické enzýmy ako endo- a exopeptidázy sa zúčastňujú mnohých biologických procesov ako je regulácia peptidových hormónov, mobilizácia a užitie zásobných bielkovín, imunologická aktivácia špecializovaných buniek, recyklácia proteínov, ktoré obsahujú prolín a pod.^{23,24,25}

Proteázy, ktoré sa podieľajú na transformácii peptidov na voľné aminokyseliny, sú dôležité aj pre sekundárny metabolizmus^{26,27}. Dostupnosť jednoduchšej a rýchlejšej metódy detekcie aminopeptidáz má veľký význam pre vedecké aj komerčné účely. Syntetické substráty ako 4-(fenylazo) fenylamidy (PAP amidy), β -naftylamidy a *p*-nitroanilidy aminokyselín spolu s ďalšími chromogénnymi substrátmi sú vhodné pre tento účel^{27,28}.

Pri dôkaze a stanovení intra- a extracelulárnej aktivity L-Arg-AP, L-Phe-AP a L-Tyr-AP sa použili β -naftylamidy a *p*-nitroanilidy L-Arg, L-Pro a L-Tyr. Na kultivačné médiá (agarové platne) s prídavkom substrátov L-Arg- β NA, L-Phe- β NA a L-Tyr- β NA jednotlivo a s Fast Garnet GBC

Tabuľka II

Aktivita arginínaminopeptidázy (L-Arg-AP), fenylalanínaminopeptidázy (L-Phe-AP) a tyrozinaminopeptidázy (L-Tyr-AP) v 14-dňových bunkách suspenznej kultúry lastovičnika imobilizovanej obalovaním alginátom a pektátom

Bunky	Proteíny [mg g ⁻¹ sušiny]	Aktivita [nkat g ⁻¹ sušiny]			Špecifická aktivita [nkat mg ⁻¹ proteínu]		
		L-Arg-AP	L-Phe-AP	L-Tyr-AP	L-Arg-AP	L-Phe-AP	L-Tyr-AP
Suspenzia	12,8 ± 0,1	38,6 ± 0,1	31,4 ± 0,1	36,8 ± 0,1	3,16	2,45	2,88
Imobilizované alginátom	12,8 ± 0,1	13,1 ± 0,1	9,2 ± 0,1	10,8 ± 0,1	1,02	0,72	0,84
Imobilizované pektátom	12,8 ± 0,1	14,2 ± 0,1	9,6 ± 0,1	11,4 ± 0,1	1,11	0,75	0,89

Tabuľka III

Aktivita arginínaminopeptidázy v bunkách a médiu 14-dňovej suspenznej kultúry lastovičníka

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g ⁻¹ čerstvej hmoty]	Aktivita [nkat g ⁻¹ čerstvej hmoty]	Špecifická aktivita [nkat mg ⁻¹ proteínu]
Intracelulárna aktivita (homogenát z izolovaných buniek)	0,2	0,67 ± 0,07	2,90 ± 0,08	3,05
Extracelulárna aktivita (kultivačné médium bez buniek) ^a	1,0	0,27 ± 0,05	0,79 ± 0,07	2,92

^a Zodpovedajúca obsahu izolovaných buniek

Tabuľka IV

Aktivita fenylalanínaminopeptidázy v bunkách a médiu 14-dňovej suspenznej kultúry lastovičníka

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g ⁻¹ čerstvej hmoty]	Aktivita [nkat g ⁻¹ čerstvej hmoty]	Špecifická aktivita [nkat mg ⁻¹ proteínu]
Intracelulárna aktivita (homogenát z izolovaných buniek)	0,2	0,67 ± 0,07	1,57 ± 0,08	2,35
Extracelulárna aktivita (kultivačné médium bez buniek) ^a	1,0	0,27 ± 0,05	0,55 ± 0,07	2,05

^a Zodpovedajúca obsahu izolovaných buniek

soľou (v prípade kontroly substrát chýbal)^{29,30} sa inokulovali bunky rastúcich kalusov. Inokulá sa ponechali na kultivačných médiách 30–60 minút. Extracelulárne aminopeptidázy sa detekovali pomocou hnedočerveného zafarbenia, ktoré vzniká simultánnou azokopoláciou Fast Garnet GBC soli a zo substrátu enzýmovo uvoľneného β-naftolu pod a okolo inokula na agarovej platni. Po inokulácii kultivačného média bez substrátu resp. s tepelne inaktivovaným kalusom (10 min pri 100 °C) sa žiadne farebné zmeny nepozorovali.

Po vysadení sterilných kľúčnych rastlín lastovičníka na agarové platne so substrátom a Fast Garnet GBC soľou sa pozorovali farebné zmeny (hnedočervené zafarbenie) na koreňku, koreňových vláskoch, ako aj na platni v mieste ich kontaktu s ňou.

Porovnanie distribúcie intra- a extracelulárnej aktivity študovaného enzýmu poukazuje na minoritné zastúpenie

extracelulárnych a majoritné zastúpenie intracelulárnych aminopeptidáz (tabuľka III, IV, V). Distribúcia intra- a extracelulárnych aminopeptidáz a invertázy je podobná³¹. Zaujímavé je, že aktivita extracelulárnej α- a β-galaktosidázy je oveľa vyššia (3–4krát) než invertázy a aminopeptidáz^{3,31}.

Výsledky predloženej práce naznačujú, že metódu na dôkaz sekrécie aminopeptidáz bude možno využiť pri výbere buniek vhodných pre biotechnologické účely. Imobilizované bunky, ako aj biokatalyzátory typu aminopeptidáz resp. iných hydroláz majú biotechnologické uplatnenie v potravinárskom a farmaceutickom priemysle a výskume^{3,31,32}. Predpokladáme, že aminopeptidázy ako aj iné proteázy sa využijú pri príprave aminokyselín resp. oligopeptidov potrebných pre výskumné a priemyselné účely. Napriek tomu, že tieto enzýmy sú prítomné aj v rastlinách, doposiaľ sa tento zdroj pre biotechnologické účely nevyužíva.

Tabuľka V

Aktivita tyrozínaminopeptidázy v bunkách a médiu 14-dňovej suspenznej kultúry lastovičníka

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g ⁻¹ čerstvej hmoty]	Aktivita [nkat g ⁻¹ čerstvej hmoty]	Špecifická aktivita [nkat mg ⁻¹ proteínu]
Intracelulárna aktivita (homogenát z izolovaných buniek)	0,2	0,60 ± 0,07	1,77 ± 0,07	2,95
Extracelulárna aktivita (kultivačné médium bez buniek) ^a	1,0	0,27 ± 0,05	0,64 ± 0,07	2,35

^a Zodpovedajúca obsahu izolovaných buniek

Záver

V práci sa testovala vhodnosť aplikácie rôznych techník pri imobilizácii aminopeptidáz v suspenzných kultúrach lastovičnika. Výsledky experimentov poukazujú na to, že pri imobilizácii aminopeptidáz sú hydrogély alginátu a pektátu oveľa výhodnejšie než aplikácia glutaraldehydu (zosieťovanie glutaraldehydom).

Majoritná časť aktivity študovaných aminopeptidáz sa nachádza v intracelulárnej frakcii a iba minoritná časť v extracelulárnej frakcii.

Pomocou syntetických substrátov (β -naftylamidov aminokyselín) a Fast Garnet GBC soli sa vypracovala jednoduchá, rýchla a spoľahlivá metóda dôkazu extracelulárnych aminopeptidáz.

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

LITERATÚRA

- Szczodrac J.: Acta Biotechnol. 19, 235 (1999).
- Siekel P., Mičieta K.: Biológia (Bratislava) 53, 791 (1998).
- Tilemann E., Tokhtaeva Z., Sedlárová E., Barth A., Valent A., Siekel P., Ďuríček M.: Chem. Nat. Prod. 39, 394 (2003).
- Stano J., Nemeč P., Weissová K., Kovács P., Kákoniová D., Lišková D.: Phytochemistry 38, 859 (1995).
- Brodélius P., Deus B., Moesbach K., Zenk M. H.: FEBS Lett. 103, 93 (1979).
- Jirků V., Macek T., Vaněk T., Krumphanzl V., Kubánek V.: Biotechnol. Lett. 3, 447 (1981).
- Gill I., Ballesteros A.: Trends Biotechnol. 18, 282 (2000).
- Wu K. Y. A., Wisecarver K. D.: Biotechnol. Bioeng. 39, 221 (1992).
- Murashige T., Skoog F.: Physiol. Plant. 15, 473 (1962).
- Furuya T., Yoshikawa T., Taira M.: Phytochemistry 23, 999 (1984).
- Schoichet M. S., Li R. H., White M. L., Winn S. R.: Biotechnol. Bioeng. 50, 374 (1996).
- Trinder P.: J. Clin. Pathol. 22, 158 (1969).
- Dixon R. A.: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, Washington 1991.
- Kovács P., Dufková-Barančeková J., Pšenák M.: Biológia (Bratislava) 40, 345 (1985).
- Doumas T. B., Bayse D. D., Carter R. J., Peters T., Schaffer R.: Clin. Chem. 27, 1642 (1981).
- Báleš V., Gemeiner P., Kuniak Ľ., Rexová-Benková L., Vojtišek V., Zemek J.: *Enzymové inžinierstvo*. Alfa, Bratislava 1987.
- Srinivansan, Nagajothi A. R., Gowda L. R., Bhat S. G.: Biotech. Tech. 8, 729 (1994).
- Elcin Y. M., Sacak M.: Appl. Biochem. Biotechnol. 60, 19 (1996).
- Berlin J., Martin B., Nowak J., White L., Wray V., Strack D.: Z. Naturforsch. 44, 249. (1989).
- Trelles J. A., Bentancor L., Schoijet A., Porro S., Lewkowicz E. S., Sinisterra J., Iribarren A. M.: Chem. Biodiv. 1, 280 (2004).
- Hulst A. A.: Enzyme Microbiol. Technol. 11, 546 (1989).
- Hasal P., Vojtišek V., Čejková A., Kleczek P., Kotroňová O.: Enzyme Microbiol. Technol. 14, 211 (1992).
- Bilka F., Kľúčovská J., Bilková A., Benešová M.: Biológia (Bratislava) 57, 761 (2002).
- Mertová A., Almásiová M., Perečko D., Bilka F., Bezáková L., Pšenák M., Kutejová E.: Biológia (Bratislava) 57, 739 (2002).
- Balážová A., Pšenák M.: Chem. Listy 92, 1006 (1998).
- Benešová M., Bilka F., Pšenák M., Kovács P.: Acta Fac. Pharm. Univ. Comenianae 49, 37 (2002).
- Mrestani-Klaus C., Lorey S., Faust J., Brühling F., Neubert K., v knihe: *Endopeptidases* (Langer J., Ansonge S., ed.), kap. 1. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York 2002.
- Kákoniová D., Stano J., Neubert K., Grančai D., Andriamainty F. H., Kresánek J., Tu N.: Bull. Food Res. 38, 55 (1999).
- Stoward P. J., Pearse A. G. E.: *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Vol. 3. Churchill Livingstone, Edinburgh 1991.
- Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T. H.: *Enzyme Histochemistry. A Laboratory Manual*. Springer, Berlin 1979.
- Stano J., Mičieta K., Tintemann H., Kovács P.: Pharmazie 59, 323 (2004).
- Mučaji P., Grančai D., Nagy M., Buděšinsky M., Ubík K.: Pharmazie 54, 714 (1999).

J. Stano^a, K. Mičieta^b, M. Koreňová^a, and V. Blanáriková^a (^aFaculty of Pharmacy, ^bFaculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava): **Study of Selected Extracellular and Immobilized Aminopeptidases in Greater Celandine**

Celandine cells, after permeabilization in Tween 80, were immobilized by crosslinking with glutaraldehyde without any carrier. The cells showed significantly lower aminopeptidase activities than untreated cells. Pectate and alginate hydrogels were successfully used for immobilization of greater celandine cells while retaining the activity of some aminopeptidases. A simple and rapid procedure for determination of extracellular aminopeptidases was developed using synthetic substrates. 4-Nitroanilides of amino acids were used as substrates for the determination of extracellular and intracellular enzymatic activities. The former were determined in culture media (without cells) whereas the latter in a cell suspension culture.

MIKROKRISTALICKÁ CELULOSA V PERORÁLNÍCH LÉKOVÝCH FORMÁCH

MILOSLAVA RABIŠKOVÁ, ADAM HÄRING,
KLÁRA MINCZINGEROVÁ, MARTIN
HAVLÁSEK a PETRA MUSILOVÁ

Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1–3, 612 42 Brno
rabiskovam@vfu.cz

Došlo 14.11.06, přijato 14.12.06.

Klíčová slova: mikrokrystalická celulóza, sodná sůl karmelosy, perorální lékové formy, pelety, extruze/ sferonizace

Úvod

Celulóza a její deriváty patří k důležitým farmaceutickým pomocným látkám. Celulóza samotná se používá v práškové a mikrokrystalické formě. Její deriváty mohou být ve vodě rozpustné (sodná sůl karmelosy, methylcelulóza), nerozpustné (ethylcelulóza), s rozpustností závislou na pH prostředí (celacefat) nebo mohou v hydrofilním prostředí bobtnat a tvořit více či méně propustné gely¹. Všechny tyto jejich vlastnosti je předurčují k formulaci lékových forem s řízeným uvolňováním léčiva, které zabezpečují prodloužený, zpožděný nebo pulzní účinek léčivé látky v živém organismu^{2,3}. Tyto sofistikované lékové formy jsou určeny pro aplikaci perorální⁴ i topickou⁵, využívají se i jako senzitivní hydrogely, reagující na změnu teploty, tlaku nebo pH (cit.⁶). Prášková celulóza, známá např. pod obchodními názvy Arbocel a Elcema⁷, má vysoký podíl amorfních částic, přijatelnou lisovatelnost a špatné tokové vlastnosti (sypanost). Často se používá jako plnivo a pojivo tablet a tobolek, rozpad podporující pomocná látka (rozvolňovadlo, desintegrant) nebo suspenzní činidlo. Zkoušela se také jako pomocná látka pro pelety vyráběné extruzí/ sferonizací, její vlastnosti nebyly však tak výhodné jako vlastnosti mikrokrystalické celulózy⁸.

Mikrokrystalická celulóza (MCC) má vyšší stupeň krystalinity, získává se částečnou hydrolyzou celulózy minerálními kyselinami, produkt se suší rozprašováním (sprejové sušení). Částice jsou velmi pórovité s velkým povrchem (130–270 m² g⁻¹) způsobeným nahodile seskupenými vláknitými mikrokrystaly; mají různou velikost a obsah vlhkosti. Typická velikost částic se pohybuje mezi 20–200 μm. MCC je mírně rozpustná v 5% roztoku hydroxidu sodného, prakticky nerozpustná ve vodě, zředěných kyselinách a většině organických rozpouštědel. Je to látka

velmi stálá, inkompatibilitu vykazuje se silnými oxidačními činidly. Používá se jako suché i vlhké pojivo a je důležitou pomocnou látkou při technologických procesech spojených s mechanickým namáháním. V tabletách se používá při vlhké granulaci i přímém lisování, kapilárním mechanismem usnadňuje průnik hydrofilních kapalin (např. trávicích šťáv) do výlisku a působí rychlý rozpad tablet⁷. Při přímém lisování se u MCC výborně uplatňuje její velká schopnost zhušťování daná rovnováhou mezi vysokou plasticitou resp. viskoelasticitou a malou křehkostí za vzniku pevných výlisků¹. Při výrobě pelet je nepostradatelnou pomocnou látkou u většiny technologií: používají se z ní vyrobená sférická jádra (Celphere, Cellets), vhodnou deformovatelností umožňuje výrobu pelet extruzí/ sferonizací i rotační aglomerací^{9,10}, kde se příznivě uplatňují mj. její lubrikační, adsorpční, antiadhezivní a sferonizační podporující vlastnosti. Je známá pod několika obchodními názvy, z nichž nejběžnější jsou Avicel, Ceolus, Emcocel, Vivapur.

Avicel[®] PH je nejstarším typem mikrokrystalické celulózy. Používá se hojně při výrobě tablet jako pojivo, plnivo, rozvolňovadlo i jako suché mazadlo. Je široce používaným peletizačním prostředkem díky schopnosti zadržet a distribuovat vodu ve vlhké masě. Vyrobené sférické částice jsou tvrdé, s nízkou lomivostí, mohou obsahovat vysoké procento léčivé látky – nad 70 % (cit.¹¹). Průměrná velikost částic Avicelu PH 101 je 50 μm, celková hustota 0,32 g cm⁻³, obsah vlhkosti menší než 5 % (cit.⁷). Avicel PH 102 má průměrnou velikost částic 100 μm při stejném obsahu vlhkosti, Avicel PH 103 má stejně velké částice jako PH 101, ale nižší obsah vlhkosti, pod 3 %. Jemné částice (d = 20 μm) obsahuje Avicel PH 105, velmi nízký obsah vlhkosti (méně než 1,5 %) mají Avicel PH 112 a Avicel PH 113. Hrubé částice (d = 180 μm) jsou typické pro Avicel PH 200.

Ceolus[®] KG je nový typ mikrokrystalické celulózy s výraznými tyčinkovitými konfiguracemi částic. Vyznačuje se vyšší stlačitelností a schopností pojmout větší množství léčivé látky při zachování dobrých tokových vlastností. Díky použití menší lisovací síly při výrobě tablet umožňuje zpracovat také léčivé látky citlivé na vyšší tlak, jako jsou enzymy a antibiotika. Velikost částic se pohybuje od 75 μm (59 %) do 250 μm (≤ 10 %), hustota od 0,13 do 0,23 g cm⁻³ (cit.^{11,12}).

Mikrokrystalická celulóza s oxidem křemičitým je fyzikální směs MCC se 2 % koloidního oxidu křemičitého. Je známá pod názvem ProSolv. Oxid křemičitý je k povrchu částic MCC včetně jejich vnitřních pórů poután fyzikálními vazbami. Velikost částic se u jednotlivých typů pohybuje v intervalu 20–200 μm. Směs byla speciálně vyvinuta ke zlepšení lisovacích charakteristik čisté MCC, zejména po vlhké granulaci. Pro vznik výlisků je třeba nižších lisovacích tlaků⁷.

Avicel[®] RC 581, RC 591 a CL 611 jsou směsi mikrokrystalické celulózy a sodné soli karmelosy (NaCMC). NaCMC je sodná sůl částečně *o*-karboxymethylované celulózy, s vodou tvoří koloidní roztoky. Mikrokrystaly

MCC jsou vzájemně spojeny řetězci rozpustné NaCMC a vytvářejí prášek se strukturou sítě; obsah vlhkosti je do 6 %. Díky přítomnosti sodné soli karmelosy zpomalují tyto typy Avicelu rychlost uvolňování léčiva tvorbou hydrofilní gelové vrstvy. Jsou dispergovatelné ve vodě a v koncentracích vyšších než 1,2 % dávají vznik tixotropnímu gelu. Používají se v peletizačních technikách jako látky podporující sferonizaci^{7,11}, při výrobě suspenzí, suchých suspenzí, emulzí a krémů¹³. Množství sodné soli karmelosy v jednotlivých typech se pohybuje mezi 8,3–18,8 %. Částice Avicelu RC 581 jsou z 50 a více % menší než 75 µm a obsahují 11 % NaCMC. Stejný obsah NaCMC má i Avicel RC 591, s částicemi pod 45 µm u 45 a více %, Avicel CL 611 má obsah NaCMC nejvyšší – 15 %, s částicemi stejné velikosti jako Avicel RC 591 (cit.¹¹).

Vzhledem k tomu, že některé práce naznačují rozdíly u jednotlivých typů celulosy při přípravě tablet a pelet^{14–16}, předmětem této experimentální práce bylo porovnat využití jednotlivých typů MCC s NaCMC (Avicel[®] RC 581, RC 591 a CL 611) a čistých MCC (Avicel[®] PH 101 a Ceolus[®] KG 801) v peletizačním procesu extruze/ sferonizace a sledovat vlastnosti vyrobených pelet.

Experimentální část

Zkoušenými vzorky MCC byly Avicel PH 101, RC 581, RC 591, CL 611, Ceolus KG 801 (FMC, B).

Tabulka I

Složení vzorků I a množství vlhčiva

Vzorek	Theofylin [%]	Mikro-rystalická celuloza [%]	Množství vlhčící vody* [%]
PH 101/25/I	75	25	37,0
PH 101/50/I	50	50	44,0
PH 101/75/I	25	75	51,5
Ceolus/25/I	75	25	38,5
Ceolus/50/I	50	50	45,0
Ceolus/75/I	25	75	50,0
RC 581/25/I	75	25	38,0
RC 581/50/I	50	50	51,0
RC 581/75/I	25	75	57,0
RC 591/25/I	75	25	33,5
RC 591/50/I	50	50	52,0
RC 591/75/I	25	75	60,0
CL 611/25/I	75	25	31,5
CL 611/50/I	50	50	44,0
CL 611/75/I	25	75	52,0

* Množství vody ve zvlhčené směsi

Tabulka II

Složení vzorků II a množství vlhčiva

Vzorek	Složení [%]			
	theofylin	laktosa	MCC	množství vlhčící vody*
PH 101/25/II	25	50	25	31,0
PH 101/50/II	25	25	50	32,3
PH 101/75/II	25	–	75	51,5
Ceolus/25/II	25	50	25	32,4
Ceolus/50/II	25	25	50	41,6
Ceolus/75/II	25	–	75	50,0
RC 581/25/II	25	50	25	31,0
RC 581/50/II	25	25	50	47
RC 581/75/II	25	–	75	57,0
RC 591/25/II	25	50	25	30,0
RC 591/50/II	25	25	50	39,0
RC 591/75/II	25	–	75	60,0
CL 611/25/II	25	50	25	–
CL 611/50/II	25	25	50	38,7
CL 611/75/II	25	–	75	52,0

* Množství vody ve zvlhčené směsi

K přípravě pelet se použily buď jako binární směsi s theofylinem (Lehman & Voss, D) ve funkci modelového léčiva, nebo ve vzorcích obsahujících navíc monohydrát laktosy (Granulac 200, Meggle, D) ve funkci rozpustného plniva. Vlhčivem byla destilovaná voda lékopisné kvality (ČL 2005).

Prášková směs léčivé a pomocné látky (pomocných látek) se zhomogenizovala ve vysokoobrátkovém mixeru (Tefal Kaleo, F) a ve stejném zařízení se postupně vlhčila rychlostí 25 ml min⁻¹ po dobu 5 min. Vzorky pelet se ze zvlhčené hmoty vyrobily v jednošnekovém extruderu a sferonizeru Pharmex 35T (Wyss & Probst Eng., CH). Rychlost šneku extruderu byla 110 ot min⁻¹, extruzní přepážka byla umístěna axiálně a průměr jejich otvorů byl 1,0 mm. Přeměna 200,0 g extrudátu ve sférické částice probíhala ve sferonizeru rychlostí 640 ot min⁻¹ po dobu 15 min. Vlhké pelety se sušily 3 h v horkovzdušné sušárně Horo (Dr. Ing. Hofman, D) při teplotě 60 °C.

U peletových vzorků (složení uvádí tabulky I a II) se hodnotila velikost částic, její distribuce a k dalšímu hodnocení se použila většinová frakce pelet o průměru částic 0,80–1,25 mm. Z jakostních parametrů se sledovaly tvar (kulatost), hustota pelet, jejich pórovitost, pevnost, oděr, sypaný úhel, obsah léčivé látky a její uvolňování z lékové

formy disolučním testem.

Velikost pelet se hodnotila síťovou analýzou (přístroj pro síťovou analýzu, Retsch GmbH & Co. KG, D) se sítě o velikosti ok 0,25; 0,50; 0,80; 1,00; 1,25; 2,00 mm. Distribuci velikosti částic udávají tabulky III a IV. Z naměřených hodnot se vypočítal střední průměr podle vztahu:

$$d = \frac{\sum X_i d_i}{100} \quad (1)$$

kde X_i udává % hmotnosti částic v jednotlivých velikostních třídách a d_i je průměr podílu i (cit.¹⁷).

Kulatost pelet S , jako parametr tvaru částic, se vypočítala z povrchu A a obvodu p stanoveného obrazovou analýzou 500 pelet (Leco IA 32, Leco Instruments, USA) podle vzorce¹⁸:

$$S = 4\pi A / p^2 \quad (2)$$

Pyknometrická hustota pelet se měřila heliovým pyknometrem (Pycnomatic – ATC, Porotec GmbH., D)². Objem vzorku o známé hmotnosti se stanovil po naplnění nádoby pyknometru plynem pod tlakem podle vzorce:

$$V_s = V_c - \frac{V_r}{\frac{P_i - P_r}{P_f - P_r} - 1} \quad (3)$$

kde V_s je objem vzorku, V_c je objem nádoby, V_r srovnávací objem, P_i je počáteční tlak, P_r je srovnávací tlak a P_f je konečný tlak. Hustota pelet ρ je dána rovnicí:

$$\rho = m / V_s \quad (4)$$

Výsledky jsou průměrem tří stanovení.

Vnitřní pórovitost pelet se vypočítala z hustoty pelet a pravé hustoty práškových směsí podle vzorce¹⁹:

$$\varepsilon = \frac{\rho_t - \rho_p}{\rho_t} = 1 - \frac{\rho_p}{\rho_t} \quad (5)$$

kde ε je pórovitost, ρ_t je pravá hustota práškové směsi a ρ_p je hustota pelet. Pórovitost je vyjádřena v procentech.

Pevnost pelet se měřila v čelistovém přístroji (C5 Pellet Hardness and Compression Tester, Engineering System, Nottingham, GB). Pevnost pelet udává hodnota destrukční síly, která jednotlivé pelety rozdrtila. Hodnotilo se 10 pelet, průměrnou pevnost udávají tabulky V a VI (cit.⁹).

Mechanická odolnost pelet v oděru se stanovila v přístroji ERWEKA (ERWEKA GmbH, TAR 10, D) s upraveným bubínkem z nerezové oceli z důvodu vyloučení ovlivnění výsledků zkoušky statickou elektřinou. Hodnotilo se 10 g pelet zbavených prachových částic spolu s 25 skleněnými kuličkami, o průměru 4 mm, po dobu 10 min. Za oděr se považovaly částice menší než 250 μm^2 .

Sypný úhel reprezentuje tokové vlastnosti částic. 50,0 g pelet se umístilo do skleněné nálevky a provedla se zkouška na sypnost (ČL 2005). Z výšky vzniklého kužele h a průměru jeho základny d se vypočítal sypný úhel α podle vzorce:

$$\alpha = \arctg (2h / d) \quad (6)$$

Ke stanovení obsahu theofylinu se použily rozdrčené

Tabulka III
Distribuce velikosti pelet I

Vzorek	Velikost částic [mm]					
	< 0,25 [%]	0,25–0,50 [%]	0,5–0,80 [%]	0,80–1,00 [%]	1,00–1,25 [%]	> 1,25 [%]
PH 101/25/I	0,00	1,25	6,53	61,37	22,82	8,13
PH 101/50/I	0,00	0,38	15,44	79,95	3,81	0,42
PH101/75/I	0,00	0,00	18,20	76,27	5,31	0,22
Ceolus/25/I	0,00	0,51	11,67	70,59	14,13	2,10
Ceolus/50/I	0,00	0,18	13,01	67,44	14,39	4,98
Ceolus/75/I	0,00	0,79	10,72	78,41	7,69	2,39
RC 581/25/I	0,00	5,62	16,38	29,57	40,51	7,92
RC 581/50/I	0,00	0,71	11,62	42,09	37,33	8,25
RC 581/75/I	0,00	0,73	21,89	46,96	25,06	5,35
RC 591/25/I	0,00	4,02	12,36	26,97	43,61	13,04
RC 591/50/I	0,00	0,22	17,34	40,90	35,97	5,57
RC 591/75/I	0,00	0,81	22,58	43,82	26,88	5,91
CL 611/25/I	0,00	0,88	4,95	20,05	56,79	17,33
CL 611/50/I	0,00	0,18	3,16	32,28	41,58	22,81
CL 611/75/I	0,00	0,90	4,91	20,09	56,81	17,29

Tabulka IV
Distribuce velikosti pelet II

Vzorek	Velikost částic [mm]					
	< 0,25 [%]	0,25–0,50 [%]	0,5–0,80 [%]	0,80–1,00 [%]	1,00–1,25 [%]	> 1,25 [%]
PH 101/25/II	0,00	0,13	8,55	65,80	21,45	4,07
PH 101/50/II	0,00	0,15	8,58	57,27	25,57	8,43
PH101/75/II	0,00	0,00	14,20	66,27	16,31	3,22
Ceolus/25/II	0,00	1,21	8,57	71,39	17,32	1,51
Ceolus/50/II	0,00	0,74	14,36	66,22	17,50	1,18
Ceolus/75/II	0,00	0,79	11,72	68,41	16,69	2,39
RC 581/25/II	2,31	10,68	15,87	25,69	36,08	9,38
RC 581/50/II	0,00	0,58	6,21	42,52	37,48	13,20
RC 581/75/II	0,00	0,73	21,89	46,96	25,06	5,35
RC 591/25/II	1,85	6,84	9,69	25,07	42,17	14,39
RC 591/50/II	0,33	0,66	11,39	54,46	30,69	2,48
RC 591/75/II	0,00	0,81	22,58	43,82	26,88	5,91
CL 611/50/II	0,00	0,18	9,84	19,13	52,46	18,39
CL 611/75/II	0,00	0,90	4,91	20,09	56,81	17,29

Tabulka V
Vlastnosti pelet I

Vzorek	Střední průměr [mm]	Hustota [g cm ⁻³]	Pevnost [N]	Oděr [%]	Sypný úhel [°]	Kulatost	Pórovitost [%]
PH 101/25/I	0,98	1,464 ± 0,001	9,1 ± 1,3	0,03 ± 0,01	23°27' ± 0,62	0,861 ± 0,022	5,94
PH 101/50/I	0,94	1,427 ± 0,000	13,9 ± 1,5	0,06 ± 0,01	21°28' ± 0,37	0,874 ± 0,021	5,69
PH 101/75/I	0,91	1,411 ± 0,001	18,4 ± 1,6	0,04 ± 0,01	21°23' ± 0,53	0,889 ± 0,021	4,73
Ceolus/25/I	0,91	1,468 ± 0,001	9,7 ± 0,7	0,10 ± 0,02	22°06' ± 0,33	0,861 ± 0,022	5,88
Ceolus/50/I	0,94	1,424 ± 0,001	14,7 ± 1,0	0,05 ± 0,01	21°74' ± 0,43	0,873 ± 0,021	5,54
Ceolus /75/I	0,91	1,408 ± 0,000	18,6 ± 1,6	0,04 ± 0,01	21°57' ± 0,65	0,890 ± 0,021	4,79
RC 581/25/I	0,96	1,467 ± 0,001	10,2 ± 2,0	0,14 ± 0,02	26°20' ± 0,31	0,852 ± 0,024	5,64
RC 581/50/I	1,01	1,431 ± 0,000	16,0 ± 1,3	0,16 ± 0,02	24°36' ± 0,49	0,860 ± 0,023	5,27
RC 581/75/I	0,94	1,412 ± 0,000	19,7 ± 1,1	0,13 ± 0,01	22°59' ± 0,74	0,871 ± 0,022	4,21
RC 591/25/I	1,00	1,471 ± 0,000	10,8 ± 2,0	0,17 ± 0,02	27°03' ± 0,45	0,852 ± 0,020	5,54
RC 591/50/I	0,98	1,434 ± 0,001	15,2 ± 1,6	0,14 ± 0,04	24°25' ± 0,43	0,860 ± 0,022	5,16
RC 591/75/I	0,94	1,414 ± 0,001	20,1 ± 1,9	0,10 ± 0,01	23°30' ± 0,85	0,871 ± 0,022	3,97
CL 611/25/I	1,14	1,468 ± 0,001	11,0 ± 1,0	0,07 ± 0,04	26°30' ± 0,59	0,851 ± 0,023	5,04
CL 611/50/I	1,14	1,438 ± 0,001	16,8 ± 1,2	0,02 ± 0,03	23°34' ± 0,48	0,858 ± 0,021	4,95
CL 611/75/I	0,99	1,424 ± 0,001	20,6 ± 1,4	0,03 ± 0,01	22°31' ± 0,67	0,870 ± 0,024	4,17

pelety, vzorek se rozpustil ve vodě a po filtraci se hodnotil spektrofotometricky (spektrofotometr – UV/VIS, Perkin Elmer Instruments, USA) při vlnové délce 273 nm.

Zkouškou disoluce se stanoví množství uvolněné léčivé látky z pelet v předepsané kapalině v předepsaném čase. Disoluce se prováděla míchadlovou metodou (ČL 2005) v

přístroji Sotax AT 7 Smart on-line (Donaulab, CH). Disolučním prostředím byla destilovaná voda v množství 900 ml, 37 °C teplá; míchadla se otáčela rychlostí 100 ot min⁻¹. Odběr disoluční tekutiny se prováděl v 15 minutových intervalech po dobu 1 h, uvolněné množství léčiva se měřilo spektrofotometricky při vlnové délce 273 nm.

Tabulka VI
Vlastnosti pelet II

Vzorek	Střední průměr [mm]	Hustota [g cm ⁻³]	Pevnost [N]	Oděr [%]	Sypný úhel [°]	Kulatost	Pórovitost [%]
PH 101/25/II	0,96	1,413 ± 0,000	10,0 ± 1,8	0,21 ± 0,02	25°21' ± 0,12	0,847 ± 0,020	6,45
PH 101/50/II	1,00	1,425 ± 0,000	12,8 ± 1,8	0,15 ± 0,03	24°09' ± 0,23	0,869 ± 0,020	6,22
PH 101/75/II	0,92	1,464 ± 0,001	18,4 ± 1,6	0,04 ± 0,01	21°23' ± 0,53	0,889 ± 0,021	4,73
Ceolus/25/II	0,94	1,412 ± 0,000	10,4 ± 1,6	0,19 ± 0,02	25°58' ± 0,77	0,843 ± 0,023	6,32
Ceolus/50/II	0,91	1,427 ± 0,006	13,8 ± 1,3	0,13 ± 0,01	23°12' ± 0,54	0,870 ± 0,021	6,06
Ceolus /75/II	0,92	1,468 ± 0,001	18,6 ± 1,6	0,04 ± 0,01	21°57' ± 0,65	0,890 ± 0,021	4,79
RC 581/25/II	0,94	1,422 ± 0,000	9,0 ± 0,7	0,17 ± 0,01	27°55' ± 0,48	0,801 ± 0,021	5,20
RC 581/50/II	0,96	1,441 ± 0,000	15,4 ± 1,1	0,14 ± 0,02	24°32' ± 0,33	0,836 ± 0,020	5,12
RC 581/75/II	0,94	1,467 ± 0,001	19,7 ± 1,1	0,13 ± 0,01	22°59' ± 0,74	0,871 ± 0,022	4,21
RC 591/25/II	1,02	1,428 ± 0,000	10,1 ± 1,1	0,16 ± 0,02	26°54' ± 0,27	0,809 ± 0,022	5,13
RC 591/50/II	0,96	1,449 ± 0,001	16,0 ± 1,3	0,14 ± 0,02	22°23' ± 0,49	0,842 ± 0,024	4,72
RC 591/75/II	0,94	1,471 ± 0,000	20,1 ± 1,9	0,10 ± 0,01	23°30' ± 0,85	0,871 ± 0,022	3,97
CL 611/50/II	1,14	1,449 ± 0,000	17,9 ± 1,2	0,09 ± 0,01	27°54' ± 0,56	0,837 ± 0,020	4,70
CL 611/75/II	0,99	1,468 ± 0,001	20,6 ± 1,4	0,03 ± 0,01	22°31' ± 0,67	0,870 ± 0,024	4,17

Výsledky a diskuse

Připravilo se 15 vzorků pelet tvořených theofylinem a MCC (vzorky I) a 14 vzorků pelet obsahujících léčivou látku, MCC a laktosu (vzorky II). Jejich složení uvádí tabulka I a II.

Požadavky práškové směsi na množství destilované vody ve funkci vlhčiva byly pro stejné poměry léčivo : MCC přibližně stejné, nejvíce se blížily u čisté MCC tj. Avicelu PH 101 a Ceolusu KG 801 (tabulka I). Se stoupajícím množstvím MCC se zvyšovalo množství vlhčiva potřebné k přípravě plastické hmoty. Je to dáno jednak menšími částicemi MCC ve srovnání s theofylinem ($d = 277,5 \mu\text{m}$)⁹ a tedy zvětšováním celkového povrchu vlhčených částic a jednak větší afinitou MCC k vodě ve srovnání s těžce rozpustným theofylinem (8,3 g v 1 L vody při 25 °C, cit.²⁰). Vzorky II jeví podobnou tendenci, množství potřebného vlhčiva bylo však v důsledku přítomnosti rozpustné laktosu nižší než u vzorků I (tabulka II).

Vyrobené peletové vzorky měly většinu částic v požadovaném velikostním rozmezí 0,80–1,25 mm: 70,1–86,1 % (tabulka III), resp. 61,7–88,7 % (tabulka IV). Z plastických hmot obsahujících MCC s NaCMC vznikaly pelety s větším zastoupením ve velikostním rozmezí 1,00–1,25 mm: až 57 % a širší distribucí velikosti částic (tabulka III). Je to odůvodnitelné právě obsahem NaCMC, která zadržuje větší množství vlhčiva, provazce extrudátu se lámou na delší válečky a sferonizací vznikají pelety větších průměrů. Tomu odpovídají i největší střední průměry pelet s Avicelom CL 611, u kterého je podíl NaCMC největší (tabulka V). Vzorky II jeví podobnou tendenci (tabulka IV a VI), šířka distribuce velikosti pelet byla vý-

razná zejména u vzorků RC 581/25/II a RC 591/25/II s 25% koncentrací MCC, u Avicelu CL 611 s nejvyšším 15% zastoupením NaCMC se vzorky nepodařilo připravit vůbec: výsledkem byly buď různě velké částice, o průměru až 3 mm, nebo se extrudát pro lepení plastické hmoty na stěny extruderu nepodařilo získat. Úzká distribuce velikosti částic je důležitá jednak z hlediska výtěžku procesu, jednak pro následující obalování pelet. Pokud mají částice stejný průměr, vytváří se na jejich povrchu vrstva obalu se stejnou tloušťkou. Má-li obal funkci řídicí uvolňování léčiva z lékové formy, pak se dá předpokládat velmi dobrá reprodukovatelnost výsledků. Pelety s širokou distribucí velikosti částic nemají na povrchu rovnoměrný obal a poskytují rozdílné disoluční profily léčiva.

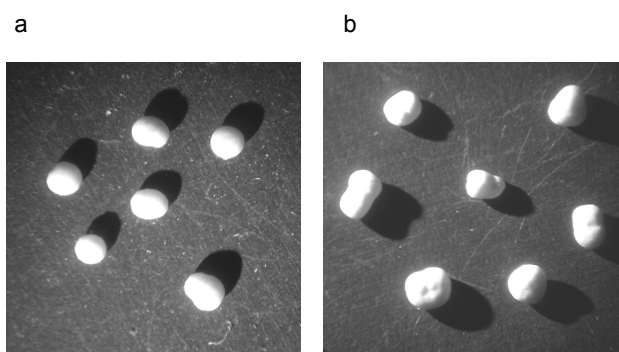
Všechny vzorky I vykazovaly pravidelný sférický tvar s faktorem kulatosti („sphericity factor“) v rozmezí 0,851–0,890 (tabulka V). Kulatost se zvyšovala se stoupajícím zastoupením MCC v peletách, což potvrzuje příznivé působení MCC při sferonizaci. Faktor kulatosti se u vzorků II pohyboval v intervalu 0,801–0,890 (tabulka VI). Nižší faktory (0,801 a 0,809) měly vzorky RC 581/25/II a RC 591/25/II s 25% zastoupením MCC. Tyto vzorky neměly pravidelný sférický tvar, jak ukazuje obr. 1b na rozdíl od vzorku Ceolus/75/I s největším dosaženým faktorem kulatosti (obr. 1a).

Pyknometrická hustota pelet vzorků I stejně zastoupených binárních směsí (tabulka V) byla velmi podobná a logicky se se stoupajícím množstvím theofylinu zvyšovala (hustota theofylinu je 1,468 g cm⁻³ a je vyšší než hustota MCC (cit.⁹)). Podobné výsledky se získaly i u vzorků II (s konstantním obsahem theofylinu 25 %), u kterých hustota rostla se zvyšujícím se obsahem MCC s vyšší hustotou

než laktosa⁹ (tabulka VI).

Pórovitost pelet se pohybovala u vzorků I od 3,97 do 5,94 %, vyšší byla u vzorků s vyšším obsahem léčiva. Nižší pórovitost měly vzorky obsahující MCC s NaCMC, zejména Avicel CL 611, což podporuje teorii pojivé schopnosti rozpustné NaCMC (tabulka V). Také u vzorků II s pórovitostí 3,97–6,45 % (tabulka VI) měly nižší pórovitost vzorky obsahující MCC s NaCMC. Vyšší hodnoty pórovitosti se zjistily u vzorků s laktosou. U obou typů vzorků se zvyšujícím se zastoupením MCC ve formulaci pórovitost pelet klesá.

Pevnost pelet 9,1–20,6 N resp. 9,0–20,6 N (tabulky V a VI) byla nevýznamně vyšší u vzorků MCC s NaCMC a zvyšovala se se stoupající koncentrací MCC ve vzorku.



Obr. 1. Tvar peletových vzorků (40tínásobné zvětšení); a) pelety vzorek Ceolus/75/I; b) pelety vzorek RC 581/25/II

Výsledky lze opět vysvětlit výbornou schopností MCC zhušťovat se a pojivou schopností NaCMC ve zvlhčené hmotě. Nejvyšší pevnost vykazovaly vzorky s Avicel CL-611. Hodnoty oděrů byly velmi nízké, pohybovaly se od 0,02 do 0,17 %, resp. od 0,03 do 0,21 % (tabulky V a VI).

Sypný úhel všech vzorků I se pohyboval pod 28 ° a je známkou dobrých tokových vlastností částic, jejich hladkého povrchu a většinou také pravidelného sférického tvaru. Se zvyšujícím se podílem jednotlivých typů MCC ve vzorku se hodnoty sypného úhlu snižovaly, to potvrzuje jejich funkci pomocné látky podporující sferonizaci. Nevýrazně menší sypné úhly vykazovaly vzorky s čistou MCC (tabulky V a VI).

Obsah theofylinu v peletách vyhovoval lékopisným požadavkům, byl nižší než deklarovaný teoretický obsah o 0,33–2,89 % (tabulka VII), resp. o 0,33–0,89 % (tabulka VIII).

Uvolňování léčivé látky z pelet bylo rychlé, u všech vzorků se stejným poměrem theofylin : MCC, resp. theofylin : MCC : laktosa, srovnatelné. Během 30 min se uvolnilo 84,12 a více % obsaženého theofylinu ze vzorků I (tabulka VII). Se vzrůstajícím zastoupením theofylinu v peletách je patrná tendence ke zpomalení uvolňování léčiva v důsledku jeho špatné rozpustnosti ve vodě, výsledky jsou viditelné po 15 min disoluce (tabulka VII). Uvolňování léčiva ze vzorků II bylo ještě rychlejší: 89,46 % a více po 15 min a se zvyšujícím se obsahem laktosy v peletách se zrychlovalo (tabulka VIII). Vzhledem k velkému povrchu pelet a jejich malému průměru se neprokázal vliv Avicelů obsahujících NaCMC na disoluci léčivé látky tak, jak se popisuje u tablet¹¹.

Tabulka VII

Množství uvolněného léčiva z pelet I v závislosti na čase

Vzorek	Obsah léčiva [%]	Množství uvolněného léčiva [%] za čas [min]			
		15	30	45	60
PH 101/25/I	72,11 ± 0,20	65,50 ± 0,18	94,58 ± 0,11	97,49 ± 0,11	97,66 ± 0,14
PH 101/50/I	49,01 ± 0,23	71,88 ± 0,13	94,09 ± 0,11	97,60 ± 0,10	97,91 ± 0,13
PH101/75/I	24,40 ± 0,17	92,16 ± 0,14	98,21 ± 0,10	98,78 ± 0,18	98,99 ± 0,11
Ceolus/25/I	72,29 ± 0,24	60,26 ± 0,15	84,12 ± 0,12	96,40 ± 0,11	97,27 ± 0,10
Ceolus/50/I	48,16 ± 0,26	67,47 ± 0,15	94,60 ± 0,14	97,82 ± 0,12	97,86 ± 0,11
Ceolus/75/I	24,52 ± 0,25	91,93 ± 0,16	97,87 ± 0,14	99,02 ± 0,14	99,14 ± 0,12
RC 581/25/I	72,42 ± 0,18	72,37 ± 0,16	95,43 ± 0,14	97,12 ± 0,11	97,38 ± 0,13
RC 581/50/I	48,54 ± 0,16	73,42 ± 0,12	97,49 ± 0,11	97,93 ± 0,13	98,01 ± 0,18
RC 581/75/I	24,67 ± 0,23	90,57 ± 0,11	99,35 ± 0,12	99,41 ± 0,10	99,32 ± 0,11
RC 591/25/I	72,78 ± 0,25	74,94 ± 0,12	93,76 ± 0,11	96,72 ± 0,14	97,00 ± 0,16
RC 591/50/I	48,52 ± 0,21	71,52 ± 0,13	96,86 ± 0,09	97,38 ± 0,17	97,44 ± 0,16
RC 591/75/I	24,33 ± 0,19	90,60 ± 0,15	98,88 ± 0,14	99,24 ± 0,11	99,32 ± 0,11
CL 611/25/I	72,89 ± 0,21	70,69 ± 0,17	97,00 ± 0,12	97,24 ± 0,16	97,41 ± 0,15
CL 611/50/I	48,71 ± 0,17	69,50 ± 0,13	96,52 ± 0,15	97,34 ± 0,14	97,36 ± 0,10
CL 611/75/I	24,38 ± 0,26	89,46 ± 0,12	96,20 ± 0,13	97,56 ± 0,11	97,64 ± 0,18

Tabulka VIII
Množství uvolněného léčiva z pelet II v závislosti na čase

Vzorek	Obsah léčiva [%]	Množství uvolněného léčiva [%] za čas [min]			
		15	30	45	60
PH 101/25/II	24,11 ± 0,20	96,15 ± 0,18	97,38 ± 0,11	97,49 ± 0,11	97,66 ± 0,14
PH 101/50/II	24,32 ± 0,23	94,05 ± 0,12	97,41 ± 0,08	97,56 ± 0,14	97,63 ± 0,10
PH101/75/II	24,40 ± 0,17	92,16 ± 0,14	98,21 ± 0,10	98,78 ± 0,18	98,99 ± 0,11
Ceolus/25/II	24,52 ± 0,25	96,03 ± 0,17	97,26 ± 0,13	97,39 ± 0,12	97,45 ± 0,14
Ceolus/50/II	24,40 ± 0,12	93,81 ± 0,13	97,54 ± 0,14	97,68 ± 0,12	97,71 ± 0,12
Ceolus/75/II	24,52 ± 0,25	91,93 ± 0,16	97,87 ± 0,14	99,02 ± 0,14	99,14 ± 0,12
RC 581/25/II	24,67 ± 0,23	96,86 ± 0,12	97,43 ± 0,07	97,83 ± 0,14	97,85 ± 0,11
RC 581/50/II	24,25 ± 0,16	95,41 ± 0,10	97,19 ± 0,16	97,54 ± 0,12	97,61 ± 0,12
RC 581/75/II	24,67 ± 0,23	90,57 ± 0,11	99,35 ± 0,12	99,41 ± 0,10	99,32 ± 0,11
RC 591/25/II	24,44 ± 0,22	96,94 ± 0,12	97,76 ± 0,11	97,82 ± 0,14	97,85 ± 0,16
RC 591/50/II	24,56 ± 0,18	95,29 ± 0,09	97,61 ± 0,06	97,93 ± 0,11	97,95 ± 0,10
RC 591/75/II	24,33 ± 0,19	90,60 ± 0,15	98,88 ± 0,14	99,24 ± 0,11	99,32 ± 0,11
CL 611/50/II	24,47 ± 0,25	96,22 ± 0,11	97,91 ± 0,08	97,99 ± 0,14	98,03 ± 0,12
CL 611/75/II	24,38 ± 0,26	89,46 ± 0,12	96,20 ± 0,13	97,56 ± 0,11	97,64 ± 0,18

Získané výsledky naznačují, že obsah ve vodě rozpustné složky NaCMC u Avicelu RC 581, RC 591 a CL 611 vede k širší distribuci velikosti pelet a k částicím větších rozměrů. Uvedený předpoklad potvrdily výsledky získané u vzorků obsahujících další ve vodě rozpustnou složku laktosu. Také v tomto případě byla distribuce velikosti pelet obsahujících Avicel RC 581, RC 591 a CL 611 širší, navíc zde hrála významnou úlohu použitá koncentrace MCC. Vzorky RC 581/25/II a RC 591/25/II s nejnižším 25% zastoupením MCC neměly pravidelný sférický tvar a pelety vhodné velikosti u formulace CL 611/25/II s Avicel CL-611 s nejvyšším podílem NaCMC nebylo možné připravit vůbec.

LITERATURA

- Komárek P., Rabišková M.: *Technologie léků*. Galén, Praha 2006.
- ČL 2005, Grada Praha, 2005.
- Vetchý D., Ceral J.: *Neurologie pro praxi 4*, 218 (2005).
- Sedláková M., Rabišková M., Spilková J.: *Čes. Slov. Farm.* 55, 4 (2006).
- Masteiková, R., Chalupová, Z., Savickas, A.: *Čes. Slov. Farm.* 53, 211 (2004).
- Masteiková, R., Chalupová, Z., Šklubalová, Z.: *Medicina* 39, 19 (2003).
- Rowe R. C., Sheskey P. J., Weller P. J.: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. The Pharmaceutical Press, London 2003.
- Fechner P. M., Wartewig S., Futing M.: *AAPS Pharm. Sci.* 5, 4 (2003).
- Krejčová K., Rabišková M., Vetchý D.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32, 585 (2006).
- Vetchý D., Rabišková M.: *Int. J. Pharm.* 242, 353 (2002).
- Lehman and Voss, *firemní literatura 2002 (Německo)*.
- <http://www.ceolus.com>, staženo 4. listopadu 2006.
- Schüselle A., Bauer-Brandl A.: *Int. J. Pharm.* 257, 301 (2003).
- Ghali E., Klinger G., Schwartz J.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15, 1455 (1989).
- Herman J., Remon J. P., Lefebvre R.: *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 157 (1988).
- El Saleh F., Jumaa M., Hassan I.: *STP Pharma Sciences* 10, 379 (2000).
- Hazos L., Langer I., Gyamathy M.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18, 409 (1992).
- Sienkiewicz G., Pereira R., Rudnic E. M.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23, 173 (1997).
- El Saleh F., Kleinebudde P.: *Pharm. Tech. Europe* 10, 18 (1998).
- Kim H., Fassih R.: *J. Pharm. Sci.* 86, 323 (1997).

S y m b o l y

ČL 2005	platný Český lékopis
MCC	mikrokrystalická celuloza
NaCMC	sodná sůl karmelosy
RC	Avicel [®] RC
CL	Avicel [®] CL
PH	Avicel [®] PH
KG	Ceolus [®] KG

M. Rabišková, A. Häring, K. Minczingerová, M. Havlásek, and P. Musilová (*Department of Drug Technology, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Microcrystalline Cellulose In Oral Dosage Forms**

Cellulose and its derivatives are important pharmaceutical excipients. Microcrystalline cellulose (MCC) is used mainly in the formulation of oral dosage forms, in particular tablets. Lubricant, adsorption, antiadhesive, spheronization-enhancing and compression properties of MCC are very useful also in pelletization techniques. Vari-

ous types of MCC such as Avicel PH 101, Ceolus KG 801, Avicel RC 581, RC 591 and CL 611 were studied in the preparation of pellets by the extrusion spheronization method. Process conditions were evaluated and properties of pellets, such as size, its distribution, shape, density, porosity, hardness, friability, repose angle, drug content and dissolution profiles were determined. Experimental results confirmed excellent properties of all MCC types studied in binary mixtures with theophylline as a model drug, slightly soluble in water. They however also indicate careful use of MCC containing Carmellose sodium together with other soluble substance in the pellet formulation.

OPRAVA

V Chemických listech č. 10/2006 bylo v článku „Použití kvantitativní atmogeochemie při monitorování starých ekologických zátěží“, autorů Janků a spol., chybně uvedeno číslo grantu.

Správné znění poděkování je: „Projekt byl vypracován za podpory grantu GA ČR 104/06/1079“.

za autory J. Janků

Rektor Vysoké školy chemicko-technologické v Praze

vyhlašuje

ve smyslu § 49 odst. 5 a § 98 odst. 1c) Zákona 111/1998 Sb, přijímací řízení pro akademický rok 2007/2008 do následujících oborů doktorských studijních programů uskutečňovaných na fakultách VŠCHT Praha:

Fakulta chemické technologie

- Studijní program:* *Chemie*
Studijní obory: Anorganická chemie
Organická chemie
Makromolekulární chemie
- Studijní program:* *Chemie a chemické technologie*
Studijní obory: Anorganická technologie
Organická technologie
- Studijní program:* *Chemie a technologie materiálů*
Studijní obor: Technologie makromolekulárních látek
Metalurgie
Chemie a technologie anorganických materiálů
Materiálové inženýrství

Fakulta technologie ochrany prostředí

- Studijní program:* *Chemie a technologie ochrany životního prostředí*
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
- Studijní program:* *Chemie a technologie paliv a prostředí*
Studijní obor: Energetika v chemicko-technologických procesech
Chemické a energetické zpracování paliv

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

- | | |
|--|---|
| <i>Studijní program:</i> <i>Chemie</i>
Studijní obor: Organická chemie
Biochemie | <i>Studijní program:</i> <i>Biochemie a biotechnologie</i>
Studijní obor: Biotechnologie |
| <i>Studijní program:</i> <i>Mikrobiologie</i>
Studijní obor: Mikrobiologie | <i>Studijní program:</i> <i>Chemie a technologie potravin</i>
Studijní obor: Chemie a analýza potravin
Technologie potravin |

Fakulta chemicko-inženýrská

- | | |
|--|--|
| <i>Studijní program:</i> <i>Chemie</i>
Studijní obor: Analytická chemie
Fyzikální chemie | <i>Studijní program:</i> <i>Chemické a procesní inženýrství</i>
Studijní obor: Chemické inženýrství
Měřicí technika
Technická kybernetika
Řízení a ekonomika podniku |
| <i>Studijní program:</i> <i>Aplikovaná matematika</i>
Studijní obor: Aplikovaná matematika | |

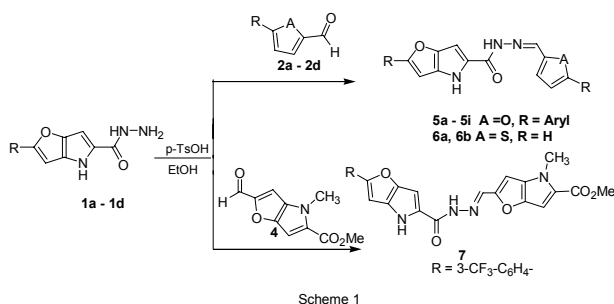
Všechny doktorské studijní programy jsou uskutečňovány formou prezenční nebo kombinací prezenční a distanční formy. Standardní doba studia v DSP v prezenční formě je tři roky a student může studovat v této formě studia nejdéle čtyři roky. Žádosti na **předepsaném formuláři** doložené životopisem, doklady o dosaženém vzdělání a dosavadní praxi, soupisem publikovaných prací a ostatních výsledků odborné činnosti, podávejte nejpozději do **30. března 2007** na děkanáty příslušných fakult, Technická 5, 166 28 Praha 6.

LIBLICE 2006 – DODATKY

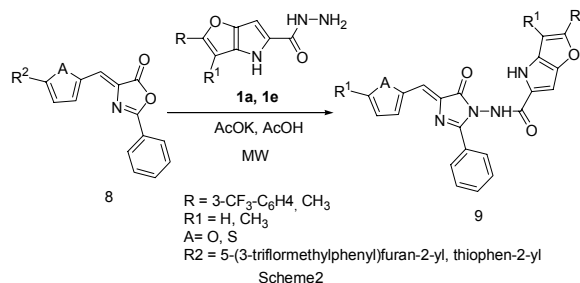
MICROWAVE-ASSISTED REACTIONS OF SUBSTITUTED FURO[3,2-*b*]PYRROLE-5-CARBOXYHYDRAZIDES AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITYRENATA GAŠPAROVÁ^a, MARTIN MONCMAN^a, DANIEL ZBOJEK^a, KATARÍNA KRÁĽOVÁ^b, and ALŽBETA KRUTOŠÍKOVÁ^a

^a Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, University of St. Cyril and Methodius, Námestie Jozefa Herdu 2, SK-917 01 Trnava, Slovakia; ^b Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina CH-2, SK-842 15 Bratislava, Slovakia
gasparor@ucm.sk, kralova@fns.uniba.sk

The microwave-assisted reactions of substituted furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxhydrazides **1** with 5-arylfuran-2-carboxaldehydes **2**, thiophene-2-carboxaldehyde **3** and methyl 2-formyl-4-methylfuro[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylate **4** has been studied (Scheme 1).



Reactions of **1** with 4-substituted 1,3-oxazol-5(4*H*)-ones **8** led to imidazole derivatives **9** (Scheme 2). The effects of hydrazones **5-7** on inhibition of photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts and chlorophyll content in the anti-algal suspensions of *Chlorella vulgaris* were investigated³.



The authors are grateful to the VEGA Grant Agency of Slovak Ministry of Education for financial support by way of project: No. 1/3584/06

REFERENCES

- Krutošiková A., Ramsden C.A., Dandárová M., Lyčka A.: *Molecules* 2, 69 (1997).
- Krutošiková A., Dandárová M., Bobošik V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 59, 473 (1994).
- Gašparová R., Zbojek D., Lácová M., Král'ová K., Gatjal A., Horváth B., Krutošiková A.: *Cent. Eur. J. Chem.* 3, 622 (2005).

ISOFLAVONOIDY V ČELEDI *Cannabaceae*RADKA KOBLOVSKÁ^a, LADISLAV KOKOŠKA^b, BOŘIHOJ KLEJDUS^c a OLDŘICH LAPČÍK^a

^a Ústav chemie přírodních látek, FPBT VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav tropického a subtropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6, ^c Ústav chemie a biochemie, Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno
oldrich.lapcik@vscht.cz

Isoflavonoidy jsou biologicky aktivní sekundární metabolity produkované v omezeném počtu rostlinných taxonů. Fylogenetické vztahy mezi producenty isoflavonoidů jsou dosud nejasné. Isoflavonoidy jsou rozšířeny zejména v čeledi Fabaceae (okolo 1000 známých struktur), mezi další klasické producenty patří čeledi Iridaceae a Moraceae.

V této studii jsme zjišťovali výskyt nejjednodušších isoflavonoidů ve dvou ekonomicky významných zástupcích čeledi *Cannabaceae* – chmelu otáčivém (*Humulus lupulus*) a konopí setém (*Cannabis sativa*). Spektrum stanovených látek zahrnovalo jak volné isoflavony (daidzein, genistein, formononetin, isoformononetin, biochanin A, prunetin) tak glykosidy (daidzin, genistin, ononin, sissotrin). Vzorčky chmelu odrůd Orion a Magnum a konopí Manitoba poison a Duke foot byly po odběru lyofilizovány, umlety na tříštinovém mlynku a extrahovány 70% methanolem. Extrakty byly analyzovány technikami HPLC-MS-SIM a HPLC-ELISA. Oba metodické přístupy potvrdily výskyt jak volných isoflavonů tak glykosidů v rozsahu jednotek až stovek mikrogramů na kg suché váhy.

Isoflavonoidy byly již dříve nalezeny v pivu^{1,2}, ale jejich původ v této komoditě byl nejasný. Mazur³ detegoval daidzein a genistein v několika vzorcích ječmene. Naše data ukazují, že část isoflavonoidů v pivu může pocházet z chmelu. Nado to se jedná o první popis výskytu isoflavonoidů v čeledi *Cannabaceae*.

Studie vznikla s podporou grantů GAČR 525/06/0864 a MSM6046137305.

LITERATURA

- Lapcik O., Hill M., Hampl R., Wähälä K., Adlercreutz H.: *Steroids* 63, 14 (1998).

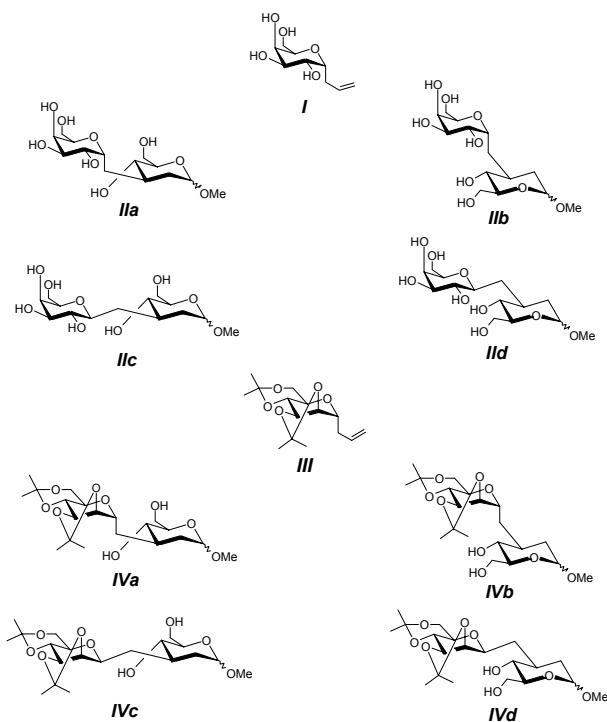
- Clarke D. B., Barnes K. A., Lloyd A. S.: *Food Add. Contam.* 21, 949 (2004).
- Mazur W., Adlercreutz H.: *Pure&Appl. Chem.* 70, 1759 (1998).

SYNTÉZA (1→3)-C-DISACHARIDŮ

KAMIL PARKAN, ONDŘEJ VICH a LADISLAV KNIEŽO

*Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
parkank@vscht.cz*

Během několika posledních let je věnováno veliké úsilí k nalezení nových syntetických cest směřujících k C-disacharidům, jež jsou analoga přírodních disacharidů¹. V naší laboratoři byl nedávno vypracovaný nový způsob stereoselektivní syntézy (1→3)-C-disacharidů², založený na enantioselektivní hetero-Dielsově-Alderově reakci. Efektivitu tohoto postupu demonstrujeme v této práci, kde z jediné, snadno dostupné výchozí látky, tj. galaktopyranosylpropenu **I** lze stereoselektivně a v dobrých výtěžcích připravit čtyři diastereoisomerní (1→3)-C-disacharidy **II a-d**. Zatím předběžné výsledky potvrzují, že stejným přístupem lze z chráněného manopyranosylpropenu **III** připravit podobnou čtveřici diastereoisomerů **IV a-d**. Dostupnost nových (1→3)-C-disacharidů **II a-d**, resp. **IV a-d** umožní jednak podrobně studovat jejich vlastností a jednak je využít jako prekursorů pro syntézu dalších látek s předpokládanými biologickými účinky.



Tato práce byla podporována MŠMT, v rámci výzk. záměru VZ. 6046137305.

LITERATURA

- Dondoni A., Marra A.: *Chem. Rev.* 104, 2557 (2004).
- Vich O., Kniežo L., Dvořáková H., Raich I., Valenta Š.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 70 2086, (2005).

SYNTÉZA C-ANALOGŮ PŘÍRODNÍHO 3-O-(β-D-GLUKOPYRANOSYL)-FAGOMINU

LUKÁŠ WERNER, LADISLAV KNIEŽO a ONDŘEJ VÍCH

*Ústav chemie přírodních látek, Technická 5, 166 28 Praha 6
wernerl@vscht*

Polyhydroxylované piperidiny^{1,2} patří do větší skupiny látek označovaných jako iminocukry a představují vlastně analogy pyranos. A je to právě náhrada pyranosového kyslíku za dusík co způsobuje, že jsou tyto sloučeniny schopny silně interagovat v aktivním místě glykosidas a projevují se jako jejich inhibitory. Jelikož se glykosidas účastní mnoha biologicky důležitých procesů, jako jsou např. trávení, posttranslační modifikace glykoproteinů nebo katabolismus glykokonjugátů v lysosomech, mají látky, které jsou schopny ovlivňovat tyto procesy značný terapeutický potenciál.

Fagomin, který lze považovat za deoxyderivát známějších iminocukrů nojirimycinu a 1-deoxynojirimycynu, byl izolován z řady přírodních materiálů. V některých zdrojích jsou kromě fagominu 1 bsazeny i jeho stereoisomery a glukosidy.

Jeho biologická aktivita není tak široká jako u deoxynojirimycinu a nojirimycinu, ale přesto bylo prokázáno, že fagomin a 3-*epi*-fagomine vykazují inhibiční aktivitu vůči savčí střevní α-glucosidase and β-galactosidase. Dále bylo zjištěno, že má silný antihyperglycemický účinek v streptozocinem vyvolané diabetes u myši a zesiluje sekreci insulinu.

Zatím však není úplně jasné, jestli glykosidy fagominu (i dalších iminosacharidů) slouží v přírodních materiálech jenom jako zásoby iminosacharidů, které se z nich *in vivo* enzymaticky uvolňují, anebo hrají i jinou roli. Např. bylo prokázáno, že inhibiční aktivita fagominu vůči glykosidasám v případě 3-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-fagominu a 4-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-fagominu zaniká. Na druhé straně inhibiční studie různě glukosylovaných 1-deoxynojirimycinů prokázaly, že např. 3-*O*-(α-D-glucopyranosyl)-1-deoxynojirimycin si vůči krysí střevní sucrase zachovává stejnou inhibiční aktivitu jako samotný 1-deoxynojirimycin a vůči α-glucosidase z rýže se jeho inhibiční aktivita dokonce mírně zvyší.

Aby bylo možné získat více informací o úloze glykosylovaných iminosacharidu v těchto procesech rozhodli jsme se syntetizovat některé jejich C-glykosidy. V těchto případech je glykosydická vazba nahrazena C-C vazbou, která není enzymaticky hydrolyzovatelná a nemůže tedy uvolňovat fagomin v podmínkách *in vivo*.

V této práci prezentujeme stereoselektivní syntézu 3-*deoxy*-3-(α -D-glucopyranosylmethyl)-D-fagominu a jeho stereoisomeru 3-*deoxy*-3-(α -D-glucopyranosylmethyl)-L-fagominu.

LITERATURA

1. Current Topics in Medicinal Chemistry 2003, 5.
2. Afarinkia K., Bahar A.: Tetrahedron: Asymmetry 16, 1239 (2005).



Sborník abstraktů

Konference
Pokroky v organické, bioorganické
a farmaceutické chemii

41. Konference

4. – 6. prosince 2006



středoškolská soutěž v experimentální chemii

O pohár Becario

Preambule

Chemie je zejména experimentální vědou. Cílem projektu je, aby si studenti tuto skutečnost uvědomili a sami navrhli atraktivní chemický experiment na zadané téma, který posluchače nejenom poučí, ale také zaujme.

Vyhlašovatelé

Becario, sdružení na podporu vzdělanosti, Národní centrum pro mladé chemiky, VŠCHT Praha.

Pro koho je soutěž určena

Soutěže se mohou zúčastnit 2 až 3-členné týmy středoškolských studentů, zejména z gymnázií, SPŠCH a SPŠ s rozšířenou výukou přírodovědných předmětů. Členové týmu musejí pocházet z jedné školy. Účast není omezena ročníkem studia.

Zadání letošního ročníku

Navrhněte a zrealizujte experiment na téma
„Chemie a světlo“

Harmonogram

Termín pro odeslání přihlášky a kompletní dokumentace **2. 4. 2007**
Odborná porota vybere pět nejlepších týmů do **9. 4. 2007**
Finále soutěže* **V týdnu od 23. do 27. 4. 2007**

*(prezentace a demonstrace pěti nejlepších experimentů před porotou, slavnostní vyhlášení vítězného týmu v Senátu ČR)

Charakteristika experimentu

Zpracování experimentu musí splňovat tato kritéria:

- **Kreativita** – Experiment musí studenti sami předvést a to pokud možno originálním způsobem demonstrace.
- **Atraktivita** – Experiment by měl být atraktivní, aby dokázal upoutat pozornost a zaujmout studenty.
- **Kompletnost řešení** – Řešení musí obsahovat teoretický a praktický popis experimentu, nákres aparatury a fotodokumentaci, časovou náročnost přípravy a realizace, seznam potřebných pomůcek a chemikálií a nároky na bezpečnost.
- **Realizovatelnost ve výuce** – Časová náročnost, stejně jako náročnost na pomůcky a chemikálie musejí umožňovat realizaci experimentu při běžné výuce na střední škole.

Odborná porota

V porotě zasednou a odbornou úroveň soutěže budou zajišťovat RNDr. Petr Holzhauser, Národní centrum pro mladé chemiky, prof. Jitka Moravcová, VŠCHT Praha, prof. Václav Pačes, předseda AV ČR a zástupce Becario.

Mediální partneři

Chemické listy, Časopis Biologie-chemie-zeměpis

V těchto časopisech budou formou článku zveřejněny projekty finalistů.

Kontakty

Informace k soutěži a přihláška www.becario.cz/poharchemie
Dotazy poharchemie@becario.cz

Ceny pro vítězné týmy: 1. místo věcné ceny a odměna 7.000 Kč pro každého člena týmu, pro školu 10.000 Kč
2. místo věcné ceny a odměna 5.000 Kč pro každého člena týmu, pro školu 7.000 Kč
3. místo věcné ceny a odměna 3.000 Kč pro každého člena týmu, pro školu 5.000 Kč

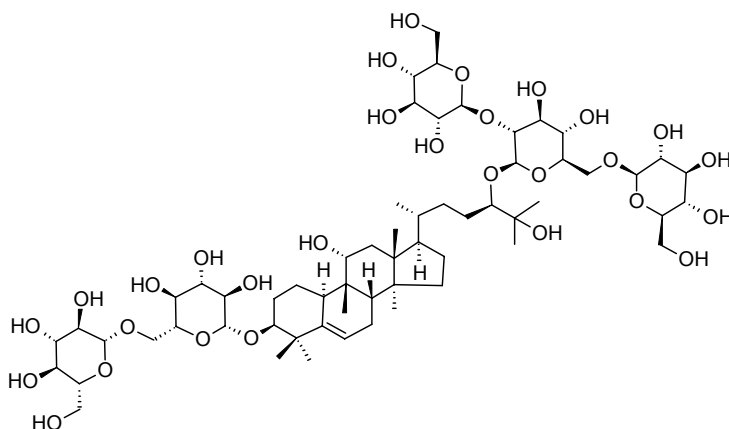


BULLETIN

ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

Ročník 38

Číslo 1



Ústřední komise
ÚKCHO
chemické olympiády

Český komitét
ČKCHI
pro chemii



ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÉHO INŽENÝRSTVÍ
CZECH SOCIETY OF CHEMICAL ENGINEERING



Obsah Chemické listy 2006, číslo 11 a 12

ČÍSLO 11/2006

ÚVODNÍK	953
REFERÁTY	
Syntéza vonných laktonů s využitím katalyzátorů hydrotalcitového typu	954
D. Francová a L. Červený	
Biologicky aktivní pyraziny přírodního a syntetického původu	959
M. Doležal	
Využití katalýzy sloučeninami železa v organické syntéze	967
D. Nečas a M. Kotora	
Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: možnosti a limitace	974
P. Češková, K. Brožková, L. Hernychová, J. Štěrba, D. Valík a B. Vojtěšek	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Kvantitativne vzťahy medzi štruktúrou a schopnosťou flavonoidov redukovať železitý komplex	980
S. Firáková, A. Jedinák, T. Maliar a E. Šturdík	
Použitie zásaditých roztokov pri lúhovaní antimonitu	987
E. Sminčáková a D. Remeteiová	
RECENZE	992
58. Sjezd chemických společností – Dodatky	994
LIBLICE 2006	999

ČÍSLO 12/2006

ÚVODNÍK	1054
REFERÁTY	
Kvarky s barvou a vůní a co dál?	1055
J. Chýla	
Cílený posun čtecího rámce – translace alternativních produktů	1068
Z. Smékalová a T. Ruml	
Vlastnosti a modifikácia poly(3-hydroxybutyrátu)	1075
G. Miková a I. Chodák	
Současné trendy v analýze eukaryotických proteomů, glykomů a lipidomů	1084
P. Man a K. Bezouška	
Frakcionačná analýza sedimentov – limitácie selektivity sekvenčného lúhovania	1096
V. Vojteková a E. Krakovská	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Voltametrické stanovení submikromolárních koncentrací 3-nitrofluoranthenu a pendimethalinu na stříbrné pevné amalgámové elektrodě	1105
L. Vaňková, L. Maixnerová, K. Čížek, J. Fischer, J. Barek, T. Navrátil a B. Yosypchuk	
Využití nespecifických peptidů pro proteomickou identifikaci nízkomolekulárních proteinů z ječmene MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií	1111
P. Řehulka, G. Allmaier a J. Chmelík	
Posouzení klinické relevance hodnoty sérové koncentrace adipocytárního proteinu vázajícího mastné kyseliny u pacientů s diagnózou metabolického syndromu novou metodou ELISA	1116
D. Stejskal, M. Karpíšek a P. Kollár	
RECENZE	1120
LIBLICE 2006 – dodatky	1122

CHEMIE JAKO ZDROJ INSPIRACE V MOLEKULOVÝCH VĚDÁCH*

RUDOLF ZAHRADNÍK

Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
rudolf.zahradnik@jh-inst.cas.cz

Klíčová slova: výpočty energie, vazba van der Waalsova, kyselina fluorná, nelinearita polyynů, barva MgO, chemie a molekulové vědy

Úvod

Čas od času vzpomínám na dobu před 15 či 20 lety, kdy byl v mnoha odborných kruzích rozšířen názor, že fyzika a biodisciplíny jsou ty oblasti vědy, o jejichž budoucnosti netřeba pochybovat. Naproti tomu chemie ztrácela v očích některých velkou důležitost, kterou měla po více než 150 let, a někteří dokonce soudili, že se stává vědou spíše pomocnou. Jiní tomu však ani na chvíli nevěřili a vznik a rozsah molekulových věd (rozpínajících se od části fyziky, přes chemii, mnohé biodisciplíny až po část lékařství) přinesl přesvědčivý doklad o tom, že nevěřili právem. Pozice chemie v molekulových vědách svědčí o tom, že bývá pro celou oblast zdrojem inspirace, ale často též hnací silou rozmachu v oblastech s chemií hraničících.

V tomto článku se pokusím naznačit, co mám na mysli. Půjde o krátký popis snad s rozmyslem vybraných pěti historek, které mají dosvědčit správnost výše uvedeného názoru. Ty historky se týkají: (1) výpočtu energie molekul, (2) role van der Waalsových vazeb v molekulových vědách, (3) důvodů, proč dlouhé řetězce kumulenu a polyynů nemusí být lineární, (4) mechanismu podivuhodných oxidací kyselinou fluornou a (5) údivu nad tím, že oxid hořečnatý (v molekulové formě) je červený.

1. Výpočty energie molekul

Všechny zásadní a základní teorie, které chemie má k dispozici (klasická, kvantová a statistická mechanika, termodynamika, teorie srážkových procesů a další), jsou dílem fyziky. Stejně je tomu se všemi rozhodujícími pokusnými metodami, které slouží k určení struktury

(rentgenostrukturní analýza, hmotnostní spektrometrie, spektroskopie v radiofrekvenční oblasti: NMR a ESR), jsou dílem fyziků. K podivuhodně rozsáhlému a fantazieplnému jejich využití došlo především zásluhou chemie, chemiků. Odtud se vrací do molekulové fyziky a nastupují úspěšnou pout' do molekulové biologie.

Výpočet energie molekul je jedna z hlavních úloh molekulové kvantové mechaniky. Je známo, že to, co v chemii potřebujeme, nejsou hodnoty energie, ale hodnoty změn energie. Konkrétně v případě procesu (1) je to změna energie, ΔE , jež provází studovaný proces.

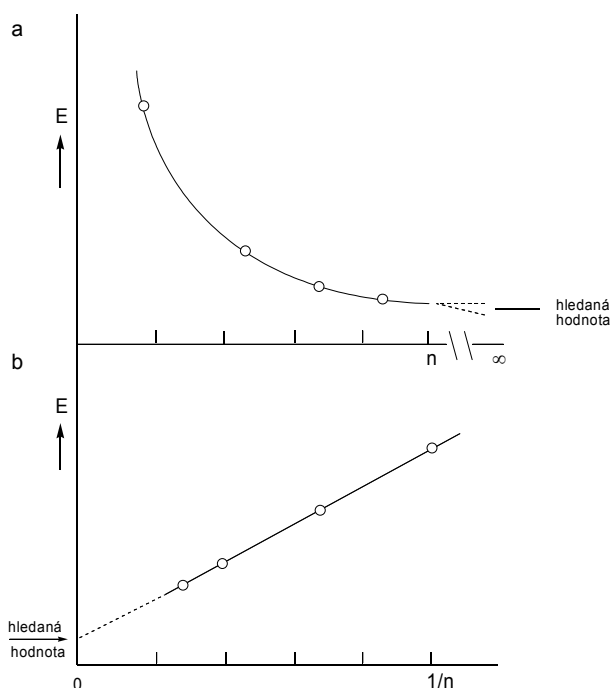


K těmto veličinám, tedy změnám energie, dospíváme pomocí energií reaktantů a produktů:

$$\Delta E = E(R-S) - E(R) - E(S) \quad (2)$$

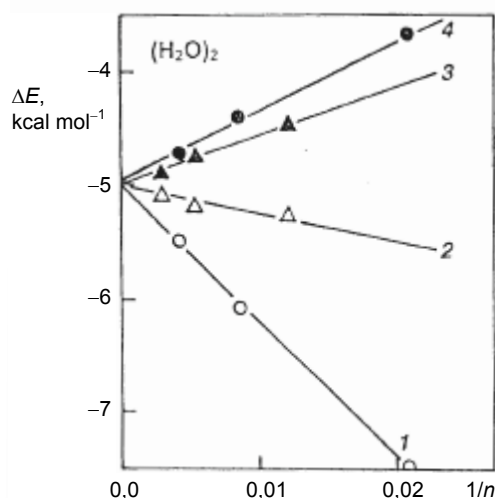
Z praktických důvodů získáváme v kvantové chemii celkové energie molekul sečtením dvou příspěvků, totiž energie, jež se označuje E^{SCF} (jež však nepopisuje dosti kvalitně vzájemné odpuzování elektronů, SCF značí *self-consistent field*), a energie označované E^{CORR} , která chybu E^{SCF} zmenšuje. Provedeme-li výpočet korelační energie, E^{CORR} , náležitě (např. metodou konfigurační interakce), je zmenšení oné chyby pronikavé. Pro daný způsob seřetězení atomů (charakterizovaných pořadovým číslem atomu a počtem elektronů) jsme schopni výpočet zkvalitňovat tím, že zvyšujeme počet orbitalů, popisujících elektrony na každém z atomů molekuly. Tato zdánlivá libovůle je opravdu jenom zdánlivá: zkvalitnění výpočtu (oběma zmíněnými metodami, tedy metodou dávající E^{SCF} a E^{CORR}) zvýšením počtu funkcí (orbitalů) na jednotlivých centrech (atomech) toliko přibližuje hodnotu vypočítané celkové energie *shora* k přesné hodnotě, o níž usilujeme; žádná chyba nám nehrozí. Naší ctižádostí je přiblížit se přesné hodnotě (na dané výpočtové úrovni) co nejvíce, a proto usilujeme o výpočet s velkým počtem funkcí na jednotlivých atomech. Ovšem něco za něco: s rostoucím počtem funkcí rychle roste rozsah výpočtu a dosažení přesné (konečné) hodnoty na dané úrovni není reálné. Je vskutku dobře, že se před několika lety objevily v literatuře soubory funkcí, jež lze rozšiřovat krok za krokem obratně definovaným způsobem: autorem těchto souborů bází je Dunning¹. Tyto báze (označované jako „correlation consistent polarized valence X-zeta basis sets“, zkratkou cc-pVXZ) jsou rozšiřovány konzistentním způsobem a X v nich značí velikost báze (informaci o velikosti bází lze získat např.

* Sestaveno z vybraných částí přednášek proslovených na TU Berlin a ve „Fritz-Haber-Institut“ Společnosti M. Plancka, Berlin v červnu 2006.



Obr. 1. a) Závislost energie E fiktivní molekuly M na velikosti báze vyjádřené celkovým počtem funkcí n . Z tvaru závislosti je zřejmá obtížnost korektního odhadu E pro $n = \infty$. b) Extrapolace lineární závislosti v souřadnicích E a $1/n$ je snadná, protože extrapolujeme (téměř) lineární závislost k nule

z monografie Čárskeho a Urbana²). To podstatné, oč jde, je to, že nám tyto báze dovolují závislost hodnoty energie na rostoucí velikosti báze „protáhnout“ extrapolací do nekonečna. Situace je velmi uspokojivá u zmíněné metody SCF (metoda Hartreeho-Fockova-Roothaanova): extrapolace k nekonečnu vede k definovanému pojmu, k tzv. Hartreeho-Fockově limitě. (O různých možnostech extrapolace viz práci³.) Ze schematického obrázku 1a je vidět, že přímočará extrapolace k nekonečnu není nikterak lehká záležitost. Obtíž se lze zbavit, přejdeme-li od souřadnic E a n (celkový počet funkcí) k souřadnicím E a $1/n$ (obr. 1b): od svízelné extrapolace k nekonečnu tak přejdeme ke snadno proveditelné extrapolaci k nule. Je to o to snazší, že uvedenou změnou souřadnic vždy získáme téměř lineární závislost. Je třeba mít na mysli, že u malých species (dvou a tříatomové systémy) lze provést výpočty energie s postupně rostoucími bázemi pro $X = 2, 3, 4, 5$ a 6 . U molekul poněkud větších lze obvykle provést výpočty pro $X = 2, 3$ a 4 ; výpočty pro větší báze nelze provést na běžně dostupných počítačích. Počet bodů pro extrapolaci je tudíž malý. Navíc je třeba jej zmenšit ještě o jeden (tedy ze tří na pouhé dva), protože nejmenší v Dunningově sérii bází, báze „double zeta“ ($X = 2$) jako jediná není dostatečně konzistentní s bázemi většími. Zbývají báze dvě, báze s $X = 3$ (TZ, „triple zeta“) a $X = 4$ (QZ, „quadruply zeta“), což je pro extrapolaci žalostně málo. Uzavřít tyto poznám-



Obr. 2. Závislost vypočítané změny energie ΔE , provázející tvorbu dimeru vody, na reciproké hodnotě celkového počtu funkcí v bázi, $1/n$: 1, standardní báze; 2, rozšířené báze. Další výpočty zahrnovaly superpoziční chybu: 3, standardní báze; 4, rozšířené báze. (Převzato z práce uveřejněné v *Helv. Chim. Acta* 84, 1328 (2001) se souhlasem vydavatele.)

ky lze přesto povzbudivě. Vypočítané hodnoty energií, o nichž je řeč, jsou založeny na rigorózní teorii, a proto nehrozí rozptyl, s nímž se setkáváme i u „dobře se chovajících“ pokusných dat. A proto vede takto provedená extrapolace vždy ke zlepšení hledané hodnoty energie.

Postupme dále. V chemii nám jde téměř vždy o změny energie a ne o jejich absolutní hodnoty. Vraťme se proto k rovnicím (1) a (2) a uveďme rovnou, že zmíněná extrapolace lze použít stejně dobře i pro změny energie. Pro případ vzniku dimeru vody to ilustruje obr. 2. Místo jediné očekávané závislosti ΔE na velikosti báze (pro TZ, QZ a řekněme pro 5Z) jsou na tomto obrázku závislosti čtyři. Vedle závislosti označené 1 (získané pro standardní Dunningovy báze), jde o závislost 2, jež byla získána výpočty s rozšířenými standardními Dunningovými bázemi (v angličtině se mluví o „augmented“ bázích). Tyto báze, v souladu s výše uvedenou poznámkou, vedou k nižším absolutním hodnotám energie. Projeví se to i na hodnotách změny energie. Je však patrné, že obě závislosti vedou k téže extrapolované hodnotě ΔE pro $1/n = 0$. V úsilí o dosažení správné hodnoty ΔE jsme pokračovali dále tím, že jsme vzali v úvahu tzv. superpoziční chybu a to jak pro prosté (závislost 3), tak i pro rozšířené báze (závislost 4). Závěr je jasně patrný z obr. 2. Všechny čtyři závislosti spějí ke společné hodnotě ΔE , což extrapolovanou hodnotu $-5,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ pro dimeraci vody (obr. 2) činí vskutku věrohodnou.

Rigorózní teorie chemie pochází z teoretické fyziky.

Za zmínku stojí, že široké spektrum různě vyspělých kvantověchemických metod, které byly vyvinuty v posledních padesáti letech, mají však na svědomí převážně teoreticky orientovaní chemici. Vypracované metody slouží nejen v klasické oblasti chemie, ale i v molekulové fyzice a molekulové biologii.

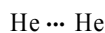
2. Chemická vazba a van der Waalsova vazba

Zanedlouho po vzniku kvantové mechaniky uprostřed dvacátých let došlo k prvním aplikacím v oblasti chemické vazby. Heitler a London, jakož i Hund a Mulliken přispěli rozhodujícím způsobem ke vzniku metody valenční vazby (VB) a metody molekulových orbitalů (MO). K ojedinělým aplikacím docházelo už ve 30. letech a ideje obou zmíněných metod začaly zvolna pronikat do učebnic fyzikální chemie. Po ukončení války v r. 1945 pozvolna nastal rozmach vníkaní, především metody MO, do chemie⁴. V 50. letech se studenti na dobrých školách dovídali o základech teorie chemické vazby. Po nelehkých začátcích (část chemické veřejnosti hleděla na aplikace s nedůvěrou) nastal v 60. letech větší rozmach. Na počátku 21. století lze jen stěží nalézt v předních chemických časopisech práce, v nichž nejsou pokusná data podložena kvantověchemickými výpočty. Kursy teorie chemické vazby jsou běžnou součástí výuky.

Po těchto slovech o chemické vazbě lze přistoupit k jádru této kapitoly, ke slabé mezimolekulové vazbě, které jsme, myslím právem, léta říkali vazba van der Waalsova (zkráceně vazba vdW)⁵. Interakční energie procesů, vedoucích k chemické (kovalentní) vazbě je o jeden až dva řády větší než změna energie provázející vznik vdW species. Nepřekvapuje, že zatímco délky chemických vazeb bývají v oboru 0,1–0,25 nm, činivá délka vazeb vdW 0,2 až 0,5 nm; v důsledku toho mívá vlnčet valenční vibrace chemické vazby hodnotu 1000–2000 cm⁻¹, kdežto u vdW systémů (jejichž vdW vazba velice měkká) činivá 10 až 100 cm⁻¹.



1

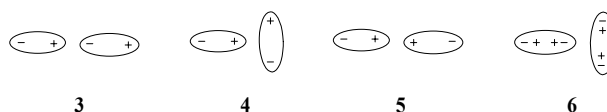


2

Za prototyp obou typů vazeb lze pokládat např. kovalenci v molekule vodíku (1) a vdW vazbu ve vdW molekule (He)₂ (2). Pro kovalentní vazbu je použito tradiční spojovací čárky, tři tečky jsou vhodným symbolem pro vdW vazbu.

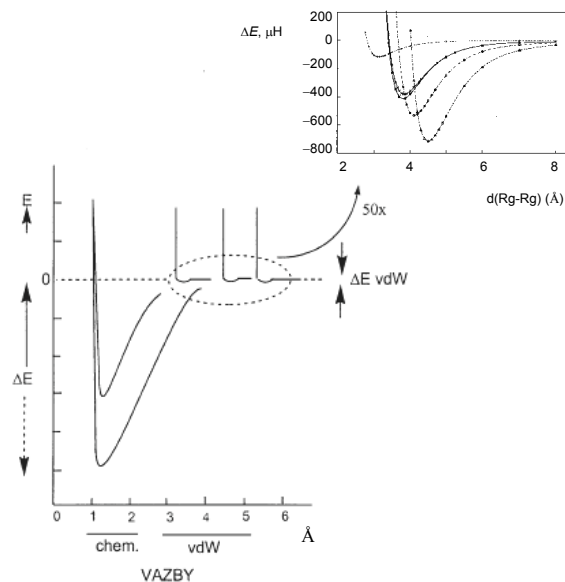
Zatím jen krátce konstatujeme, že klasické molekuly vytvářejí vdW asociáty (tedy vdW molekuly) v důsledku přitažlivých sil, které působí mezi elektrickými multipóly. Většina molekul má permanentní multipól, přičemž největší roli hrají dipóly a lineární a nelineární kvadrupóly; v dalším textu se k tomuto bodu ještě vrátím. Vazebná, ne vazebná a antivazebná interakce dvou elektrických dipólů je naznačena ve „vzorcích“ 3–5. V případě lineárního kvadrupólu se vazebná interakce vyznačuje tvarem T (6).

Jako příklad lineárních kvadrupólů mohou posloužit molekuly vodíku, dusíku, acetyleny a benzenu.



Souhrnnou informací o tom, co bylo řečeno, uvádí obr. 3. Jde o potenciální křivky (křivky potenciální energie) dvou typických kovalentních, dvouatomových molekul a několika vdW dvouatomových molekul (v našem případě jde o dimery atomů vzácných plynů). Vztah světa kovalentních a vdW species, patrný z obr. 3, platí pro celou oblast chemie a vdW chemie.

V chemii se uplatňují vdW interakce rozhodujícím způsobem v oblasti fyzisorpce a solvatace; o významu těchto oblastí nelze pochybovat. Situace v oblasti veškerých biodisciplín je však ještě vyhraněnější: bez způsobnosti popsat vdW interakce by byla teorie v celé této oblasti bez vyhlídek. Je ovšem pravda, že i v živé hmotě bývá jádro procesů spojeno s tvorbou či zánikem kovalentních vazeb, avšak tomuto procesu vždy předchází orientovaná vdW interakce partnerů v biologickém systému (tak je tomu např. u procesů enzym – substrát, antigen – antilátka, či hormon – receptor). Vnikání do podstaty procesů, probíhajících v živé hmotě, vyžaduje co největší podporu pokusných studií výpočtovými metodami. Je třeba znovu zdůraznit, že metody molekulové kvantové mechaniky



Obr. 3. Křivky potenciální energie dvouatomových molekul s minimem energie (50 až 150 kcal mol⁻¹) s mezijadernou vzdáleností 1 až 2 Å a vdW molekul s minimem energie (0,5 až 2 kcal mol⁻¹) s mezijadernou vzdáleností 3 až 5 Å. V pravém horním rohu jsou uvedeny skutečné křivky pro (Ne)₂ až (Xe)₂ (cit.⁶); škála energie je zvětšena asi padesátkrát. V případě (Ar)₂ byl proveden výpočet dvěma metodami, proto jsou u (Ar)₂ dvě křivky

jsou stejně způsobilé k popisu jak „klasických“ molekul, tak vdW molekul. Zatímco při popisu molekul lze dosti často uspět metodami, které nepatří k nejvyspělejším (a jsou proto finančně málo náročné), popis vdW species vyžaduje metody velmi kvalitní, konkrétněji řečeno metody, popisující korektně nejen SCF část celkové energie, ale co nejlépe i příspěvek korelační energie. Z praktického hlediska se uplatňuje velká svízeľ, která spočívá v tom, že takto kvalitní výpočty lze provést jen u malých systémů; s vynaložením výpočtového úsilí i u molekul střední velikosti. V molekulové biologii jde však často o systémy velké či obří (systémy obsahující stovky atomů), kde zatím rigorózní výpočty nemají šanci. Východisko pro nejbližší léta se podařilo najít v podobě empirických potenciálů, označovaných někdy názvem molekulová mechanika. Jak už bylo krátce zmíněno, vdW interakce jsou spjaty s interakcemi elektrických multipólů, přičemž dva prvé členy multipólového rozvoje, dipól a kvadrupól hrají největší úlohu. A dále je třeba uvést, že jde nejen o interakce mezi permanentními multipóly, ale navíc i o interakci mezi permanentními a indukovanými multipóly a o interakci mezi časově proměnnými a indukovanými multipóly. Tyto interakce se označují jako elektrostatické (či coulombické), indukční a disperzní. Prvé a druhé lze snadno počítat v rámci klasické elektrostatiķy, třetí (tedy disperzní interakce) jsou popsitelné rigorózně pouze pomocí kvantové mechaniky. Nic však nebrání tomu získat přijatelný odhad pomocí empirické formule, zahrnující např. polarizability vazeb. Dodejme, že konstanty, vyskytující se v empirických výrazech, lze získat pomocí výpočtů provedených pro vhodně vybrané malé a středně velké molekuly kvantověchemicky; hledané hodnoty konstant empirických potenciálů justujeme pomocí získaných výsledků kvantověchemických výpočtů. Je povzbudivé, že se podařilo vypracovat empirické potenciály, umožňující rychlý a kvalitní popis velikých, biologicky významných systémů. Ovšem to se týká pouze případů, kde se uplatňují výlučně vdW interakce, ne právě interakce chemické. Už před lety se pracovalo v několika laboratořích o kombinovaném postupu; lze ho naznačit na příkladu enzymem katalyzované reakce. Chemický děj v reakčním centru se popisuje kvantověchemicky a interakce vdW mezi bílkovinnou částí enzymu a substrátem pomocí empirických potenciálů v rámci molekulové mechaniky. Přijatelné úrovně dosáhl postup označovaný QM/MM (Quantum Mechanics, Molecular Mechanics)⁷; k dokonalosti má však dosud daleko.

To, co tato oblast tíživě postrádá, jsou kvalitní, ne lehce získatelná pokusná data pro vdW molekuly. Podrobné informace lze získat v nedávné práci o vdW systémech^{5c}.

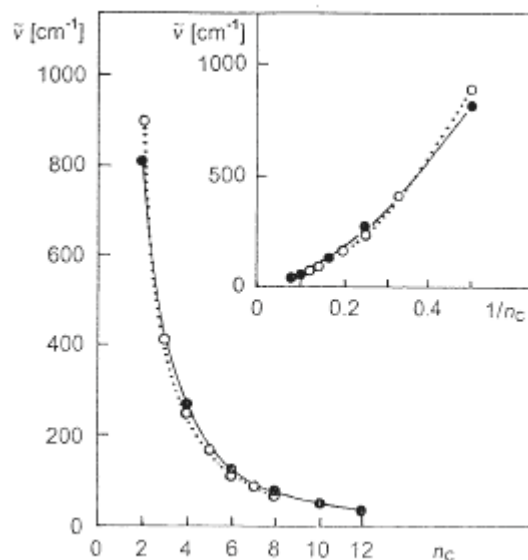
Rozmach bádání v různých oblastech molekulové biologie vyžaduje naléhavě náležitou přípravu mladé generace. Kéž si biochemický dorost uvědomí co nejdříve, že v molekulových vědách (jichž jsou biodisciplíny součástí) vyžaduje náležitě dotazení studií slušnou znalost matematiky a fyziky. Svě pověsti dbalé přírodovědné školy by měly bez průtahů zavést přiměřenou a kvalitní výuku o vdW interakcích (třeba v kurzech teorie chemické vazby),

jakož i kvalitní výuku matematiky a fyziky pro biology a biochemiky. Chemie pro to připravila potřebné podklady.

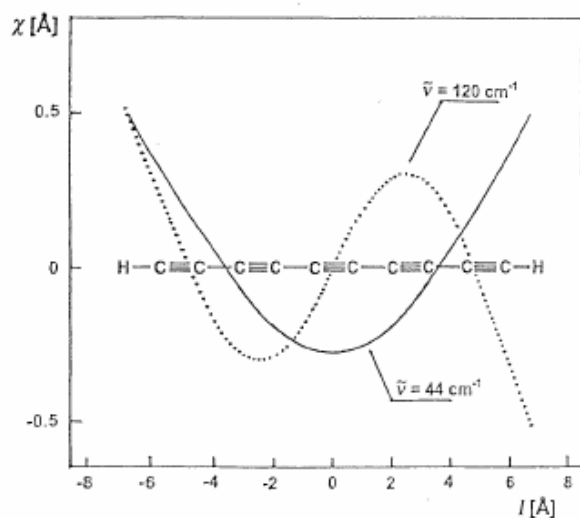
3. Proč dlouhé řetězce uhlíkových atomů kumulenu a polyynu nemusí být lineární?

Je známo, že atomové orbitály 2s a 2p v hybridizované podobě vystihují stereochemii vazeb na uhlících v parafínech (tetragonální hybridizace, sp³), v planárních konjugovaných uhlovodících (trigonální hybridizace, sp²) a v acetylenech (lineární hybridizace, sp). Ve výuce a v učebnicích se proto zdůrazňuje lineární, rigidní struktura kumulenu a polyynu. Žádnou jinou strukturu se nám, lze říci pochopitelně, nepodařilo nalézt u řad těchto uhlovodíků na příslušných energetických hyperplochách, tedy na závislostech jejich celkové energie na polohách atomů, jež je vytvářejí. Tyto studie jsme prováděli⁸ v souvislosti se zájmem o možné součástky molekulových zařízení, spojené se zájmem o jejich spektra a elektrickou vodivost. (Tato tematika nás provokovala už před lety⁹).

Strnuli jsme, když jsme v literatuře našli výsledky rentgenostrukturní analýzy¹⁰ uhlíkatých řetězců nesoucích na konci organokovové substituenty. Jde o útvary tvaru protáhlého S či protáhlého oblouku. Vyprovokovalo nás to k novému vyšetřování hyperploch, jakož i hyperploch molekul porušených interakcí se sousední molekulou, ne-



Obr. 4. Vlnočty energeticky nejméně náročného deformačního modu kumulenu (○) a polyynu (●) $\tilde{\nu}$ vynesené proti počtu uhlíků v řetězci, n_c . Pro usnadnění odhadu vlnočtů pro nekonečné uhlovodíky bylo použito rektifikace nelineární závislosti, zobrazené v pravé horní části obrázku. (Převzato z práce⁸ se souhlasem vydavatele.)



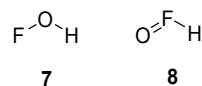
Obr. 5. Grafické zobrazení vibračních vlnových funkcí (χ) dvou energeticky nejméně náročných deformačních módů u dekaptaynu. (Převzato z práce⁸ se souhlasem vydavatele.)

vedlo to však k žádné nové, nečekané struktuře. Možné řešení se objevilo při analýze vibračních spekter polyynů a kumulenů. Pomocí obr. 4 a 5 lze rychle ozřejmit⁸, co se nabízí jako možný důvod existence nelineárních struktur. Na obr. 4 je vynesena závislost vlnočtu energeticky nejméně náročného deformačního modu na počtu atomů C v kumulenu a polyynu. Prodlužování řetězce má za následek velmi rychlý pokles vlnočtu (a tudíž i energie) sledovaného deformačního modu. Z toho plyne, že tradiční pohled na kumuleny a polyyny je nesprávný: nejde o tuhé tyčinky, naopak jde o velice snadno deformovatelné útvary. Neméně pozoruhodné je grafické zobrazení dvou nejméně náročných deformačních módů (obr. 5): ten, který odpovídá u C 10 acetylenu vlnočtu 44 cm^{-1} je spojen s deformací tvaru protaženého oblouku a mod následující (120 cm^{-1}) je spojen s pohybem atomů, vedoucím k esovité struktuře. U molekul ještě delších činí vlnočty sledovaných deformačních vibrací $20\text{--}30 \text{ cm}^{-1}$, jde tedy o módy mimořádně měkké, módy, jež jsou typické pro vdW molekuly a ne pro „klasické“ molekuly.

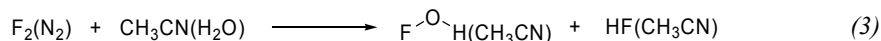
Za zmínku stojí, že jde o obecný jev. S rostoucí délkou řetězce klesá pronikavě vlnočty deformačního modu u (kvazi)lineárních molekul rozmanitých typů. Totéž se zřejmě týká i molekul nukleových kyselin. Tudíž interkalace u DNA může proběhnout snadněji, než se obvykle domníváme. V biomedicíně jde nesporně o užitečný podnět.

4. Mechanismus oxidace kyselinou fluornou

Kyselina fluorná (7) a její izomer (8), fluorosylhydrid poutají pozornost v různých souvislostech¹¹. Zdá se však, že význam kyseliny fluorné jako účinného, ale nedestruktivního oxidačního činidla, jež nachází velice široké použití v chemii, je mimořádný.



O velmi mnohé poznatky o této oxidaci se zasloužil S. Rozen¹². Když před 20 lety začínal uveřejňovat práce v této oblasti, provázely to, jak autor píše, četné svízele^{12a} s recenzenty i redakcemi chemických časopisů. Odpor a obava spjatá v chemické komunitě s prací s plynným fluorem je tak zakořeněná a velká, že se nelze divit. Rozen však houževnatě opakuje, že z technického hlediska jsou oxidace kyselinou fluornou zvládnutelné v každé slušně vybavené chemické laboratoři. Roztok kyseliny fluorné připravuje zaváděním plynné směsi fluoru a dusíku (1:9) do acetonitrilu, obsahujícího vodu (rovn. (3)); rozpuštědla jsou uvedena v závorkách.



Rozen publikoval mnoho desítek prací (souhrnně o tom viz práci^{12a}), jež jsou přesvědčivým dokladem univerzálnosti tohoto oxidovadla. Jako malou ilustraci lze uvést oxidaci thioetheru na sulfoxid a sulfon a oxidaci ethylenu na ethylenoxid. Oxidace zdárně probíhá i u substituovaných ethylenů, včetně tetrasubstituovaného. To není nikterak banální zjištění. Ostatně průmyslově se nedaří získávat ethylenoxid jinak než pomocí katalyzátou obsahujícího stříbro¹³.

To, co po letech zůstává objasněno zcela nedostatečně, je mechanismus těchto oxidací. S jistou výpočetní obratností lze sledovat kvantověchemicky přechod od reaktantů k produktům a při pečlivém provedení lze odhalit nejen stabilní meziprodukty na této cestě, ale i Eyringovy aktivované komplexy. Mám pocit, že jsme ve vlastních úvahách¹⁴ poměrně dlouho přeceňovali úlohu acetonitrilu. Samotná kyselina fluorná se při těchto výpočtových studiích nechovala jako oxidovadlo; ani přítomnost CH_3CN na tom nic neměnila. V modelovém výpočtu (s náležitým zahrnutím korelační energie) interakce ethylenu s FOH jsme nikdy nezískali ethylenoxid, ale toliko komplex FOH s ethylenem, v němž se uplatňuje vodíková vazba (schéma 1).

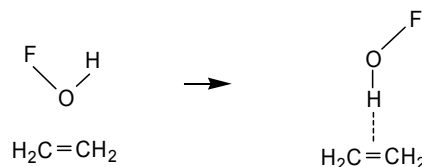


Schéma 1

Pronikavou změnu jsme pozorovali při použití dimeru (FOH)₂ jako oxidovadla, dimeru, v němž jsou podjednotky vázány dvěma vodíkovými vazbami. Podrobně je reakční cesta popsána na schématu 2 (jsou uvedeny pouze mezi-produkty, které pokládáme za hlavní). Velice výmluvné je zjištění, že vznik ethylenoxidu je spojen s nízkou energetickou bariérou, jež činí méně než 3 kcal mol⁻¹.

Chemik neodolá pokušení použít chlor místo fluoru, tedy pokusit se oxidovat kyselinou chlornou. Ukazuje se

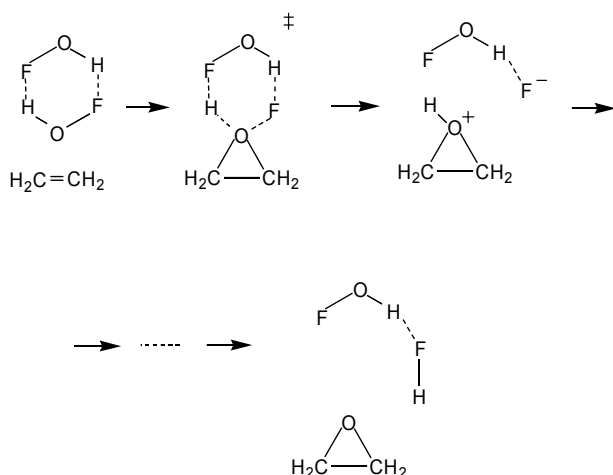


Schéma 2

však, že ani monomerní, ani cyklická dimerní forma k žádnému produktu oxidace nevede. V případě dimeru (ClOH)₂ zanikne jedna z jeho vodíkových vazeb a nová vodíková vazba se vytvoří mezi lineárním dimerem a ethylenem (schéma 3).

Jakkoli bylo příjemné, že se nám podařilo navrhnout možný mechanismus oxidace ethylenem, za důležitější ze širšího hlediska pokládám, že proces popsany schématem 2 je ilustrací katalýzy van der Waalsovou molekulou^{15*}. To je

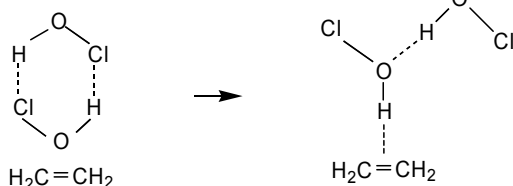


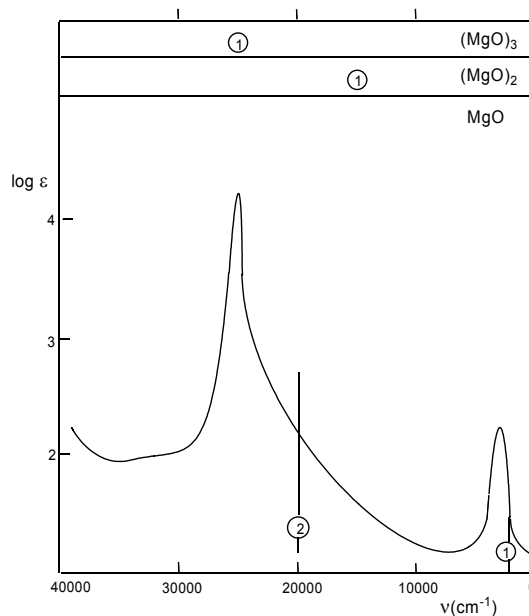
Schéma 3

v zásadě významné zejména proto, že jde o mechanismus, jenž se může dobře uplatňovat v kavitě při enzymatické

katalýze. Téma nepochybně aktuální při studiu klíčových procesů v živé hmotě.

5. Je oxid hořečnatý skutečně červený?

Takřka s jistotou lze říci ano, MgO je červený. Pokud jde o ten bílý prášek, který chemici dobře znají ze sbírek chemikálií, je vhodnější mu, v této rozporné situaci, připsat vzorec (MgO)₂. V souvislosti se studiem dvouatomových molekul¹⁶ sestávajících z atomů sloupce IIa a VIa jsme se rozhodli testovat kvantověchemické metody pro výpočet elektronických spekter u molekuly MgO. Výpočet se nám jevil jako očividně špatný: prvý intenzivní přechod byl nalezen ve viditelné oblasti a nejdouhovlnnější (méně intenzivní) elektronický přechod dokonce v oblasti u 4000 cm⁻¹, tedy v infračervené oblasti! Tedy v oblasti typické pro vibrační pohyby atomů v molekulách. V případě molekuly MgO činí valenční vibrace vazby Mg-O přibližně 800 cm⁻¹. Po marném hledání chyby ve výpočtovém programu a v našem zadání výpočtu jsme se museli smířit s tím, že výpočet je správný, i když nezbuzuje důvěru. Tato nedůvěra přešla v radost, když se podařilo nalézt



Obr. 6. Elektronické spektrum oxidu hořečnatého. Absorpční křivka je založena na kvantověchemickém výpočtu, úsečkami jsou vyznačeny pokusně pozorované dva absorpční pásy¹⁷, číselně označené ① a ②. V horní části obrázku jsou naznačeny symbolem ① vypočítané polohy prvního, tedy nejdouhovlnnějšího pásu pro dimer a trimer oxidu hořečnatého, (MgO)₂ a (MgO)₃

* O katalýze lze hovořit proto, že přistoupení další molekuly FOH k „původní“ molekule FOH nejen uskuteční proces jedinou molekulou neuskutečnitelný, ale též proto, že po ukončení sledu kroků uvedených ve schématu 2 se jedna molekula FOH vrací do dalšího oxidačního procesu. Tedy jeden z typických rysů katalytické reakce je splněn.

v literatuře pokusná data a ukázalo se, že vypočítané přechody odpovídají pokusným údajům. To je patrné na obr. 6, kde do absorpční křivky, odvozené z vypočítaných poloh a intenzit přechodů, byla vkreslena pokusná data¹⁷; kvalitativně vzato je shoda teorie s experimentem vynikající.

Ukázalo se, že výpočty elektronických spekter vedou u oxidů a sulfidů kovů ze skupiny IIa k pásům ve viditelné oblasti. Elektronický přechod v oblasti vibračních přechodů, nalezený u MgO, je dosti výjimečný. Dovoluje formulovat otázku směrem k teoretickým fyzikům: je přípustné použít za těchto okolností aproximaci běžnou u (téměř) všech kvantověchemických výpočtů molekul, aproximaci Bornovu-Oppenheimerovu, o oddělení elektronických a vibračních pohybů?

LITERATURA

- Dunning T. H., Jr.: *J. Chem. Phys.* 90, 1007 (1989).
- Čárský P., Urban M.: *Ab Initio Calculations. Methods and Application in Chemistry*. Lecture Notes in Chemistry, sv. 16. Springer-Verlag, Berlin, kap. 2.
- Zahradník R., Šroubková L.: *Isr. J. Chem.* 43, 243 (2003).
- Sandorfy C.: *Chem. Listy* 97, 182 (2003).
- Hobza P., Zahradník R.: a) *Intermolecular Complexes*. Academia, Praha 1988. b) Hobza P., Zahradník R.: *Chem. Rev.* 88, 871 (1988). c) Hobza P., Zahradník R., Müller-Dethlefs K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71, 443 (2006). d) Zahradník R., Šroubková L.: *Int. J. Quantum Chem.* 104, 52 (2005).
- Burda J. V., Zahradník R., Hobza P., Urban M.: *Mol. Phys.* 89, 425 (1996).
- Merz K. M., Jr., Stanton R. V.: v *Encyclopedia of Computational Chemistry* (Ed.-in-Chief P. von R. Schleyer). Vol. 4, 2330. J. Wiley, Chichester 1998.
- Zahradník R., Šroubková L.: *Helv. Chim. Acta* 86, 979 (2003).
- Koutecký J., Zahradník R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 25, 811 (1960).
- a) Dembinski R., Bartik T., Bartik B., Jaeger M., Gladysz J. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 1115 (2000) a práce tam citované. b) Sakurai A., Akita M., Morooka Y.: *Organometallics* 18, 3241 (1999).
- Zahradník R., Hess B. A., Jr.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 55, 890 (1990).
- a) Rozen S.: *Eur. J. Org. Chem.* 2433 (2005). b) Rozen S.: *Acc. Chem. Res.* 21, 307 (1988). c) Dunkelberg O., Haas A., Klapdor M. F., Mootz D., Poll W., Appelman E. H.: *Chem. Ber.* 127, 1871 (1994).
- Beran S., Jirů P., Wichterlová B., Zahradník R.: *React. Kinet. Catal. Lett.* 5, 131 (1976).
- Srnc M., Zahradník R.: neuveřejněné výsledky (2006).
- Zahradník R.: *Chem. Listy* 76, 1009 (1982).
- Srnc M., Zahradník R.: *Chem. Phys. Letters* 407, 283 (2005).
- Dyke J. M., Feher M., Gravenon B. W. J., Moris A.: *J. Phys. Chem.* 91, 4476 (1987).

METODY PRVKOVÉ ANALÝZY VYUŽITELNÉ PRO RoHS

**MILOSLAV POUZAR a TOMÁŠ
ČERNOHORSKÝ**

Laboratoř prvkové analýzy, Ústav ochrany ŽP, Univerzita
Pardubice

<http://webak.upce.cz/spa>, milan.pouzar@upce.cz,
tomas.cernohorsky@upce.cz

Úvod

1. června 2006 vstupuje v platnost směrnice Evropského parlamentu a Rady Evropy 2002/95/EC s názvem „The Restriction of the Use of Certain Hazardous Substances in Electrical and Electronic Equipment Regulations“ známá pod zkratkou RoHS. Tato směrnice zakazuje po uvedeném datu uvádět na trh EU nová elektrická a elektronická zařízení, ve kterých obsah vyjmenovaných toxických prvků a látek přesahuje předepsané limitní hodnoty. Omezeno je používání kadmia (Cd), olova (Pb), rtuti (Hg), šestimocného chrómu (Cr^{VI}), polybromovaných bifenyly (PBB) a polybromovaných difenyletherů (PBDE). Limitní hodnoty koncentrací dané normou jsou shrnuty v tab. I. Limitován je obsah prvku (látky) v homogenním materiálu. Za homogenní je považován takový materiál, který není možné mechanicky rozpojit na další různé materiály. Mezi operace mechanického rozpojování patří zejména šroubování, sekání, drcení, mletí a abrazivní procesy. Mezi homogenní materiály patří např. jednotlivé typy plastů, keramiky, skla, kovů a kovových slitin, papíru a lepenky, gumy a nátěrů. V případě kabelu bude pak limit platit zvlášť pro izolátor a zvlášť pro kovové jádro, protože kabel nelze ve smyslu RoHS považovat za homogenní materiál. Nejčastější oblasti použití limitovaných prvků a látek v elektrotechnickém průmyslu jsou shrnuty v tab. II.

Tabulka I
Limitní hodnoty koncentrací prvků a látek regulovaných RoHS

Prvek (látky)	Limit [%]	Limit [ppm] nebo [mg kg^{-1}]
Kadmium (Cd)	0,01	100
Rtut' (Hg)	0,1	1 000
Šestimocný chróm (Cr^{VI})	0,1	1 000
Polybromované bifenyly (PBB)	0,1	1 000
Polybromované difenylethery (PBDE)	0,1	1 000

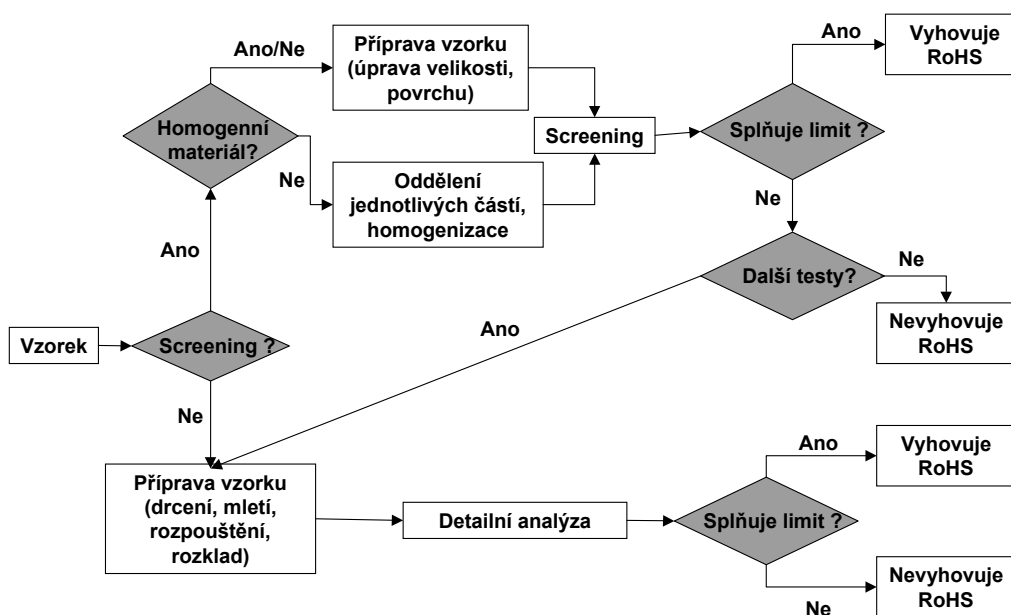
Tabulka II
Oblasti použití prvků a látek regulovaných RoHS

Prvek/Látka	Použití
Cd	baterie, pigmenty – zejména žluté a fosforeskující, aditiva do plastů (PVC – kabely, sáčky z recykl. PE), LED
Hg	spínače, pigmenty, nátěry, polyuretanové komponenty (vysoce lesklá okna), lampy, žárovky/osvětlení (displeje, skenery, projektory)
Cr^{VI}	antikoroziční ochrana kovů, pigmenty
PBB a PBDE	zpomalovače hoření (plasty – kryty, kabely, konektory, ventilátory, součást nátěrů)
Pb	pájky, baterie, pigmenty, piezoelektrická zařízení ^a , zátavová skla, CRT skla ^a , PVC kabely (UV/tepelná stabilizace)

^a Vyjmenovaná výjimka z RoHS

Strategie analytického procesu

Chemická analýza pro potřeby RoHS je do značné míry komplikována rozmanitostí materiálů, které spadají do oblasti působnosti uvedené normy. Na trhu je dostupná celá řada technik, které jsou schopné s dostatečnou přesností analyzovat vyjmenované prvky (látky). Tyto techniky se liší jak pořizovací cenou, tak i provozními náklady, nároky na úpravu vzorku, citlivostí, aplikovatelností na různé typy materiálů, nároky na kvalifikaci obsluhy, celkovou cenou analýzy a dalšími parametry. Volba analytického postupu bude v neposlední řadě ovlivněna počtem zpracovávaných vzorků, požadavky na rychlost a přesnost analýzy, konkrétním typem analyzovaného materiálu apod. Snaha o racionální vedení analytického procesu může vést např. k postupu znázorněnému na obr. 1. Toto schéma rozděluje analytické techniky na screeningové a detailní. Hlavní předností screeningových technik je jejich rychlost, malé nároky na úpravu vzorku, nedestructivnost a nízká cena analýzy. Tyto techniky se mohou dopustit falešně pozitivní identifikace (nadhodnocení koncentrace některého z prvků), ale neměly by nevyhovující vzorek označit za vyhovující. Vzorek musí být po screeningu použitelný pro další stanovení. V případě, že nelze na základě screeningu učinit jednoznačný závěr o tom, zda daný vzorek splňuje předepsaný limit či nikoli, je třeba přistoupit k detailní analýze. Zde se aplikují techniky, pro něž je charakteristická vysoká citlivost, přesnost a jednoznačnost výsledku (např. měříme pouze Cr^{VI} a nikoli celkový Cr). Detailní



Obr. 1. Strategie analytického procesu

Tabulka III
Aplikace jednotlivých technik při analýze pro potřeby RoHS

Látka/ prvek	Analytická metoda	
	screening	detailní analýza
Olovo (Pb)	ED XRF – energiově-dispersní rentgen-fluorescenční spektrometrie WD XRF – vlnově-dispersní rentgen-fluorescenční spektrometrie	ICP OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem AAS – atomová absorpční spektrometrie
Kadmium (Cd)	ED XRF – energiově-dispersní rentgen-fluorescenční spektrometrie WD XRF – vlnově-dispersní rentgen-fluorescenční spektrometrie	ICP OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem AAS – atomová absorpční spektrometrie
Rtuť (Hg)	ED XRF – energiově-dispersní rentgen-fluorescenční spektrometrie WD XRF – vlnově-dispersní rentgen-fluorescenční spektrometrie	AAS (plamenová AAS nebo metoda studených par) termooxidační stanovení
Šestimocný chróm (Cr ^{VI})	ED XRF a WD XRF (stanovení celkového Cr) kolorimetrické stanovení Cr ^{VI} ve vodě („Pack test“)	iontová chromatografie spektrofotometrie (difenylkarbazid)
PBB, PBDE	ED XRF a WD XRF (stanovení celkového Br) FTIR – infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací	GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

techniky jsou obvykle náročnější na přípravu vzorku (extrakce, mikrovlnná mineralizace), na dobu analýzy, na kvalifikaci obsluhy a obvykle jsou i dražší. Použitelnost

jednotlivých technik při screeningu a detailní analýze jednotlivých prvků (látek) pro potřeby RoHS je shrnuta v tabulce III.

Ze života společnosti

Zasedání hlavního výboru České společnosti chemické a *Cena Shimadzu 2006*

Dne 22. listopadu 2006 proběhlo v prostorách jezuitského konviktu na půdě Univerzity Palackého v Olomouci zasedání hlavního výboru ČSCH. Setkání organizovala olomoucká pobočka společnosti. V úvodu zasedání přednesl doc. Jaroslav Vičar z Ústavu lékařské chemie a biochemie, LF UP referát o doc. Karlu Bláhovi u příležitosti jeho nedožitých 80. narozenin. Předsedkyně společnosti prof. Jitka Ulrichová poděkovala Ing. Janu Šimánkovi a Ing. Markétě Bláhové, kteří ze Společnosti odešli, za skvělou práci.

Poté představil Ing. Pavel Gerla profil firmy Vitrum s.r.o, která se stala novým kolektivním členem ČSCH.



Předávání Ceny Shimadzu (zprava prof. Jitka Ulrichová, prof. Lubomír Dvořák, Ing. Robert Kaubek, Tetsuro Kai)



Ing. Markéta Bláhová



Prof. Šesták hovoří o aktivitách odborné skupiny Termická analýza

Kolektivní členové a spolupracující organizace (vysoké školy, ústavy akademie věd, průmyslové podniky a firmy zabývající se prodejem chemikálií a laboratorního vybavení) pomáhají při organizování a financování aktivit společnosti. Zástupci místních poboček a odborných skupin podali informace o svých aktivitách v uplynulém roce. Skutečným oživením mezi nimi byla přednáška prof. Jaroslava Šestáka, který hovořil o práci odborné skupiny „Termická analýza“. V závěru byla prof. Vilímem Šimánkem podána první informace o pořádání jubilejního 60. sjezdu asociací českých a slovenských chemických společností v Olomouci ve dnech 1.–4. září 2008. V podvečer měli účastníci zasedání možnost prohlídky Arcidiecézního muzea.

Ve čtvrtek 23.11.2006 byla v reprezentačních prostorách rektorátu UP předána *Cena Shimadzu*. Tuto cenu vyhlašuje japonská firma Shimadzu ve spolupráci s ČSCH od roku 1999. Je udělována mladým vědeckým pracovníkům do 35 let za původní vědeckou práci z oboru analytické chemie. Cena byla udělena RNDr. Janu Petrovi z Katedry analytické chemie, PŘF UP za práci: „On-line prekoncentrace slabých elektrolytů pomocí elektrokinetické akumulace kapilární elektroforézou“. Podle zástupce firmy Shimadzu Dr. T. Petříka ocenila komise především aplikační dopad vítězné práce.

P. Tarkowski

Oslavy na ústecké univerzitě

V uplynulých týdnech proběhly na ústecké univerzitě oslavy dvou výročí. Nejprve slavila univerzita 15 let od svého založení. Dne 28.9.1991 se tehdejší ústecká Pedagogická fakulta transformovala na Univerzitu Jana Evange-



Foto: Z. Kolská

listy Purkyně (dále jen UJEP) za současného vzniku Fakulty životního prostředí a Fakulty sociálně ekonomické. Součástí oslav byl i Týden vědy a umění na UJEP ve dnech 9.–13.10.2006. Při této příležitosti bylo uděleno 11 medailí UJEP za významný podíl na rozvoji univerzity a proběhly různé akce za přítomnosti představitelů města, kraje i jiných českých a zahraničních vysokých škol.

V dnešní době má ústecká univerzita již 7 fakult a 2 ústavy. A právě jedna z fakult, Přírodovědecká fakulta (PřF), oslavila 4. listopadu své první narozeniny. Oslavy výročí založení PřF vyvrcholily Dnem otevřených dveří v sobotu 4.11.2006.

Program obou výše zmíněných akcí u příležitosti oslav byl na PřF pro příchozí velmi bohatý a každá z kateder se snažila zaujmout veřejnost a ukázat svůj obor v příznivém a lákavém světle. Návštěvníci tak mohli strávit na fakultě příjemné dny plné různých akcí. Na katedrách probíhaly semináře, popularizační přednášky, byly otevřeny a zpřístupněny všechny pracovní, počítačové učebny, skleník s výstavou masožravých rostlin i laboratoře. I katedra chemie PřF se prezentovala řadou aktivit. Snažili jsme se tak přesvědčit veřejnost, že chemie není pouze zapáchající věda ohrožující zdraví lidí a životní prostředí v našem městě. Kromě již výše zmíněných seminářů a popularizačních přednášek byla např. promítána řada videopořadů a výukových programů zabývajících se různými oblastmi chemie (výrobou kyseliny sirové, pryskyřic, významem chloru, chemiluminiscencí, apod.), které vznikly na této katedře. Probíhaly ukázky stanovení těžkých kovů v rostlinném a biologickém materiálu. Největší úspěchy zaznamenaly demonstrace zajímavých chemických pokusů, které předváděli studenti a budoucí učitelé chemie. Posluchárna katedry chemie PřF byla vždy zcela zaplněna zájemci různých věkových kategorií.

Zdeňka Kolská

Prestižní světové i domácí ocenění uděleno profesoru Miloslavu Frumarovi z Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice

Prestižní mezinárodní cenu Stanforda R. Ovshinského, která je udělována nejvýznamnějším vědcům světa za dlouhodobé vynikající výsledky v oblasti výzkumu nekrystalických chalkogenidů, a národní cenu Hanušovu medaili získal letos vědec a pedagog – prof. Ing. Miloslav Frumar, DrSc. z Univerzity Pardubice, Katedry obecné a anorganické chemie a Výzkumného centra Nové perspektivní materiály Fakulty chemicko-technologické.

Cena S. R. Ovshinského byla udělena prof. M. Frumarovi při příležitosti konference E*PCOS 2006 – European Symposium on Phase Change and Ovonic Science, která se letos konala ve francouzském Grenoble 29.–31. května 2006 a kde profesor Miloslav Frumar přednesl přednášku s názvem „Krystalické a amorfní chalkogenidy – složení, struktura, vlastnosti a fázové změny“. Tímto významným oceněním byl mezinárodně uznán přínos prof. M. Frumara. Profesor Frumar se tak zařadil k významným vědcům v oboru, kteří toto ocenění získali již dříve, jako např. prof. K. Tanaka (University of Sapporo) z Japonska, S. R. Elliott (University of Cambridge) z Velké Británie, V. Ljubin (Negev University) z Izraele, A. Kolobov (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba) z Japonska.

Dne 28. září 2006 byla udělena prof. Ing. Miloslavu Frumarovi, DrSc. z rukou předsedkyně České společnosti chemické (ČSCH) prof. RNDr. Jitky Ulrichové, CSc. Hanušova medaile, a to při slavnostní večeři pořádané při příležitosti konání 7. mezinárodní konference „Solid State Chemistry, SSC 2006“ v prostorách pardubického zámku.

Hanušova medaile je nejvyšším vyznamenáním České společnosti chemické, udělované od roku 1966 za zásluhy o rozvoj chemie jako oboru v kterémkoliv její oblasti.

Hanušova pamětní medaile je každoročně udělována významným domácím a zahraničním vědeckým pracovníkům. Mezi vyznamenanými byli např. ze zahraničí prof. V. Prelog, prof. L. Ruzicka ze Švýcarska nebo prof. A. Bader z USA a z domova prof. J. Heyrovský, prof. A. Okáč, akad. F. Šorm, prof. E. Hála, prof. J. Koryta a dále z naší university prof. J. Klikorka, prof. J. Churáček, prof. J. Holeček, prof. P. Jandera a prof. K. Vytřas.

Profesor Frumar se již 45 let věnuje výzkumu v oblasti chemie pevných látek a anorganických materiálů. V této oblasti je považován domácí i mezinárodní vědeckou komunitou za zakladatele tzv. „pardubické školy“. Jeho vědecká škola je světově uznávána zejména v oblasti krystalických a amorfních polovodičů. Profesor Frumar a jeho studenti a spolupracovníci přispěli fundamentálními příspěvky k porozumění fotoindukovaných a fotostrukturních změn a k pochopení fyzikálně-chemických vlastností amorfních chalkogenidů. Tyto jevy jsou základem řady technologických aplikací při vývoji a výrobě pamětí, mikrooptických obvodů, dále opticky a elektricky indukovaných fázových změn vhodných pro



Profesor Frumar, oceněný Hanušovou medailí, spolu s předsedkyní České společnosti chemické prof. Ulrichovou a prof. Wágnerem, předsedou organizačního výboru mezinárodní konference SSC 2006 v září na pardubickém zámku

přípravu tzv. netěkavých pamětí. Spolu se svými spolupracovníky také přispěl k porozumění a popisu mechanismu opticky indukovaného rozpouštění a difúze stříbra v amorfních chalkogenidech, které jsou nebo budou potenciálně využitelné k přípravě optických obvodů, mířížek, mikročoček pro infračervenou oblast spektra a také netěkavých pamětí.

V oblasti průmyslových aplikací dále zaměřil svou vědeckou pozornost na luminiscenční vlastnosti krystalických práškových materiálů a amorfních tenkých vrstev halogenidů a chalkogenidů, na tlustovrstvé odporové vrstvy na bázi ruthenia a v poslední době se věnoval studiu jevů a materiálů spojených s luminiscencí prvků vzácných zemin dotovaných v chalkogenidových sklech a novým materiálům vhodným pro netěkavé paměti. Profesor Frumar vedl též výzkumné práce na projektech pro průmyslové podniky.

Profesor Frumar je autorem a spoluautorem více než 300 prací v mezinárodních a národních časopisech a knihách abstrahovaných v „Chemical Abstracts“, dále řady přehledných článků, z nichž více než 200 prací je v mezinárodních časopisech a knihách. Je rovněž autorem 19 patentů, několika set prací prezentovaných na mezinárodních konferencích, z nichž několik desítek tvoří zvané přednášky. O uznání jeho vědecké školy svědčí i četná členství v mezinárodních výborech vědeckých konferencí po celém světě – letos (2006) např. 15. ročníku mezinárodního symposia neoxidických skel „International Symposium on Non-Oxide Glasses“ v indickém Bangalore a 7. mezinárodní konference chemie pevných látek „Solid State Chemistry“ v Pardubicích. Od roku 1992 je předsedou odborné skupiny anorganické chemie České společ-

nosti chemické. Přednáší též na prestižních zahraničních univerzitách a výzkumných institucích, např. Princeton University, University Gottingen, Pennsylvania State University, University of Jena a řada dalších. Díky jeho kontaktům v mezinárodní vědecké komunitě většina jeho mladších spolupracovníků a studentů absolvovala dlouhodobé zahraniční pobyty na vyhlášených zahraničních univerzitách.

Během své odborné kariéry působil v řadě poradních orgánů, vědeckých radách, radách mezinárodních časopisů, ale též v řídicích funkcích katedry obecné a anorganické chemie. Stal se opravdovým průkopníkem v zakládání výzkumných oddělení ve spolupráci s dalšími výzkumnými ústavy a ve spolupráci se zahraničními pracovníky. V 80. letech se významně podílel na vytvoření Společné laboratoře chemie pevných látek tehdejší Vysoké školy chemicko-technologické a ČSAV, dnes Univerzity Pardubice a Ústavu makromolekulárních látek AV ČR. V roce 2000 stál u zrodu Výzkumného centra „Nové a perspektivní anorganické materiály a sloučeniny“, které velmi úspěšně vedl a vede po celou dobu jeho trvání. V současné době působí jako vedoucí Výzkumného centra „Perspektivní anorganické materiály“, navazujícího svým vědeckým záběrem na předešlé, společného pracoviště Univerzity Pardubice a Ústavu anorganické chemie AV ČR.

Za svou obětavou a novátorskou práci byl oceněn řadou vyznamenání a cen. Např. v roce 1985 byl odměněn státní cenou za výzkum v oblasti chemie amorfních polovodičů, v roce 1994 cenou Vědecko technické společnosti, v roce 2000 Pamětní medailí Univerzity Pardubice, v roce 2002 byl jmenován francouzskou vládou rytířem Akademické palmy a v roce 2004 Medailí za zásluhy o Univerzitu Pardubice.

Cena S. R. Ovshinského a Hanušova medaile jsou dalšími prestižními oceněními jeho celoživotního působení v oblasti vědy i pedagogické práce, které věnoval prof. Frumar celý svůj aktivní pracovní život. Prof. Frumar nepochybně pozitivně přispívá k rozvoji chemie a v oblasti návrhů potenciálních aplikací realizovaného výzkumu. Jeho výsledky a publikované práce mají významný vliv na rozvoj řady oblastí chemie pevných látek a materiálů.

Dne 18. července oslavil prof. Ing. Miloslav Frumar, DrSc. významné životní jubileum – 70 let – a letos je to též již 45 let, co aktivně působí na půdě pardubické vysoké školy, dříve Vysoké školy chemicko-technologické v Pardubicích, dnes Univerzity Pardubice.

Srdečně blahopřejeme.

za kolektiv pracovníků Katedry obecné a anorganické chemie a Výzkumného centra FChT prof. Ing. Tomáš Wágner, CSc.



VŠCHT Praha udělila čestný doktorát prof. Antonínu Holému

Vědecká rada Vysoké školy chemicko-technologické na svém zasedání dne 5. 10. 2006 vyjádřila jednomyslný souhlas s návrhem rektora na udělení čestné hodnosti doktor honoris causa prof. RNDr. Antonínu Holému, DrSc., d.h.c. Tato

hodnost je udělována významným domácím a zahraničním osobnostem, které výrazně přispěly k rozvoji oblastí, které tvoří zaměření a dlouhodobou orientaci VŠCHT Praha. Slavnostní promoce se konala dne 6. 11. 2006 v Betlémské kapli.

Úvodní slovo rektora VŠCHT Praha prof. Ing. Vlastimila Růžičky, CSc.

Magnifici, spectabiles, honorabiles, vážení členové akademické obce, dámy a pánové,

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze si zakládá na tom, že je náročnou vysokou školou. Tomu odpovídají nemalé nároky kladené na studenty bakalářského, inženýrského i doktorského stupně studia. Na udělování čestných doktorátů je pak VŠCHT Praha doslova skoupá, poslední udělila před devíti lety v roce 1997.

Dimenze titulu doctor honoris causa jsou ovšem zcela jiné, než hodnosti udělované na základě úspěšného zakončení studia, vědecké práce či pedagogické a publikační činnosti. Ke složení takového doktorátu se nemůžete přihlásit, neexistují konkrétní přijímací ani závěrečné zkoušky, ani institut obhajoby. Z hlediska časového i obsahového je titul doctor honoris causa oceněním mnohem vyššího řádu.

Vážený pane profesore Holý, Vysoká škola chemicko-technologická si Vás cení jako člověka, který desítky let zasvětil své vášni pro chemii a který výsledky své vědecké práce dokázal široce prakticky aplikovat. V tomto smyslu není dnešní čestný doktorát jen oceněním Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, ale symbolickým poděkováním 300 milionů pacientů, kteří se potýkají s Hepatitidou B a kterým jste přinesl lék, je poděkováním nemocných AIDS na celém světě, kterým jste dokázal výrazně zvýšit kvalitu života, je nespočítatelným poděkováním těch, které léčily a léčí Vaše protizánětlivé a protinfekční preparáty.

Vaše badatelské úspěchy, vážený pane profesore, a jejich aplikace, nesmírně pomáhají popularizovat chemii a posunovat její vnímání od negativních zakořeněných předsudků minulých let směrem k vnímání chemie jako moderní disciplíny, která přináší do našeho každodenního života pozitivní prvky. V oblasti lidského zdraví jsou tyto efekty obzvláště markantní. V tomto smyslu jste nepochybně vyslancem a popularizátorem chemie. I to je di-

menze dnešního čestného doktorátu, i za to Vám náleží mé upřímné poděkování.

Čestný doktorát, vážený pane profesore, Vám VŠCHT Praha uděluje také jako členu Akademie věd České republiky, vědci, který se zabývá obory, jež se pěstují i na VŠCHT Praha. Pro nás ve škole jsou výsledky Vaší práce velmi inspirující. Přijměte, prosím, dnešní ocenění i jako symbol spolupráce a propojení našich mateřských institucí.

Řeknu, vážený pane profesore, co Vy byste nikdy ve své skromnosti nevyslovil. Jste považován za jednoho z nejslavnějších českých chemiků současnosti, jste členem Učené společnosti ČR, nositelem cen od Tokia a Spojených států amerických po Evropskou unii. Netroufám si tady učinit kompletní výčet Vašich úspěchů a aktivit, byl by totiž nesmírně obsáhlý.

Vážený pane profesore Holý, nedokázal bych dnes nalézt nikoho jiného, komu by titul doctor honoris causa Vysoké školy chemicko-technologické v Praze měl náležet více, než Vám.

Laudatio přednesené děkanem FCHT prof. Ing. Alešem Helebrantem, CSc., na základě podkladů od prorektorky VŠCHT Praha prof. Ing. Jitky Moravcové, CSc.

Vaše magnificence, magnifici, spectabiles, honorabiles, vážená obci akademická, vzácní hosté, dámy a pánové,

je mi velkou ctí, že mohu na tomto slavnostním zasedání vědecké rady představit osobnost profesora doktora Antonína Holého, doktora věd.

Antonín Holý se narodil 1. září 1936 v Praze. Traduje se, že v osmi letech nalezl s kamarádem na půdě starou učebnici chemie z dob císařsko-královského gymnasia, kde ho upoutaly zejména doprovodné ilustrace znázorňující pokusy, různé tyglíky a křivule. Tato náhoda rozhodla o dalším osudu malého chlapce, který zahořel pro chemii a toto zaujetí mu vydrželo až do dnešních dnů. Po maturitě na gymnasiu v Karlíně nastoupil na Universitu Karlovu, kde v roce 1959 dokončil studium organické chemie na Matematicko-fyzikální fakultě.

Významným rokem byl rok 1960. Jednak se Antonín Holý vrátil z vojenské služby, jednak nastoupil vědeckou aspiranturu na Ústavu organické chemie a biochemie pod vedením dr. Arnolda a rovněž se oženil. Manželka Ludmila je absolventkou naší vysoké školy v oboru chemie a technologie sacharidů. Společně vychovali dvě dcery.

Profesor Holý zůstal věrný Ústavu organické chemie a biochemie, kam nastoupil v roce 1963 jako vědecký pracovník. Postupně byl jako vedoucí vědecký pracovník vedoucím skupiny chemie nukleových kyselin, vedoucím stejnojmenného oddělení až se v letech 1994–2002 stal ředitelem ústavu. Vědecký titul doktor věd získal v roce 1984. Věrný zůstal i chemii složek nukleových kyselin jako svému hlavnímu vědeckému zájmu. Stěží se na celém světě najde chemik zabývající se přírodními látkami, který by spíše dříve než později nepřišel do styku s některou

publikací profesora Holého. K jeho nejvýznamnějším úspěchům v aplikované chemii v minulých letech patří původní antiherpetikum DUVIRAGEL, které bylo vyráběno podnikem Léčiva Praha (nyní Zentiva), nebo originální postup přípravy azidothymidinu pro Lachemu Brno.

Profesor Holý je nejen špičkový světový odborník v oboru chemie složek nukleových kyselin, ale jeho práce má i mimořádné praktické aspekty v celém oboru medicíně chemie. Systematický, stručně přesný, cílevědomý, plně pohlcený experimentální prací či diskusí jejich výsledků. Těmito vlastnostmi proslul již při studiu na Karlově univerzitě a jakoby přirozeně stejné vlastnosti očekává u svých spolupracovníků. Obdivovaný zahraničními profesory, kteří se udiveně ptávali ještě za dob Československé akademie věd „*Je to pravda, že všechny látky uváděné v publikacích vaří sám se svojí laborantkou?*“

Šťastným rokem byl rok 1976, kdy na sympoziu v Göttingenu se Antonín Holý, chemik z Prahy, setkal s mladým lékařem z virologického ústavu Katolické university v belgickém Leuvenu, Erikem de Clercqem. Toto setkání navždy změnilo běh života obou vědců. Z diskuse vzešel návrh na testování připravených nových derivátů a analogů nukleosidů a nukleotidů na protivirovou aktivitu. Od té doby putují vzorky z Prahy do Belgie a zpátky se vrací výsledky systematického testování. Tato spolupráce byla a je výjimečně úspěšná. Přinesla zásadní nové poznatky do studia vztahu struktura látky – biologická aktivita a otevřela nové perspektivy před medicínskou chemií. Jejich výsledky byly převzaty a rozvíjeny i na renomovaných zahraničních pracovištích a za posledních zhruba 10 let inspirovaly na 1400 vědeckých prací. Poté, co do spolupráce vstoupila jako třetí strana americká farmaceutická firma Gilead, vyústila až do praktické realizace výroby léků, které pomáhají stovkám miliónů lidí na celém světě. K nejvýznamnějším úspěchům patří antivirové preparáty VISTIDE, VIREAD a HEPSERA. Vistide schválený pro klinické použití v USA v roce 1996 se používá proti virovému zánětu oční sítnice a je účinný i proti herpetickým a papilomavirovým infekcím. Lék Hepsery byl schválen v USA na podzim roku 2002 jako lék proti virové hepatitidě typu B, kterou trpí na celém světě zhruba 300 miliónů pacientů. Inhibitor reversní transkriptasy viru HIV Viread schválený v USA v roce 2001 je v současnosti jedním z neúčinnějších léků proti AIDS, významně zvyšuje kvalitu života pacientů a stal se nadějí miliónů HIV pozitivních pacientů na celém světě. Používání preparátu Viread je schváleno v mnoha státech světa včetně Evropské unie a Japonska. Kombinace preparátu Viread s emtricitabinem, byla schválena pod názvem Truvada v roce 2004.

V rámci své odborné aktivity vychoval profesor Holý řadu vědeckých pracovníků, přednášel a přednáší na University Palackého v Olomouci, na 3. Lékařské fakultě University Karlovy a na řadě zahraničních universit a pracovištích. Vede diplomové práce studentů University Karlovy a naší vysoké školy. V roce 2004 byl prezidentem republiky na návrh vědecké rady University Palackého v Olomouci jmenován profesorem organické chemie.

Vědecká práce profesora Holého zahrnuje více než

550 publikací, 60 patentů a několik knih. Počet citací na jeho práce přesahuje 7 500, což je číslo v České republice naprosto mimořádné a řadí profesora Holého k nejúspěšnějším světovým chemikům. V této souvislosti bych se rád zmínil i o jeho dlouhodobé péči o časopis Collection of Czechoslovak Chemical Communications, ve kterém tradičně publikuje valnou část svých prací. Je jistě i jeho přičiněním, že odborné renomé tohoto časopisu stoupá, jak ostatně lze dokumentovat i na zvyšujícím se tzv. impact faktoru.

Mimořádné výsledky profesora Holého na poli organické a medicínské chemie nezůstaly utajeny a byly pozasluzně odměněny řadou národních a mezinárodních cen a ocenění. Jmenovat mohu Čestnou plaketu za zásluhy o mezinárodní časopis Nucleic Acids Chemistry, Čestnou medaili National Cancer Institute, Tokyo, Státní cenu za chemii za práci?? "Acyklická analoga nukleosidů a nukleotidů", Hanušovu medaili České společnosti chemické, Čestný doktorát University Palackého v Olomouci a University v Gentu, Medaili "Za zásluhy" udělenou prezidentem České republiky v roce 2003, Cenu Praemium Bohemiae z roku 2004, Medaili Akademie věd ČR „De scientia et humanitatis optime meritis“ a Medaili "Za zásluhy" Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Je rovněž členem Učené společnosti České republiky. Omlouvám se, pokud jsem na některou z cen ve výčtu pozapomněl.

V letošním roce oslavil profesor Holý životní jubileum, stále je vědecky činný a sám experimentuje v laboratoři. Americká firma Gilead mu letos udělila čestnou profesuru tzv. „distinguished chair“, v rámci které bude financovat další výzkum týmu profesora Holého.

Profesor Holý je chemikem světového věhlasu a jedním z českých chemiků, kteří se věnují své práci ve své vlasti a přispívají tak nemalou měrou k tomu, že česká chemie má stále svoje dobré jméno. Můžeme mu jen poděkovat a popřát do další práce pevné zdraví, neutuchající elán a mnoho úspěchů.

Projev prof. RNDr. Antonína Holého, DrSc.

Vaše Magnificence pane rektore, magnificence paní a páni rektori a prorektori, spectabiles paní děkani, honorabilis paní promotorko, honorabiles paní a páni profesori, vážení přítomní, dámy a pánové:

Dovolte mi, prosím, vyjádřit Vám svůj opravdu upřímný a veliký dík za čest, kterou mi Vysoká škola chemicko-technologická v Praze dnes prokazuje udělením svého doktorátu honoris causa. Víím, jak vzácná je taková událost. Do prapředka našeho tehdejšího Chemického ústavu si před více než padesáti lety profesor Šorm z Katedry lučebnin organických a výbušnin, jak se poválečná organika jmenovala, přivedl samozřejmě především své spolupracovníky. V dnešní terminologii by náš dnešní ÚOCHB byl jakýmsi tehdejším spin-off produktem VŠCHT. Málokdo si uvědomuje, že vzniklou monolitní stavbu ústavu začala narušovat teprve naše generace, a to

až v druhé dekádě jeho existence. Ale vzájemná spřízněnost duší přetrvává. Doufám, že duchovní spojení obou pracovišť nebude narušeno právě zahájenou stavbou ústřední knihovny, která nepochybně znemožní přímý optický kontakt.

Nedávno jsem při jiné příležitosti sezval veškeré své bývalé i současné diplomanty, aspiranty a doktoranty. Bylo jich přes dvacet. Naprostá většina z nich jsou bývalí absolventi VŠCHT, Všichni byli a zůstali vynikající. Tahle skutečnost nemůže být náhodná – a za to Vám vzdávám hold.

Budeme ale tak vysokou úroveň schopni zachovat? Obávám se, že při současném volání po masovosti vysokoškolského vzdělání to snadné nebude. Každý se o něj má právo pokusit, ale získat ho smějí výhradně ti nejlepší. Máte v rukou odbornou výchovu naší inteligence i bu-

doucnost téhle společnosti. Vzdělání si může vážit jen vzdělaný národ. Přeji Vám, abyste dokázali vzdorovat všem pokusům posuzovat kvalitu vzdělání všelijakými impakty, faktory H, a podobně. Abyste nepodléhali populistickým prohlášením o nutnosti zvýšit procentuální zastoupení vysokoškolsky vzdělané pokud možno celé populace, a to za každou cenu.

Ať už tohle zadání přichází ze samotného Bruselu či dokonce z MŠMT, vždycky to bude pouhá zástěrka před pokusy odsunout o pouhých několik málo let řešení neřešitelného a jeho důsledků. Z toho vyplývající nezbytné snížení kvality by byla cesta do pekel. Čínské přísloví praví výstižně “Pět bubnů nenahradí jeden zvon.” V tomto duchu přeji nám všem do budoucnosti co nejméně chaotického technokraválu a co nejvíc melodického hlasu zvonů. Děkuji Vám za pozornost.

Odborná setkání

37. Zasedání Divize analytické chemie Evropské asociace pro chemické a molekulární vědy (Division of Analytical Chemistry of the European Association for Chemical and Molecular Science)

37. výroční zasedání DAC EuCheMS proběhlo 25. června 2006 v Moskvě v návaznosti na „International Congress on Analytical Sciences“. Zúčastnili se ho zástupci 17 evropských chemických společností ze 14 evropských zemí. Na programu byly otázky související s činností DAC, příprava analytické sekce na prvním Evropském chemickém kongresu v Budapešti v srpnu 2006, příprava konference EUROANALYSIS XIV, která proběhne 9.–14. září 2007 v belgických Antverpách, příprava konference EUROANALYSIS XV, která se v roce 2009 bude konat v rakouském Innsbrucku a příprava řady dalších odborných setkání probíhajících pod záštitou DAC EuCheMS. Delegáti byli vyzváni k podávání žádostí o pořádání konference EUROANALYSIS XVI v roce 2011. Podrobně byl diskutován další rozvoj „Eurocurricula“ analytické chemie a jeho koordinace s projekty Evropské unie TUNING a ECTN zaměřenými na sladování bakalářských a nyní i magisterských a doktorských studijních programů v oblasti chemie. V této oblasti zřejmě stojí poměrně náročné úkoly i před českou analytickou chemií.

Účast zástupce České společnosti chemické na práci DAC FECS byla umožněna jednak grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu INGO LA 273(2006) (reprezentace české analytické chemie v Evropské asociaci pro chemické a molekulární vědy) a jednak laskavou podporou firem Merck s.r.o. Praha a ChromSpec, Praha. Je milou povinností autora poděkovat výše uvedeným firmám za jejich pochopení a podporu aktivit České společnosti chemické a odborné

skupiny analytické chemie. Všechny materiály související s činností DAC EuChEMS jsou k dispozici na níže uvedené adrese.

*Jiří Barek,
zástupce České společnosti chemické v DAC EuCheMS
Katedra analytické chemie PřF UK, Albertov 2030,
128 43 Praha 2, tel: 221 951 224,
Barek@natur.cuni.cz*

ESEAC 2006

Ve dnech 11.–15. června 2006 proběhla na National School of Chemistry and Physics v Bordeaux již 11. mezinárodní konference o elektroanalýze organizovaná Evropskou společností pro elektroanalytickou chemii (European Society for ElectroAnalytical Chemistry – ESEAC). 4 plenární přednášky (Martin, Delamarche, Heller a Mascini) a 5 klíčových přednášek (Arbault, McPherson, Rossier, Gorton a Leech) přednesených špičkovými odborníky v elektroanalytické chemii poutavým způsobem seznámilo účastníky s moderními trendy v elektroanalytické chemii. Na ně navázalo více než 60 kvalitních ústních sdělení rovnoměrně zaměřených na různé, dynamicky se rozvíjející oblasti elektroanalytické chemie a více než 300 posterů. Celkově konference dokumentovala rostoucí aktivitu vědecko-výzkumných pracovníků v oblasti elektroanalytické chemie. Zvláště potěšující bylo neobyčejně vysoké procento mladých účastníků a jejich aktivita při ústních sděleních i při prezentaci posterů. Zájemci o konferenční materiály mohou kontaktovat autora tohoto článku, jehož účast na konferenci byla umožněna jednak grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu INGO LA 273 (2006) (reprezentace české analytické chemie v Evropské asociaci pro chemické a molekulární vědy) a jednak laskavou podporou firem Merck s.r.o.

Praha a ChromSpec, Praha. Autor jim touto cestou děkuje za jejich pochopení a podporu aktivit České společnosti chemické a odborné skupiny analytické chemie. Pro české elektroanalytické chemiky bude jistě zajímavá informace, že příští konference ESEAC 2008 se bude konat v červnu 2008 v Praze.

*Jiří Barek,
zástupce České společnosti chemické v DAC EuChemS
Katedra analytické chemie PřF UK, Albertov 2030,
128 43 Praha 2,
tel. 221 951 224, Barek@natur.cuni.cz*

17. Mezinárodní kongres chemického a procesního inženýrství CHISA 2006

Ve dnech 27. až 31. srpna 2006 se v Praze konal již 17th International Congress of Chemical and Proces Engineering CHISA 2006. Kongres je bezesporu jednou z nejvýznamnějších akcí v oboru ve světovém měřítku a má dlouholetou tradici: jeho první ročník se konal v Brně v r. 1962, dva následující v letech 1965 a 1969 v Mariánských Lázních a od r. 1972 se kongres koná vždy v Praze, nejprve ve tříletém, později ve dvouletém intervalu. Je zajímavé, že v době, kdy většina významných vědeckých konferencí stále mění místo svého konání a snaží se tak uplatnit i „turistický“ aspekt, zájem o kongresy CHISA, pořádané již přes 30 let na stejném místě, rozhodně neklesá. Kromě tradice, dobře strukturovaného programu a kvalitní organizace je zde bezesporu významná „přidaná hodnota“ pražského *genia loci*.

Akronym CHISA je zkratkou českého názvu chemické inženýrství, strojírenství a automatizace a národní konference se pod touto hlavičkou konají pravidelně v mezidobí mezi kongresy. Jen pro doplnění – první národní konference CHISA proběhla v r. 1956, tedy přesně před půl stoletím. Kongresy CHISA organizuje Česká společnost chemického inženýrství v úzké spolupráci s Ústavem chemických procesů AV ČR a s podporou Inženýrské akademie ČR a VŠCHT Praha a pravidelně se ho účastní zhruba tisícovka vědců z celého světa. Na letošním kongresu, nad nímž převzal záštitu předseda AV ČR prof. Václav Pačes, byli zastoupeni vědci z 64 zemí pěti kontinentů.

Slavnostní zahájení kongresu se konalo ve Dvořákově síni Rudolfiny za účasti představitelů Evropské federace chemického inženýrství, Americké společnosti chemických inženýrů, Britské společnosti chemických inženýrů a řady dalších významných domácích i zahraničních hostů. Zúčastněné pozdravili prof. Jiří Drahoš jako prezident Evropské federace chemického inženýrství, prof. Václav Pačes, předseda AV ČR a prof. Petr Zuna, prezident IA ČR. Z rukou předsedy České společnosti chemického inženýrství prof. Jiřího Drahoše převzali čestná členství ve společnosti prof. Gerhard Kreysa z Německa a dr. Trevor Evans z Velké Británie. Součástí společenského programu kongresu byl i tradiční koncert ve Smetanově síni, tento-

krát s Virtuosi di Praga, doplněnými Pražskými žesti a sólisty pražských operních scén. Zaplněná Smetanova síň nadšeně aplaudovala skladbám P. J. Vejvanovského, A. Vivaldiho a W. A. Mozarta.

Odborná část programu probíhala na stavební fakultě ČVUT v jedenácti paralelních sekcích (podrobnosti na www.chisa.cz/2006): během čtyř dnů odezněly dvě kongresové plenární, čtyři specializované plenární a 63 zvaných přehledných přednášek. Účastníci kongresu dále prezentovali přes 1300 standardních příspěvků ve formě přednášek i vývěsek. Za zmínku určitě stojí obě kongresové plenární přednášky: přístup významné nadnárodní firmy k využívání energetických zdrojů v blízké budoucnosti prezentoval dr. Greg Lewin (prezident firmy Shell Global Solutions Int.) v tématu *Possibilities into reality to create greener energy future*; prof. Klavs Jensen z MIT pak hovořil v přednášce nazvané *Chemical and biological microsystems: a revolution in discovery and development* o neuvěřitelně rychle se rozvíjejícím využití chemických mikroreaktorů. V souvislosti s mikroreaktory se nelze nepozastavit nad tím, že pokud se naše média vůbec věnují oblasti vědy a výzkumu, skloňují do omrzení slova jako nanotechnologie, biotechnologie či genetika, a zcela ignorují jiné, neméně atraktivní oblasti. Právě mikroreaktory lze označit za technologickou revoluci, která v současné době hýbe chemicko-inženýrským výzkumem na celém světě. Možnosti využití mikroreaktorů jsou zcela mimořádné a zahrnují i oblasti výše zmíněných „hitů“ současné vědy: od bezpečné syntézy celé řady látek v reaktorech nepřesahujících velikost hokejového puku, přes přípravu přesně definovaných nanočástic nebo využití jako miniaturního zdroje energie, až k nasazení různých typů mikrobioreaktorů, umožňujících pracovat velmi efektivně s velmi malým množstvím buněk či genů (v objemu nanolitru), v uspořádání typu „lab-on-the-chip“, tedy s kompletním reaktorem na ploše velikosti počítačového čipu.

V rámci kongresu proběhla rovněž celá řada specializovaných sympozií věnovaných například průmyslovým aplikacím mikrotechnologií, otázkám inženýrství životního prostředí, problémům bezpečnosti v chemickém průmyslu nebo specifickým rysům inženýrského vzdělávání. Kongres se samozřejmě věnoval i tradičním chemicko-inženýrským tématům, jako jsou reakční inženýrství, katalýza nebo separační procesy. Součástí kongresu byla 9. mezinárodní konference PRES 2006, akcentující problematiku integrace, modelování a optimalizace procesů pro úsporu energií a snížení znečištění životního prostředí. Z odborného programu kongresu byla zřejmá snaha chemického a procesního inženýrství zahrnout do návrhu procesů všechny klíčové aspekty: vysoce účinné, bezpečné a životní prostředí nepoškozující technologie; produkty šité na míru a umožňující efektivní využití vstupních surovin; minimální rozměry aparátů s maximálním stupněm intenzifikace výroby a recyklace použitých materiálů; využití víceúčelových aparátů při výrazném snížení jejich finanční náročnosti. Kongres také jednoznačně ukázal, že právě chemické a procesní inženýrství je hlavní hybnou silou pro udržitelný rozvoj chemického průmyslu a pro

celou řadu inovací nezbytných k řešení potřeb společnosti v nejrůznějších oblastech, jako jsou např. energetika, nové materiály, ochrana životního prostředí, kvalita života apod.

Odborný program kongresu doprovázely prezentace českých i zahraničních komerčních firem. V rámci kongresu proběhla též zasedání vrcholových orgánů Evropské federace chemického inženýrství a jejich pracovních skupin.

Poděkování za finanční podporu kongresu patří firmám Unipetrol, DEZA, Precheza, Česká rafinářská, Pražská plynárenská, BorsodChem MCHZ, Hexion, CS Cabot, Chemopetrol, Zentiva a Mitsubishi Chemical.

Jiří Drahoš
předseda kongresu CHISA 2006
ÚCHP AV ČR

29. evropské peptidové sympozium

Ve druhém zářijovém týdnu se v Gdaňsku uskutečnilo 29. EPS. Účast byla neobvykle malá, přijelo pouze cca 700 aktivních účastníků. Z mimoevropských zemí byly zastoupeny např. USA, Kanada, Brazílie, Austrálie, Nový Zéland, Čína, Japonsko, Jižní Korea, Indie, Írán a Egypt. Jelikož organizací byla pověřena firma Kenes, člověk si během symposia připadal, jako kdyby byl v Pentagonu. Firma použila bezpečnostní agenturu a člověk se bez visačky či příslušné vstupenky nikam nedostal. Dokonce odmítli vstup rektoru místní univerzity (spolu-organizátoru symposia), když si zapomněl příslušný lístek. Další z věcí, která by se dala organizátorům vytknout, byla určitá míra chaosu v realizaci přednášek. Několikrát se odehrála situace, kdy musel přednášející požádat, aby mu spustili jeho prezentaci. Nejhumorněji to zvládl D. Andreu z Barcelony, který prohlásil „O MUC1 peptidech bych mohl taky dát přednášku, ale raději bych mluvil o vakcíně proti slintavce a kulhavce“.

V další části tohoto článku se budu věnovat odbornému programu symposia a novinkám, které byly prezentovány. Symposium bylo rozděleno do 22 tématických skupin, zahrnujících syntézu, strukturální analýzu a modelování peptidů a jejich aplikace v biochemii, biologii, medicíně a nanotechnologiích.

Nejprve se zaměříme na syntézu peptidů a proteinů. V této oblasti nejefektivnější příspěvek přednesl F. Bordusa z Halle an der Saale. Zabývají se využitím proteas k chemické modifikaci proteinů na *N*- i *C*-konci. Metoda je založena na kondenzaci značeného prekurzoru aminokyseliny nebo peptidu s proteinem v místě specifickém pro enzym. Aby se předešlo nechtěné hydrolyze proteinu určeného ke kondenzaci, připraví se geneticky modifikované proteasy, které jsou specifické pro delší úsek peptidové sekvence. Např. trypsin s mutacemi K60E, N143H, E151H, D189K byl použit k zavedení *N*-dansyl glycinu na *N*-konec H-Met-His-Parvulinu 10, který tento protein fluorescenčně označil.

Skupina od Y. Kisa z Kjóta předvedla sérii příspěvků

týkajících se syntézy isomerních depsi-peptidů. Využívá se zde přerušení peptidového řetězce pomocí tvorby esteru v postranním řetězci aminokyseliny, jako jsou Ser a Thr. Vhodnou volbou pH dojde k přesmyku na odpovídající peptid. Strategie se využívá k syntéze tzv. obtížných sekvencí. Y. Sohma syntetizoval všechny možné chráněné depsi-di-peptidy odvozené od Thr, které mohou být použity jako stavební bloky kompatibilní s automatizovanou syntézou peptidů na pevné fázi. Dále ukázal, že použití takto upraveného Thr či Ser na *C*-konci peptidu umožní segmentovou kondenzaci bez racemizace.

P. Wadhvani z Karlsruhe použil značení peptidů ^{19}F , aby mohly být studovány pomocí ^{19}F -NMR. Ukázal, že interakce přes prostor jde studovat až do vzdálenosti 14 Å, na rozdíl od běžně dostupných 5 Å. Jediná podmínka pro použití této metody je nahradit TFA při HPLC čištění za HCl.

Bezesporu ovlivnění interakce protein-protein pomocí nízkomolekulárních ligandů povede jednou k objevení nových léčiv. Z této oblasti jsem vybral přednášku J. Eichlerové z Braunschweigu. Zaměřením se na Mena-EVH1 doménu pomocí peptidů bohatých na prolin se jim povedlo interakci s povrchovým proteinem ActA od *Listeria monocytogenes* zabránit mikroorganismu použití aktinu od hostitelského organismu a tím omezit jeho šíření usnadňované buňečným aktinem. Podobný úspěch měli i s interakcí CD4bs s HIV-1 gp120. Jejich prolinový konstrukt dokáže omezit vniknutí HIV-1 viru do buňky.

A. Perczel z Budapešti poukázal na marnou lidskou snahu napodobit přirozené inhibitory proteas. Silné přírodní inhibitory mají IC_{50} v intervalu 0,1–1 pM, zatímco umělé jsou jen občas sub-nanomolární. Přírodní inhibitory vykazují tuto vlastnost: jedna molekula inhibitoru (např. BPTI vs. Trypsin) deaktivuje jednu molekulu enzymu. Pomocí teoretické studie ukázal, že je důležité, aby „klíč“ nebyl rigidní, tj., aby se přizpůsobil vazebnému místu. Toto dokonalé přizpůsobení se zámku-klíči zmiňoval i E. Benedetti z Neapole, jelikož objevil filosofickou studii publikovanou v roce 55 př. nl., která o tomto tématu pojednává.

Poměrně významné bylo zjištění prezentované na posteru B. Penkeho ze Szegedu. Ukázal inhibitory toxicity A β 1-42 při Alzheimerově chorobě. Tyto inhibitory zabráňují A β 1-42, aby byl neurotoxický, ale neovlivňují schopnost tvořit amyloidní plaky. Tj. CNS prorůstá amyloidními plaky, aniž by se ztrácely kognitivní funkce.

Setkali jsme se s pojmy „Crypteins“ a „Cryptomics“. Krypteiny jsou proteiny nebo peptidy, které vznikají řízenou proteolýzou (podchlazením) biologicky aktivních proteinů či peptidů. Tedy jsou produkty částečné hydrolyzy. V přírodě se pozvolné hydrolyzy využívá k řízení procesů, uvedu zde příklad prezentovaný F. Nybergem z Uppsaly. Proteolýzou nociceptinu vzniká nociceptin13-17, který je antagonist na nociceptinovém receptoru, a nociceptin1-7, který moduluje aktivitu příslušného receptoru. A. I. Smith z Melbourne ukázal, že tato strategie pozvolné hydrolyzy může být vhodná pro nalezení látek s novou biologickou aktivitou. Kryptomika by měla být věda, která

zkoumá takto objevené látky.

Ze sekce nanotechnologie byla zajímavá přednáška S. Zhanga z Cambridge, Massachusetts. Na základě molekulárního designu navrhli peptidový cement, tedy peptidy, které samoorganizací (hydrofobní interakce a interakce iontového páru) vytvoří biokompatibilní výplňový materiál. Tento materiál není imunogenní a jde využít pro hojení ran bez jizev. Velké uplatnění je předpokládáno k regeneraci nervových spojení po nehodách. Dále prezentoval peptidové detergenty např. H-(Val)₆-Asp-OH nebo kationtový Lys analog. Peptidové detergenty jsou výhodné pro krystalizaci membránových proteinů, které jinak jsou obtížně krystalovatelné.

Závěrem musím říci, že ačkoliv konferenci provázeli některé organizační nedostatky, jako celek byla velmi podnětná. Zároveň člověk mohl pozorovat život v historickém centru Gdaňsku, které bylo na druhé straně řeky Motławy, kam bylo spojení zajišťováno pendlující lodí.

Jaroslav Šebestík

Zpráva z konference – Eliminační metody

Dne 10. října 2006 v deset hodin dopoledne v prostorách auly na Biofyzikálním ústavu Akademie věd České republiky byla zahájena jednodenní konference s názvem Eliminační metody. Organizačně byla připravena paní Doc. RNDr. Libuší Trnkovou, CSc. z Katedry teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity. Datum a hodina začátku konference nebyly zvoleny náhodou, protože měly velmi vhodně korespondovat s důvodem, proč byla tato konference uspořádána a to bylo a je desáté výročí od uveřejnění Eliminační voltametrie (EVLS – Elimination Voltammetry with Linear Scan)¹. Navíc je nezbytné připomenout, že v této době také uplynulo dvacet let od popsání eliminační polarografie (EP – Elimination Polarography)². Oba postupy navrhl po teoretické stránce pan prof. RNDr. Oldřich Dračka, DrSc.

Zatímco po experimentální linii se eliminačními metodám velmi intenzivně a s velkým entuziasmem věnuje právě doc. Trnková^{3–6}. Program semináře byl rozčleněn do tří přednáškových bloků. První blok přednášek byl věnován teoretickým základům eliminačních metod, jejich dalšímu rozvoji a budoucnosti, přičemž celou konferenci zahájil Prof. Dračka popsáním samotného vzniku těchto nových elektrochemických metod.

Druhý blok setkání se věnoval praktickým aplikacím eliminačních metod pro studium biologicky významných látek. Pomocí eliminačních metod jsou v dnešní době studovány oligonukleotidy, DNA, malé peptidy i velké proteiny. Třetí blok přednášek byl zaměřen na využití eliminačních metod pro studium procesů probíhajících na povrchu pracovních elektrod při detekci jak anorganických, tak organických látek.

Seminář přinesl celou řadu nových a zajímavých poznatků a ukázal, že eliminační metody mohou přinášet zajímavá experimentální data jak pro základní, tak pro aplikovaný výzkum.

Pro zájemce je k dispozici program setkání na http://cheminfo.chemi.muni.cz/ktfch/EVLS%20I_06/EVLSI_06.htm a dále byl vydán sborník rozšířených abstraktů⁷.

LITERATURA

1. Dračka O.: J. Electroanal. Chem. 402, 19 (1996).
2. Dračka O.: Collect. Czech. Chem. Commun. 51, 288 (1986).
3. Trnkova L., et al.: Electroanalysis 12, 905 (2000).
4. Trnkova L., Dračka O.: J. Electroanal. Chem. 413, 123 (1996).
5. Trnkova L., Dračka O.: J. Electroanal. Chem. 348, 265 (1993).
6. Trnkova L.: Chem. Listy 95, 518 (2001).
7. Sborník příspěvků. Eliminační metody I., 58 (2006).

René Kizek

Zprávy

Long- Range Research Initiative - startuje 3. fáze

Jak jsme již naše čtenáře informovali v únorovém čísle (Chem. Listy 100, 148 (2006).), Cefic (Evropská rada chemického průmyslu) pokračuje ve své záslužné iniciativě zaměřené na identifikaci a vyplnění mezer v našich znalostech týkajících se možných rizik souvisejících s působením chemických látek na živé organismy a na zlepšení metod umožňujících vyhodnocení rizik souvisejících s expozicí chemickým látkám. Dlouhodobý projekt nazvaný Long-Range Research Initiative (LRI) si klade za cíl poskytnout solidní vědecké podklady umožňující jak chemickému průmyslu, tak i příslušným regulačním auto-

ritám reagovat na oprávněné obavy a dotazy široké veřejnosti týkající se:

- účinnosti a spolehlivosti chemických testovacích metod,
- vlivu environmentálních faktorů na lidskou populaci jako celek i na zvláště citlivé složky populace (děti),
- vlivu rozpojovačů hormonů (endokrinních disruptorů) na živé organismy,
- alternativních metod testování za účelem odhadu rizik chemických látek eliminujících pokusy na zvířatech.

Tento projekt odráží globální snahu chemického průmyslu posílovat interakci vědy s širokou veřejností a vylepšit neprávem zdiskreditovanou představu chemie, která je v očích široké veřejnosti považována za škůdce životní

ho prostředí a disciplinu ohrožující lidské zdraví. Snahu o účinnou a kvalitní interakci mezi vědou, průmyslem, veřejností a politikou, která může výrazně prospět při optimalizaci podmínek pro trvale udržitelný rozvoj v oblasti chemie a chemického průmyslu.

Dosavadní výzkumný program byl zaměřen na tři následující oblasti:

- zhodnocení vlivu chemických látek v pracovním a životním prostředí na lidské zdraví a kvalitu každodenního života,
- snaha o lepší pochopení mechanismů, kterými mohou chemické látky negativně působit na životní prostředí,
- pochopení mechanismů působení tzv. rozpojovačů hormonů a zavedení celosvětově platných testovacích metod umožňující odhalit látky s těmito účinky.

LRI je tedy jakýmsi výrazem závazku chemického průmyslu k odpovědné péči (Responsible Care) o životní prostředí a lidské zdraví, dobrovolnou iniciativou zaměřenou na zlepšování životního prostředí, bezpečnosti, kvality lidského života a zdraví každého jednotlivce i společnosti jako celku.

Ve dnech 15. a 16. listopadu 2007 se v Bruselu konal již 8. LRI Members Workshop, který odstartoval 3. fázi projektu LRI na příští pětileté období. Byly zde definovány konkrétní priority na následující období, přičemž v roce 2007 bude pozornost koncentrována do následujících 3 oblastí:

- biomonitorování,
- endokrinní disruptory,
- PBT (Persistent, Bioaccumulation and Toxicity).

Celkově je třetí fáze projektu LRI diktována v zásadě prioritami chemického průmyslu souvisejícími s nástupem REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals), který bude mít pochopitelný dopad i na české podniky. Na řízení programu se podílí 11 zástupců nadnárodních společností v tzv. R&S Board, 12 zástupců nadnárodních společností a 2 členové odborné společnosti ECEG v tzv. LRI Programme Governance a 8 členů nadnárodních společností, 2 členové z národních chemických federací a 1 zástupce z Cefic v tzv. Innovation Program Governance. Bez výjimky jde tedy o zástupce starých členských států Evropské unie.

Řada z výše uvedených námětů by mohla zajímat i česká výzkumná pracoviště. Je trochu škoda, že z 3,5 mil EUR věnovaných na tento projekt nenašla ani minimální částka cestu do naší republiky. Přitom se domníváme, že částka 170 000 EUR, za niž v rámci tohoto projektu vznikla jedna odborná publikace, je řádově vyšší nežli částka, za kterou produkuje jednu odbornou publikaci naše průměrné vědecko-výzkumné pracoviště.

Možná, že malé zamyšlení a pohled na stránky www.cefic-lri.org by tuto situaci mohlo změnit jak z hlediska zastoupení České republiky v řídicích orgánech, tak i z hlediska případného čerpání poměrně zajímavých finančních částek.

Autoři děkují Svazu chemického průmyslu ČR a Čes-

ké společnosti chemické, jejichž aktivity v této oblasti a vzájemná příkladná spolupráce jim umožnily účast na této bezesporu zajímavé akci.

Jiří Barek a Vladimír Janeček
Barek@natur.cuni.cz, vladimir.janecek@schp.cz

Kurs o vysokoúčinných analytických separacích biologicky aktivních látek proběhl ve dnech 4. až 9. září 2006, v rámci činnosti Pražského analytického centra inovací (PACI)

Nejprve pár vět o tom, co vlastně mazlivá zkratka PACI označuje. Jde o projekt, který je součástí grantového schématu č. 4.2.01, nazvaného „Spolupráce výzkumných a vývojových pracovišť s podnikatelskou sférou, podpora inovací“ a financovaného Evropským sociálním fondem spolu se Státním rozpočtem České republiky. Z obou názvů je zřejmé, že projekt má přispívat k řešení palčivého problému přenosu výsledků základního výzkumu do co nejširší praxe a podporovat systematické a racionální vztahy mezi akademickou a podnikatelskou sférou. Je zaměřen na analytickou chemii, jeho nositelem je Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, jejímiž partnery dále jsou Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Česká společnost chemická, EURACHEM-ČR, pražské pracoviště Ústavu analytické chemie AV ČR a Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR. Na činnosti PACI se podílí i společnost ISIS Ltd., která patří britské univerzitě v Oxfordu, zajišťuje její účinné spojení s praxí a je tedy jakýmsi starším a daleko zkušenějším sourozencem PACI.

PACI (a periodicky dojíždějící ISIS) organizují kurzy, přednášky a diskusní setkání, jejichž témata zahrnují seznamování se současným stavem důležitých oborů a směrů analytické chemie, otázky validace a akreditace analytických postupů, normotvorné činnosti, řízení výzkumných jednotek a cest k praktickému uplatnění výsledků výzkumu a inovací a v neposlední řadě i společenská pravidla komunikace mezi výzkumnou a podnikatelskou oblastí. Podrobné informace o PACI a jeho aktivitách lze nalézt na adrese: <http://www.gacr.cz/PACI>.

Pětidenní kurs o separacích biologicky aktivních látek je myslím dobrým příkladem aktivit PACI. Základním motivem pro organizaci takového kursu je současný nesmírný rozvoj biologických a lékařských věd, který zásadním způsobem ovlivňuje život lidstva. Nezastupitelnou a velmi důležitou roli ve výzkumu i každodenní praxi biologie a medicíny hraje analytická chemie, na kterou jsou kladeny neobyčejně vysoké nároky. Tyto nároky naopak stimulují překotný metodický vývoj analytické chemie. Cílem kursu tedy bylo podat podstatné informace o současných přístupech k analýze typických biologicky významných systémů. Pozornost byla věnována jednak současným trendům v chromatografických a elektromigračních technikách a jejich kombinacích s hmotnostně spekt-

rometrickou detekcí, dále pak afinitním technikám a chirálním separacím. Byly shrnuty podstatné informace o separacích nejdůležitějších skupin biologicky významných látek, od aminokyselin, přes peptidy, až po proteiny a glykoproteiny. Nebyly zanedbány ani některé důležité operace s biologickými vzorky, bez kterých separace a následné analýzy nelze spolehlivě provést.

Na kursu přednášeli přední odborníci v různých odvětvích tohoto rozsáhlého pole, z kateder analytické chemie a biochemie Přírodovědecké fakulty UK, z Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích, z 1. lékařské fakulty UK, z Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně i ze zámoří, z Indiana State University v Bloomingtonu, USA. V závěru kursu byly zařazeny i praktické demonstrace dvou velmi moderních technik, HPLC-MS na čipu a MALDI-MS. Přednášející vytvořili rovněž skripta, která byla účastníkům k dispozici. V době, kdy tento sloupek píše, připravujeme zařazení podkladů přednášek na www stránky PACI.

V průběhu kursu mě potěšilo několik věcí. Byla to velká ochota a aktivita všech, kdo byli osloveni, aby přednesli přednášku. Byla to vysoká úroveň všech přednášek. Byl to značný zájem odborné veřejnosti o účast na kursu a bohaté diskuse účastníků při i po přednáškách. Myslím, že kurs byl užitečný a inspirativní pro obě strany – přednášející i posluchače.

Karel Štulík



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem České republiky.

Třináctý nositel Ceny Alfreda Badera za organickou chemii, rok 2006

Dvanáctým nositelem Ceny Alfreda Badera za organickou chemii pro české chemiky do 35 let se stal Doc.RNDr. Petr Štěpnička PhD. (34 let) z Přírodovědecké fakulty na Univerzitě Karlově v Praze. Předložil soubor prací s názvem „Chemie (difenylfosfino)ferrocenkarboxylových kyselin – syntéza, koordinační chemie a aplikace“. Slavnostní předání Ceny* se tradičně uskutečnilo na 41. konferenci "Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii – Liblice 2006" konané v Nymburku a zde, jak se již stalo tradicí, nový laureát přednesl plenární přednášku na téma oceněného souboru prací.

Nový nositel Ceny se narodil v Liberci v roce 1972. Vysokoškolské studium absolvoval na Katedře anorganické

ché chemie Přírodovědecké fakulty UK (1993 Bc.), kde získal diplom Magistra chemie v r. 1995. Na stejném pracovišti pokračoval v doktorském studiu a v r.1998 obhájil doktorskou dizertační práci. Již během studia byl na katedře zaměstnán jako asistent (1995–1998) a po získání vědecké hodnosti jako odborný asistent a v r. 2005 se stal docentem. V r. 1997 byl na stáži na Univerzitě v Rennes (Francie) a o rok později absolvoval roční stáž na Univerzitě v Sapporu (Japonsko). Je řešitelem a spoluřešitelem řady grantových projektů. Zabývá se studiem nových ferrocenových ligandů, syntézou polárních organokovových sloučenin, které jsou vhodné pro přípravu uspořádaných pevných materiálů, a dále reakcemi a syntetickým využitím ferrocenylalkynů včetně aplikací v bioorganometalické chemii. Dosažené výsledky byly dosud publikovány v úctyhodných 82 původních sděleních v recenzovaných odborných časopisech. Nový nositel Ceny získal již několik ocenění za své výsledky – Cenu rektora Univerzity Karlovy (1995), Cenu za chemii (1. místo, 1996) a Cenu české společnosti chemické za diplomovou práci (1996).

Srdečně blahopřejeme k získání prestižní Ceny Alfreda Badera a přejeme hodně dalších odborných úspěchů.

Dosavadní nositelé Ceny Alfreda Badera 1:

1) RNDr. Ivo Starý CSc. (1994), Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Praha; 2) RNDr. Martin Smrčina CSc. (1995), Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha; 3) Dr. Ing. Vladimír Havlíček (1996), Mikrobiologický ústav AVČR, Praha; 4) Ing. Pavel Lhoták CSc. (1997) Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha; 5) Ing. Michal Hoskovec CSc. (1998), Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha; 6) Ing. Michal Hocek CSc. (1999), Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha; 7) Ing. Vladimír Círka PhD. (2000), Ústav chemických procesů AV ČR, Praha; 8) Doc. RNDr. Milan Pour PhD. (2001), Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové; 9) Mgr. Štěpán Vyskočil PhD. (2002), Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha; 10) Mgr. Tomáš Kraus PhD. (2003), Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha; 11) Ing. Dana Hocková CSc. (2004), Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha; 12) Ing. Radek Cibulka PhD. (2005), Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha.

Přihlášky do soutěže o Cenu Alfreda Badera za organickou chemii v r. 2007 Cena je dotována částkou 3300 USD

V roce 2007 bude Česká společnost chemická pořádat opět soutěže o dvě Ceny Alfreda Badera. „Starší“ Cena je

* Hodnotící komise: Prof. P. Drašar (tajemník), Prof. D. Dvořák, Prof. A. Klásek, Prof. M. Kotora, Prof. V. Macháček, Prof. M. Potáček, Prof. O. Paleta (předseda), Dr. I. Starý, Prof. T. Trnka, Prof. K. Waissner, Dr. J. Závada.

za organickou chemii, „mladší“ Cena je od r. 2002 udělována za bioorganickou a bioorganickou chemii. Nemusi být pochyb o tom, že oblasti působnosti obou Cen se dosti překrývají. Markantním důkazem překryvu Cen může být skutečnost z minulých ročníků soutěže, že soubor prací, který neuspěl v jedné soutěži, byl přihlášen do soutěže o druhou Cenu – a zde uspěl. Nadále však platí omezení, že je možno získat jen jednu z Cen Alfreda Badera pro české chemiky, přitom obě Ceny jsou rovnocenné.

Uzávěrka přihlášek do konkurzu o „Cenu za organickou chemii v roce 2007“ byla stanovena na 15. červen 2007 (případně datum poštovního razítka). Podmínky a náležitosti přihlášky zůstávají v podstatě stejné jako v minulých letech: Cena se uděluje za práce v oblasti organické chemie uchazečům české státní příslušnosti, kteří nepřekročí věk 35 let v den uzavěrky přihlášek a nemají hlavní pracovní poměr v zahraničí (postdoktorská stáž se za takový pracovní poměr nepovažuje). Soubory přihlášených prací mohou rovněž zahrnovat studie mechanismů. Na druhé straně do působnosti Ceny nepřísluší práce z analytické oblasti (včetně strukturní analýzy) a výpočetní chemie. Uchazeči o Cenu se zpravidla přihlašují sami na sekretariátu České společnosti chemické, návrh však mohou podat také kolegové, instituce a rovněž vědecké rady a senáty. Cena je udělována nejlepšímu souboru prací bez ohledu na to, kolikrát se autor o ni ucházel. *Od r. 2005 je Cena je dotována částkou 3300 USD.* Tato úprava odpovídá původní dotaci a týká se obou Cen.

Hlavní částí přihlášky jsou separáty publikovaných

prací a k nim zpracovaný *souhrn vlastních výsledků* s příslušným komentářem v rozsahu 3–6 běžných strojopisných stran. V seznamu publikací se hvězdičkou označí autor, který práci podal do redakce a vyřizoval komunikaci s redakcí. Souhrn obsahuje vhodná schémata a struktury ilustrující výsledky uchazeče, dále jsou v souhrnu uvedeny citace jen na příslušné práce, které jsou předmětem soutěže. Řada publikací vzniká týmovou činností a z toho důvodu je potřeba uvést v seznamu publikací, jak se uchazeč na publikaci a jejím zveřejnění podílel (např. šlo (zčásti) o výsledky diplomové práce, výsledky doktorské práce, (zčásti) řešení grantu získaného uchazečem, samostatně řešenou část projektu, vlastní projekt, výsledky diplomanda nebo doktoranda – které uchazeč školil apod.). Nedoporučuje se hodnotit svůj podíl procentuálně, protože kupř. novou myšlenku a zkušenosti jiné osoby, které úspěšnou práci umožnily, lze těžko procentuálně srovnávat s provedením práce. Příložený životopis by měl zachytit odborný vývoj, např. téma diplomové a doktorské (kandidátské disertace) se jménem školitele, získaná ocenění, stáže a jejich tematické zaměření, získané granty apod. Hodnotící komise posuzuje soubory prací nezávisle na doporučeních školitelů, vedoucích apod., takže přihláška je plně platná a plnohodnotná i bez těchto doporučení.

Na závěr zdůraznění – **uzávěrka je 15. června 2007**, což případně může být datum poštovního razítka.

Oldřich Paleta,
předseda Komise pro Cenu Alfreda Badera I

Noví členové ČSCH

Bachmanová Markéta, studující VŠCHT Praha
Bambuch Vítězslav, Mgr., ÚOCHB Praha
Bencová Veronika, studující VŠCHT Praha
Beňo Jaroslav, Ing., VŠB Ostrava
Beňovský Petr, RNDr., PhD., Syntho Brno
Bešková Barbora, studující VŠCHT Praha
Bílá Alexandra, studující VŠCHT Praha
Bolyó Juraj, Ing., ÚCHP Praha
Buňka František, Ing., Phd., UTB Zlín
Čechlovská Hana, Ing., VUT Brno
Černá Martina, Mgr., PedF UK Praha
Černý Aleš, MUDr., Vojenská nem. Brno
Čuříková Martina, Mgr., LF UP Olomouc
Dejmková Hana, Mgr., PFF UK Praha
Domlátil Jiří, Ing., VŠCHT Praha
Dornerová Daniela, Ing., Sigma-Aldrich Praha
Dvořáková Alena, Ing., Arcibiskupské gymnázium Kroměříž
Geržová Hana, studující UTB Zlín
Gomba Gordon Karikoga, studující VŠCHT Praha
Hasáková Ivana, Ing., studující UTB Zlín
Heinrich Jan, Mgr., Walmart, a.s. Olomouc
Henke Adam, studující VŠCHT Praha
Henková Pavla, Mgr., LF UP Olomouc
Hermannová Soňa, PhD., VUT Brno
Híml Michal, Ing., VŠCHT Praha
Hlaváčková Martina, Ing., VŠCHT Praha

Hlinka Jiří, studující VŠCHT Praha
Hovorková Aneta, Ing., Univerzita Pardubice
Hývl Jakub, studující Univerzita Pardubice
Chomoucká Jana, Ing., VUT Brno
Chovancová Jana, Ing., VUT Brno
Jančová Petra, Mgr., LF UP Olomouc
Janků Slávka, RNDr., PhD., PFF MU Brno
Janiš Rahula, Ing., CSc., UTB Zlín
Jelínková Romana, Ing., ÚOPZHN Vyškov
Jeřábek Tomáš, Bc., VŠCHT Praha
Jiráček Josef, Ing., Univerzita Pardubice
Jiráček Aleš, RNDr., OSVČ Praha
Jiráček Michael, Gymnázium Český Brod
Kandelová Martina, Ing., Univerzita Pardubice
Karlova Tereza, Ing., VŠCHT Praha
Kimmel Roman, Ing., UTB Zlín
Kotková Kateřina, Ing., Univerzita Pardubice
Kotlín Roman, Ing., ÚHKT Praha
Kovář Michal, Ing., UTB Zlín
Krejčí Jiří, Ing., CSc., UTB Zlín
Krejčík Lukáš, Bc., VŠCHT Praha
Kubalová Michala, studující VŠCHT Praha
Kubelka Tomáš, studující PFF UK Praha
Kundrát Ondřej, Ing., VŠCHT Praha
Lacina Ondřej, Ing., VŠCHT Praha
Lukáč Jozef, Ing., ÚACH Řež u Prahy

Lukszová Veronika, studující VŠCHT Praha
 Mačáková Alena, studující UTB Zlín
 Marková Lenka, studující VŠCHT Praha
 Mokrejš Pavel, Ing., PhD., UTB Zlín
 Možíšková Petra, Ing., VUT Brno
 Němeček Josef, CPN s.r.o. Dolní Dobrouč
 Nováková Zdena, Ing., VŠCHT Praha
 Ondrášová Monika, Mgr., PhD., UTB Zlín
 Paldusová Barbora, studující VŠCHT Praha
 Pluskal Martin, studující VŠCHT Praha
 Pojarová Michaela, Ing., VŠCHT Praha
 Poláková Lenka, Ing., VŠCHT Praha
 Pospíšil Jaroslav, Ing., Univerzita Pardubice
 Proklesková Eva, Ing., Univerzita Pardubice
 Raindlová Veronika, studující VŠCHT Praha
 Robstecková Michaela, studující VŠCHT Praha

Spáčilová Pavla, Bc., PřF UK Praha
 Stará Danuše, RNDr., CSc., UTB Zlín
 Storch Jan, Ing., VŠCHT Praha
 Sukop Svatopluk, studující UTB Zlín
 Šedivec Vratislav, Mgr., PedF ZČU Plzeň
 Štajgerová Lenka, studující LF UP Olomouc
 Štěrbová Lucie, Ing., VŠCHT Praha
 Švarcová Irena, Ing., LF UP Olomouc
 Vagenknecht Ondřej, Bc., VŠCHT Praha
 Valoušková Eva, Ing., LF UP Olomouc
 Vitásková Lucie, Ing., Univerzita Pardubice
 Vrublová Eva, Mgr., LF UP Olomouc
 Wolfová Lucie, Ing., VUT Brno
 Zelenka Karel, Mgr., PřF UK Praha
 Žabčík Marek, Ing., Univerzita Pardubice
 Žurek Jiří, studující VŠCHT Praha

Chemik na cestách

Memorable experience

V přírodě se dějí věci s určitou pravděpodobností. Tak třeba elektron. Elektron buď „vidíme“ běžet a nevíme, kudy nám vlastně přesně proběhl, anebo si „změříme“, kde je, ale zase nevíme, jak rychle nám tudy proběhl. Marná snaha, ať se snažíme, jak chceme, oboje zaráz to prostě nejde. To samé je s chemií – člověk jí propadne a neví, kdy přestat a když (náhodou!) přestane, už už má chuť jí znovu propadnout. Osobně si myslím, že jistá aviváž tohoto principu neurčitosti působí ve směru vyšší pravděpodobnosti propadnutí, než-li přestání. Pravdou samozřejmě také je, že s jistotou danou pravděpodobností mohou tvrdit, že pokud se nějakou náhodou člověk dostane do kolotoče Chemické olympiády a podaří se mu dosáhnout pomyslného Olympu účasti na MCHO, určitě a dozajista si s vysokou pravděpodobností odnese do života takovou „memorable experience“, na kterou jen tak nezapomene...

Letošní „mezinárodka“ se konala v Jižní Korei, což už samo o sobě v každém vyvolá emotivní pocit, alespoň neuvěřitelného dojmu z poznání daleevýchodní kultury a jemné exotiky. Spojení tohoto pocitu s hřejivým pocitem být členem reprezentačního týmu České republiky ve mne vzbuzuje dodnes opravdu nezapomenutelné dojmy a vzpomínky. Ale hezky po pořádku. Když se to tak vezme, chemie je opravdu obor snad jeden z nejolympiádníčtějších, jen třeba loňský školní rok byl naprosto dokonalým a vyčerpávajícím maratónem: pozvolný start ve školním kole někdy ke konci podzimu. Za startem hned rozehřivací sprintík v krajském kole soutěže. Člověk se ani nenadal a už se blížil k půli trati na celostátně v Praze a najednou zlom! 1. teoretické soustředění jako běh do nekonečně dlouhého kopce, chvilku volný poklus směrem k další náročné části trati – praktickému soustředění a konečně delší pauza na rovině, možná snad se zastávkou u maturity. No a každý, kdo někdy doběhl závod, ví, že finiš a pohled na cílovou pásku je ta nejhromnější část soutěže –



nejinak je to i s Mezinárodní chemickou olympiádou. Zajímavé však bylo, že i když se jednalo o chemical competition – já, a řekl bych stejně tak i ostatní, jsme to prožívali naprosto odlišně. Nikdo z nás nepadl chemickým vyčerpáním, zato si všichni závěr celoročního soutěžení co nejvíce užili. Teoretický test a praktické úkoly, které trvaly po pěti hodinách, nebyly nakonec vlastně ani tím hlavním, hlavní bylo doběhnout až na vrchol a pořádně si vychutnat tu „memorable experience“.

Díky neuvěřitelné pili, snaze a ochotě organizátorů, kteří pro nás připravili opravdu nabitý program, jsme se ani na chvíli nenudili. Bylo to nějak takhle: přilet, příjezd, příchod či jak jinak nazvat naši cestu přes půl zeměkoule do (místo určení? jaksetopíše?) byl vskutku náramný – díky časovému posunu jsme měli možnost pobýt v Koreji několik dní navíc, abychom se řádně aklimatizovali a mohli se předvést na plný výkon. Bydleli jsme tedy dva dny společně s našimi mentory v přepychovém hotelu u jezera a užívali si jako obyčejní turisté. A to doslova – prošli jsme si staré městské uličky, přesně takové, jaké je každý zná z asijských filmů, obědvali v místních rodinných re-

stauracích, kde nás hostili jen těmi nejlepšími specialitkami, kterých tedy mají v Koreji požehnaně (hlavně místní kim-chi je pro našince naprostá delikatesa..., nemožno komentovat, musíte ochutnat sami:–), čvachtali se v hotelovém bazénu, dováděli v prosklených výtazích, neustále si hráli s výrobníkem na led atakdále, atakdále. Po aklimatizačním rozkoukání si nás převzali organizátoři (od nichž jsme dokonce dostali i český mluvčího průvodce!) a převezli nás do kolejního kampusu, kde bydleli i všichni ostatní studenti. Nová zábava začala a s ní i spousta nových nezapomenutelných zážitků – slavnostní zahájení s množstvím originálních performancí a především tolika oslavnými projevy, jak jen to bylo (ne)nesitelné, koncerty slavných korejských hudebních a tanečních skupin v jakékoliv podobě – od nejtradičnějších samulnori až po přeborníky v break dance a la asia, nespočet výletů luxusními autobusy s klimatizací a koženými sedačkami po širokém okolí do starobylých vesnic, kde jsme měli dokonce i tu možnost účastnit se tradičních rituálů přípravy čaje nebo si mohli vyzkoušet přípravu rýžových specialitek, či se pokusit uplést vlastní slaměné „konfekční“ doplňky, viděli jsme názorné ukázky národního bojového umění taekwondo, jež jsme si vyzkoušeli s elitními bojovníky i na vlastní kůži, navštívili jsme zábavní park, jenž byl jako ušitý na míru právě českému adrenalinovému družstvu stejně jako vodní

park s parádními tobogány a několika bazény s umělými vlnami, absolvovali jsme exkurzi do největší továrny Hyundai na světě atakdále, atakdále. Prostě (nezapomenutelná) memorable experience.

Mezinárodní studentské prostředí, jehož součástí jsme se rychle stali, byl podle mne další a snad i jeden z největších přínosů celé akce. Zahrát si volejbal s Venezuelci, Brazilci (Brazilkami), Španěly, Portugalci (Portugalkami), Malajsany, Australany a mnoha dalšími, na to se jen tak zapomenout nedá. Obrovským bonusem byla tzv. gala night, kde potkáte a poznáte spoustu cizích mentorů a osobností vědy, mezi nimiž se nezdědká najde i nějaká ta světově uznávaná chemická „celebrita“, což také není k zahzení, ono se to přeci jen někdy může hodit, mít nějakou tu známost. No a pokud jde o závěrečné zakončení a předávání medailí z rukou těch nejvíce haj hore haj korejských chemických předsedů akademii věd či profesorů, kteří se honosí tolika oceněními, že je ani sebou raději nenosí, je to natolik dojmotvorné a zpamětinesmazatelné, že úvodní slova hlavního konferenciéra opravdu nabývají nadčasové platnosti: „We just wanted you to make an International Chemistry Olympiad a memorable experience!“

*Rudolf Piša
Gymnázium Třebíč*

Výuka chemie

Střední průmyslová škola chemická v Brně představuje obor Aplikovaná chemie – Farmaceutické substance

Z historie školy

Počátky chemického průmyslového školství v Brně úzce souvisí se založením první české Průmyslové školy textilní v roce 1919. Velké požadavky byly kladeny především na barvení tkanin, které je založeno na znalostech chemie. V roce 1922 bylo rozhodnuto rozdělit vyšší ročníky na obor tkalcovský a obor chemicko-textilní. V roce 1928 byla založena dvouletá Nižší chemicko-textilní škola a čtyřletá Vyšší chemicko-textilní škola. Ještě před 2. světovou válkou byla založena Vyšší škola chemická při Vyšší průmyslové škole textilní, která byla do Brna, do budovy na Francouzské ulici 101, přeložena z Liberce. Studium na této škole bylo specializováno na obor analytický a chemicko-textilní. V roce 1951 byla nově zřízena Vyšší průmyslová škola chemická, která opustila budovu na Francouzské ulici, a nový školní rok 1951/1952 byl zahájen na Vranovské ulici 65. Zde má škola své sídlo doposud.

Vývojem prošel název školy. Původní název z roku 1951 Vyšší průmyslová škola chemická byl v roce 1953 změněn na Průmyslovou školu chemickou a od roku 1966 zákonem, kdy všechny školy končící maturitní zkouškou

byly nazvány středními, Střední průmyslovou školu chemickou. Tento název nese škola dodnes.

Současnost školy

V letošním školním roce 2006/2007 studuje na SPŠCH 475 žáků v 16 třídách denního studia. Škola připravuje studenty ve 4 studijních oborech: 28 – 44 – M / 001 Aplikovaná chemie, 29 – 42 – M / 001 Analýza potravin, 78 – 42 – M / 001 Technické lyceum a 78 – 42 – M / 006 Přírodovědné lyceum. Obor Aplikovaná chemie má 3 zaměření – Analytická chemie, Farmaceutické substance a Výpočetní technika v chemii. Všechny obory denního studia jsou čtyřleté, ukončené maturitní zkouškou.

Kromě denního studia škola zajišťuje i dálkovou formu výuky. Učební plán je shodný s plánem studia denního a je rozložen do pěti let. Těžiště výuky je v individuálním studiu. Žáci absolvují pouze jedenkrát týdně (zpravidla v pondělí v odpoledních hodinách) konzultace a praktickou výuku v odborných laboratořích. Tato forma studia je určena pracujícím s ukončeným vzděláním, kteří chtějí získat úplné střední odborné vzdělání zakončené maturitní zkouškou, nebo se chtějí requalifikovat. V letošním školním roce probíhá výuka v jedné třídě dálkového studia 5. ročníku oboru 28 – 44 – M / 005 Aplikovaná chemie – Ochrana životního prostředí.

O celkovém dění na škole informují školní noviny



Laboratoř IAM

s názvem „Chemický občasník“, jejichž přispěvateli jsou nejen žáci, ale i pracovníci školy.

Kromě své základní výchovně-vzdělávací funkce věnuje škola velkou pozornost i dalším vzdělávacím činnostem, které jsou určeny nejen vlastním žákům, ale i veřejnosti.

Škola patří mezi organizátory Chemické olympiády různých kategorií a pořádá přípravný kurz pro postupující do mezinárodního soutěže Grand Prix Chimique. Za celou dobu existence soutěže měla škola mnoho vítězů v městských, oblastních i celostátních kolech. Do přípravy chemických olympiád a mezinárodních soutěží jsou zapojeni i vyučující školy jako autoři úloh a členové komisi.

Další významnou aktivitou školy je organizace Středoškolské odborné činnosti. Jde o dobrovolnou zájmovou činnost, kterou žáci uskutečňují na škole, na odborných pracovištích vysokých škol, výzkumných ústavech, laboratořích nebo individuálně. Výsledkem SOČ je vypracovaná odborná zpráva nebo učební pomůcka s dokumentací, která se předkládá k odbornému posouzení a následně je obhajována před odbornou porotou. Na škole má SOČ dlouholetou tradici a je organizátorem krajského kola této soutěže ve všech oborech. V loňském školním roce proběhl již 28. ročník SOČ. Obhájob se zúčastnilo 52 žáků, kteří obhajovali čtyři práce v oboru Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství, dvanáct prací v oboru Chemie, pět prací v oboru Biologie, dvě práce v oboru Zdravotnictví a po jedné práci v oborech Ochrana a tvorba životního prostředí a Fyzika. Sedm prací bylo navrženo k postupu do městského kola, ze kterého postoupily čtyři práce do kola krajského a všechny následně i na celostátní přehlídce.

Celostátní přehlídka SOČ se uskutečnila ve dnech 9.–11. 6. 2006 v Karlových Varech. V oboru Chemie nás reprezentovali žáci Tomáš Vlach a Luboš Žák s prací Příprava a studium vlastností negativních polymerních světlocitlivých vrstev na bázi Polyvinylalkoholu (PVAI), kteří se umístili na 8. místě, a žákyně Eva Dostalová a Jana Oborná s prací Studium procesu generace těkavých sloučenin vybraných prvků pro možnosti jejich speciace

v potravinářských matricích metodami atomové spektrometrie, které se umístily na 10. místě a zároveň získaly zvláštní cenu, kterou je Cena děkana Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice. V oboru Zdravotnictví nás reprezentoval žák Michal Svoboda, který se umístil s prací Analýza metalothioneinu jako prognostického markeru nádorových onemocnění na 3. místě. V oboru Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství nás reprezentovaly žákyně Michaela Fukarová a Simona Tesařová, které se umístily s prací Změny kvality vajec v průběhu snáškového období u nosnic na 8. místě.

Již několik let se naši žáci úspěšně zúčastňují Soutěže vědeckých a technických projektů středoškolské mládeže AMAVET.

Pro žáky ZŠ, kteří mají zájem o chemii, organizuje škola korespondenční kurz chemie KORCHEM. Ve školním roce 2006/2007 to bude již 14. ročník a počet žáků, kteří se ho účastní, se rok od roku zvyšuje. Kromě této soutěže jsou pro žáky 8. a 9. tříd ZŠ pořádány chemické kroužky, které každoročně probíhají na škole od října do dubna v laboratořích školy.

Obor Aplikovaná chemie – Farmaceutické substance

Studijní obor Aplikovaná chemie – Farmaceutické substance byl na SPŠCH Brno poprvé otevřen ve školním roce 1998/1999, od té doby tedy školu opustilo 5 ročníků absolventů tohoto oboru. Nyní je na škole otevřeno po jedné třídě v prvním, třetí a čtvrtém ročníku a ve druhém ročníku polovina třídy.

Délka studia je 4 roky a studium je denní. Obor je určen pro hochy a dívky. Základními podmínkami pro přijetí je úspěšné ukončení základní školy, úspěšné absolvování přijímacího řízení a zdravotní způsobilost uchazeče. Studium je ukončeno maturitní zkouškou. Dosazené vzdělání je úplně střední odborné. Absolventi studijního oboru, kteří úspěšně vykonali maturitní zkoušku, se mohou ucházet o studium na vyšších odborných a vysokých školách.

Obsah výchovy a vzdělávání je stanoven tak, aby žáci mohli po úspěšném absolvování studia kvalifikovaně vykonávat činnosti, které jsou součástí profilu absolventa oboru, a aby byli připraveni pro vysokoškolské studium. Poskytované vzdělání má všeobecnou a odbornou složku. Všeobecnou složku vzdělávání poskytují žákům povinné předměty jazykové (český jazyk a literatura, anglický jazyk a německý jazyk), společenskovední (občanská nauka, dějepis), matematicko-přírodovědné (matematika, fyzika, základy ekologie), tělesná výchova a případně předměty volitelné a nepovinné.

Složku odborného vzdělávání tvoří povinné základní a profilující předměty spolu s předměty výběrovými a nepovinnými. Základní odborné učivo umožňuje žákům, aby si osvojili širší vědomosti a nezbytné dovednosti a návyky, zejména logické myšlení, uplatňování získaných vědomostí při řešení praktických úkolů a správné pracovní návyky. Tvoří základ odborné složky profilu absolventa. Řadí se sem učivo předmětů chemie, chemická laboratorní cvičení, analytická chemie, chemická technologie, stroj-

nictví, elektrotechnika, výpočetní technika a ekonomika.

Učivo profilujících předmětů vytváří prostor pro odbornou specializaci v souladu se specifickou částí profilu absolventa a určuje zaměření studijního oboru. Učivo těchto odborných předmětů je koncipováno jako dynamický systém umožňující uplatnění absolventů v nových technických, technologických, ekologických a ekonomických podmínkách. Profilující odborné předměty jsou biochemie, chemie léčiv a chemická technika.

Výběrové a volitelné předměty pomáhají dotvářet odborný profil žáka a rozšiřují jeho všeobecné vzdělání. Stanoví je škola s ohledem na potřeby regionu, profesní a zájmovou orientaci žáků. Příležitost k uplatnění individuálních zájmů a k rozšíření všeobecného i odborného vzdělání nad rámec povinného počtu hodin dává žákům učivo nepovinných předmětů.

Metody a formy výchovy a vzdělávání v jednotlivých vyučovacích předmětech studijního oboru jsou determinovány cíli, obsahem a koncepcí organizace výchovy a vzdělávání ve škole. V tomto rámci vyučující volí nejvhodnější metody a formy ke splnění dílčích výchovně vzdělávacích cílů konkrétních vyučovacích jednotek. Ve všech formách vyučování ve škole i mimo školu jsou respektována platná právní ustanovení, příslušná prováděcí vládní a resortní nařízení a vyhlášky, normy a předpisy pojednávající

o bezpečnosti a ochraně zdraví při práci.

Absolvent studijního oboru je po úspěšném vykonání maturitní zkoušky připraven se uplatnit jako technický, technicko-ekonomický a technicko-ekologický pracovník v oblasti:

- technické přípravy a technologického řízení chemických, chemicko-fyzikálních, chemicko-ekologických, farmaceutických a jiných výroby,
- chemické kontrolní analýzy,
- výzkumu a vývoje,
- monitorování, ochrany a tvorby životního prostředí,
- informačních technologií v chemickém průmyslu,
- hygienických službách a odpadovém hospodářství,
- státní správy.

Po čtyřech letech studia, která jsou zakončena úspěšným absolvováním maturitní zkoušky, většina žáků, po zvládnutí přijímacích zkoušek, pokračuje ve studiu na vysoké škole. V Brně jsou to zejména Chemická fakulta VUT, Veterinární a farmaceutická univerzita, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita a Přírodovědecké fakulty MU. Část absolventů oboru odchází ze školy přímo do praxe a je třeba poznamenat, že ze všech pracovišť přicházejí velmi pochvalné reference.

*Ing. Zdenka Kučerová
kucerova@spschbr.cz*

Diskuse

Volnost v laboratoři?

Už třetím rokem studuji chemii na Pedagogické fakultě UK v Praze. Po celou dobu mám cíl stát se učitelem chemie, i když mě stále někdo utvrzuje v tom, že tato cesta není tou nejschůdnější.

Loni jsem se přihlásil jako pomocná vědecká pracovní síla na Katedře chemie, abych tak s několika kolegy měl k chemii blíže než pár metrů z posluchárny k tabuli.

Myšlenka, o níž jsem se rozhodl napsat, mě napadla až v září tohoto roku. Dostali jsme totiž možnost podílet se na přípravě pokusů, které budou spolužáci provádět v předmětech Laboratorní technika a Cvičení z analytické chemie. Tímto jsme získali možnost mít na sobě apartní, bílé pláště v míře více než hojné.

Ze středoškolských praktik znám ten pocit, který nutně váže každého, kdo v laboratoři není dostatečně často a dlouho. Sklo mu připadá moc křehké, než aby na něj nasazoval tvrdou gumovou hadici k chlazení vodou, v obsazích kádinek a zkumavek má zmatek. Jak dostatečně „chemicky“ zvládnout danou techniku? Jak se s jistotou dopočítat požadované hodnoty? Tříčtvrtěhodinové cvičení nedá jistotu výpočtu a na práci doma se v tom kvapu nespolehne. K tomu všemu je tu ještě hrozba poleptání či popálení, a aby toho na studenta nebylo málo, je tady strážák – známkovací systém.

Obavy ze zdravotní nebo materiální újmy řeší student

déle než samotnou práci. Částečně je to menší hodinovou dotací, ale svou úlohu zde hraje i správný postup a známka. Po jisté době, kdy ze mě spadl strach ze skla, a kdy jsem přepočty všeho druhu několikrát opakoval, jsem objevil nový rozměr laboratorních prací. Jistota při práci s nádobím, látkami a výpočty ve spojení s volností bez známkového omezení způsobila, že jsem danou práci dělal rád, se skutečným zájmem o chemii a o výsledek, nikoli známku. Tento edukační pokrok se mi zdá hodný povšimnutí. Toto je ona pozitivní motivace do předmětu.

Nabízí se zde otázka, jak a jestli vůbec hodnotit studenty v laboratořích. Radši bych měl v laboratoři lidi, kteří se nebojí pracovat s nádobím, jsou si jistí, nemusejí se slepě držet postupu, když mají elegantnější způsob. Hodnocení podobných typů výuky je obtížné, ale zrovna v tomto vede k formálnímu vzdělání, které učitelé nemůže stačit.

Otázkou je, co bude studenty nutit připravovat se na takovéto hodiny. Budeme-li chtít držet se pedagogického optimismu, pak to bude jejich touha po poznání.

Je to zrovna praktická stránka, která může na středních školách nadchnout budoucí vysokoškolské studenty chemie, tak proč je odrazovat stísnějším pocitem, který většinou zažívají po vstupu do laboratoře?

*Martin Rusek
posluchač Pedagogické fakulty UK v Praze*

Členská oznámení a služby

Docenti jmenovaní od 5.5.2006 do 1.11.2006

Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.
pro obor lékařská chemie a biochemie, UP Olomouc

Doc. Ing. Jiří Brožek, CSc.
pro obor makromolekulární chemie VŠCHT Praha

Doc. Ing. Jiří Hanusek, Ph.D.
pro obor organická chemie, Univerzita Pardubice

Doc. RNDr. Petr Hrdlička, CSc.
pro obor zemědělská chemie, MZLU Brno

Doc. Ing. René Kizek, Ph.D.
pro obor zemědělská chemie, MZLU Brno

Doc. Ing. Richard Koplík, Dr.
pro obor chemie a analýza potravin, VŠCHT Praha

Doc. Ing. Tomáš Moucha, Dr.
pro obor chemické inženýrství, VŠCHT Praha

Doc. M.Sc. Nabanita Saha, Ph.D.
pro obor technologie makromolekulárních látek, UTB Zlín

Prof. RNDr. Richard Hampl, DrSc.
pro obor biochemie
na návrh Vědecké rady Univerzity Karlovy v Praze

Prof. Ing. Aleš Helebrant, CSc.
pro obor chemie a technologie anorganických materiálů
na návrh Vědecké rady Vysoké školy chemicko-
technologické v Praze

Prof. Ing. Vratislav Chromý, CSc.
pro obor analytická chemie
na návrh Vědecké rady Masarykovy univerzity

Prof. Ing. Alexander Krakovský, CSc.
pro obor bezpečnost průmyslu, větrání a požární ochrana
na návrh Vědecké rady Vysoké školy báňské - Technické
univerzity Ostrava

Prof. Ing. Vladimír Majer, CSc.
pro obor fyzikální chemie
na návrh Vědecké rady Vysoké školy chemicko-
technologické v Praze

Profesoři jmenovaní s účinností od 6. listopadu 2006

Prof. MUDr. Radim Černý, CSc.
pro obor lékařská chemie a biochemie
na návrh Vědecké rady Univerzity Karlovy v Praze

Prof. MUDr. Jiří Forejt, DrSc.
pro obor genetika, molekulární biologie a virologie
na návrh Vědecké rady Univerzity Karlovy v Praze

Akademie věd ČR udělila v chemických vědách tituly doktor věd (DSc.):

Ing. Jiří Rais, CSc., DSc.
prof. RNDr. Vladimír Král, CSc., DSc.
Ing. Michal Hocek, CSc., DSc.
doc. Martin Hof, Dr., DSc.
prof. RNDr. Ladislav Kavan, CSc., DSc.

Blahopřejeme

Osobní zprávy

Pětašedesátiny prof. Dr. Václava Pačese, DrSc.

Při zamýšlení nad životní cestou Václava Pačese napadne leckoho, a není to nápad nepřipadný, že jde o dítě Štěstěny. Avšak začtete-li se do jeho životopisu, uvidíte, že to není právě trefný popis. V jeho životě se totiž vyskytlo vskutku dost, dílem nemalých, překážek. To, že se jeho cesta jeví hladká a veskrze vlnitá, je dáno jeho skautskou duší, jež má dva výrazné rysy. Je to duše udatná a duše usměvavá. A tak ve chvílích trampot a obtíží si nestěžuje

a nikdy je nestaví na odív; nese je mužně.

Ovšem dobře si pamatuji, že jsem před pěti lety připomněl v našem časopise Pačesovy šedesátiny (Chem. Listy 96, 120 (2002).) Svůj tehdejší příspěvek jsem bral před časem do ruky v dobré víře, že tam naleznu doklady o tom, co jsem neprávem opomenul. Avšak co čert nechtěl: ten příspěvek jsem, při vší sebekritičnosti, shledal spravedlivým a, pokud jde o hlavní body a rysy jeho života, úplným. A tak jsem se rozhodl na něj navázat. Poznamenal běh života přechod od šedesátin k pětašedesátinám

oslavence? Nepřilíš a to proto, že se těší stejně duševní i fyzické kondici jako před pěti lety. Navíc od mládí byl vždy distingovaný džentlmen a zůstává stejně otevřený, stejně přímý, stejně korektní a stejně rozhodný jako byl dříve. A přece, přece k něčemu došlo. Uvedu to konstatováním, že ne jeden muž dovede na rožni připravit kotletu či roštěnku. To je však od opravdového vaření vzdálené o velký krok. A Václav získal k tomuto vaření, skutečnému vaření, opravdovou náklonnost a realizuje ji se zkušenostmi experimentálního biochemika. A tak pro něho dnes připravit např. opravdu dokonalé plněné papriky, takové jaké připravují obdivované hospodyně, není žádná potíž. Toho, co dovede v kuchyni, je však mnohem více. Ale spou mě se to jeví jako výraz opravdového zrání jeho duše. Co si jako stárnutí vzácného vína.

Pojďme však k odbornému dílu. Jako ředitel Ústavu molekulární genetiky AV s velikým úsilím, nasazením a fantazií pracoval o přípravě stavby nového ústavu. Realizace věru náročného projektu probíhá zdárně, a tak v nedaleké budoucnosti bude dílo dokončeno. Václavovo badatelství a mnohé další jeho aktivity to neohrozilo. A tak v roce 2005 byl Akademickým sněmem zvolen třetím předsedou Akademie věd České republiky. Jeho kolegialita a neúplatnost, jeho opravdu široké znalosti v oblasti věd přírodních i humanitních, jeho čest a ráznost skautského vůdce, jsou zárukou kvality bytosti stojící v čele významné části badatelské obce. Jako předseda Akademie s lehkostí (někdy možná jen zdánlivou lehkostí, neb jde vesměs o namáhavé úkoly) zvládá široké spektrum povinností: s radostí a připraven navštěvuje ústavy AV v ČR, udržuje kontakty s průmyslovou oblastí (to, že tyto kontakty nevedou častěji k realizacím *není* jeho chybou), spolupracuje úspěšně s celou oblastí vysokého školství, má čas i na gymnazisty a na popularizaci. A všichni víme, že je velice zdatným popularizátorem. Konečně ke stykům se zahraničím přispívá dočista intenzivně na moc pěkné úrovni.

Václav Pačes přispěl významně k prohloubení kontaktů s politickou sférou. To se týká jak moci výkonné, tak moci zákonodárné, jakož i kontaktů s prezidentem republiky. Dokladem toho, mimo jiné, je, že byl vážným kandidátem na místo předsedy vlády ČR, ovšem vlády, která by nebyla výrazně stranicko-politická. Musím však dodat, že mě mrzí, že některým politikům uniká, že nerespektováním vybraných Pačesových doporučení je poškozována jak naše republika, tak i věda.

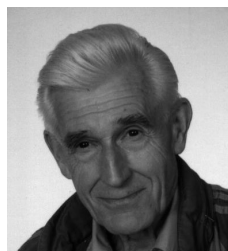
Šťastný domov rodiny Pačesových je v prvé řadě dán jeho ženou Magdou, která po léta udržuje s obětavostí vše v hladkém chodu. K atmosféře rodiny přispívají zdárně oba synové – úspěšní badatelé, Jan (40) a Ondřej (30) se svými rodinami. Tu a tam Magda byla pár dní mimo domov; před odjezdem vše nachystala. Jednou, když syn Jan byl malý chlapec, byly v lednici připraveny vařené nudle, maso a tvaroh. Václav si patrně pochutnal, se synem to bylo horší. Při malém výslechu maminkou se ukázalo, že nudle dostal studené a místo tvarohu a cukru byly posypány sunarem. Mnozí to známe, je to důsledek badatelské roztržitosti. Svědčí o ni i příběh z doby nedávné. Magda byla na služební cestě a Václav pozval amerického kolegu

na projížďku Posázavím. S nedávno koupenými krásnými bicykly na střeše auta vyzvedl Václav na Smíchově kolegu, s nímž živě konverzoval a když už byl na Smíchově, roztržitost ho dovedla k obchodnímu středisku Carefour, kam původně nezamýšlel zajet. Vrátit se nebylo možno. Na neštěstí projektant garáže nepočítal s bicykly na střeše auta. Ani se neptejte, jak to dopadlo. Naštěstí s rukou na srdci nutno přiznat, že jak auto, tak bicykly nebyly odepřány.

Zpět k dílu oslavence. Není týdne, kdy by nestrávil alespoň půlden či den v ústavu. Je stejně dobrým, zasvěceným a kritickým partnerem v diskusích o pracích, jež jsou ve stavu zrodu či končení, jakým býval v minulosti. Udivuje mne, že, ač pod tlakem mnoha různorodých povinností, udržuje působivý kontakt se svým mocně se rozvíjejícím oborem.

Pane předsedo, milý Václave, zvedám číši vína k přípitku k Tvým narozeninám s pocitem, že se v duchu mnozí kolegové k tomuto přípitku připojí: Přeji Ti zdraví, radost z díla a radost z Tvé rodiny.

Rudolf Zahradník



Osmdesát let prof. Ing. Dr. Jaromíra Horáka, DrSc.

Dne 7. ledna 2007 oslavil své kulaté osmdesáté narozeniny prof. Ing. Dr. Jaromír Horák, DrSc. Je rodákem z Jimramova na Českomoravské vysočině, kam se vždy rád vrací. Po vystudování gymnázia v blízké Poličce absolvoval Vysokou školu technickou Eduarda Beneše v Brně (obor chemické inženýrství) a v roce 1950 začal pracovat v tehdejších Zkušebnách ministerstva těžkého strojírenství. Od roku 1953 do dnešní doby je jeho život spjat s pedagogickým a vědecko-výzkumným působením na VŠCHT Pardubice (nynější Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice). V letech 1990–1992 vykonával funkci vedoucího Katedry obecné a anorganické chemie (KOAnCH). Po odchodu do důchodu v roce 1995 je nadále aktivně zapojen do vědecko-výzkumné práce na této katedře a ve Společné laboratoři chemie pevných látek Univerzity Pardubice a AV ČR při řešení projektů z oblasti chemie pevných látek. Navíc působí v Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži.

Činnost prof. Horáka jako vysokoškolského učitele byla zpočátku orientována na výuku obecné a anorganické chemie. Díky jeho zájmu o problematiku chemie pevných látek byl na počátku 60. let u zrodu nového studijního oboru, jehož náplní bylo sledování relací mezi technologií přípravy, poruchami v krystalové struktuře (odchylkami od stechiometrie) a odpovídajícími fyzikálními a chemickými vlastnostmi pevných látek. Původní studijní obor „Výroba velmi čistých látek“ položil základy pro vznik studijního oboru, nyní na FCHT Univerzity Pardubice studovaného, „Materiálového inženýrství“. Pod vedením prof. Horáka

tento obor absolvovalo několik desítek diplomantů a doktorandů. Pro své hluboké znalosti z oblasti chemie a fyziky pevných látek, osobní vlastnosti a citlivý přístup ke studentům byl mezi nimi i svými kolegy po právu oblíbený a vážený.

Od počátku svého působení na vysoké škole se zabýval problematikou chemie a technologie pevných látek. Předmětem jeho vědecké práce byla zpočátku příprava chalkogenidů sfaleritického a wurtzitického typu $A^{II}B^{VI}$ a studium vlivu příměsí na jejich luminiscenci. Další oblast jeho zájmu představovala problematika přípravy monokrystalů sloučenin $A^VB^VI C^{VII}$, např. SbSI, BiSI, s významnými polovodivými a feroelektrickými vlastnostmi. Těžištěm jeho vědecko-výzkumné práce bylo od začátku 70. let, a nadále je, sledování vztahů mezi povahou bodových poruch v krystalové struktuře, charakterem chemické vazby a korespondujícími polovodivými vlastnostmi chalkogenidů tetradymitového typu Bi_2Te_3 , Bi_2Se_3 a Sb_2Te_3 , které jsou základem materiálů pro termoelektrické aplikace – pro konstrukci termogenerátorů a chladicích elementů, pracujících v oblasti laboratorní teploty. Skupina pracovníků KOAnCH pod jeho vedením systematicky studovala souvislosti mezi povahou bodových i strukturních poruch a odpovídajícími vlastnostmi charakterizujícími transport náboje a tepla v krystalech binárních i vícetrojčkových. Předmětem jejich zájmu byly i vlastnosti optické. Výsledky mnohaleté práce byly publikovány převážně v zahraničních odborných časopisech a prezentovány na vědeckých konferencích jak doma, tak v zahraničí. Významným oceněním práce prof. Horáka v této oblasti je skutečnost, že se roku 1991 stal členem společnosti Deutsche Bunsengesellschaft. V roce 2003 obdržel z rukou tehdejší předsedkyně Akademie věd České republiky doc. RNDr. Heleny Illnerové, DrSc. medaili J. Heyrovského za zásluhy v chemických vědách. Prof. Jaromír Horák se tak stal 45. nositelem této medaile.

Na základě ohlasu publikovaných výsledků výzkumu krystalů tetradymitového typu pracovní skupina, vedená prof. Horákem rozvinula kontakty s celou řadou zahraničních institucí, z nichž lze zmínit velice úzkou spolupráci se Sektion Physik MLU Halle Wittenberg, Katedrou fyziky nízkých teplot MGU Moskva, 1. Physikalisches Institut RWTH Aachen. Za zvláště významnou lze pak pokládat úzkou spolupráci s Department of Physics University of Michigan, která je v současné době nadále rozvíjena – je zaměřena na řešení jak otázek teoretických, tak i problematiku praktického uplatnění studovaných krystalů.

V rámci mezinárodní spolupráce prof. Horák působil v letech 1968–1970 v Laboratoire de Physique des Solides Bellevue-Meudon Paříž, dále absolvoval kratší pobyty v Laboratoire Infrarouge University Montpellier a na 1. Physikalisches Institut RWTH Aachen.

Obor chemie pevných látek, orientovaný na problematiku přípravy a charakterizace nových materiálů, zejména ternárních krystalů tetradymitového typu, jejichž studium prof. Horák inicioval, nadále, za jeho nemalého přispění, rozvíjí skupina jeho bývalých studentů, nyní působících na FCHT Univerzity Pardubice. Prof. Horák se i v současné

době stále podílí na výzkumech v tomto oboru ve spolupráci s pracovníky KOAnCH a Společné laboratoře chemie pevných látek AV ČR a Univerzity Pardubice i v Ústavu anorganické chemie AV ČR.

Prof. Jaromír Horák je znám jako velmi společenský člověk, který si svým přívětivým vystupováním získal řadu přátel. Své vysoké postavy využíval i k bohatému sportovnímu životu. Hrál závodně volejbal ještě po své šedesátce a jeho tenisoví soupeři vědí, jak těžké bylo prohodit jej na síti díky jeho rozpětí paží. Všichni, kdo prof. Horáka známe a vážíme si ho, mu přejeme do dalších let neutuchající životní elán, hodně optimismu a pevného zdraví.

Petr Lošťák
Ladislav Koudelka



**Prof. Ing. Miroslav Kaloč,
CSc. sedmdesátníkem**

Prvého listopadu oslavil své 70. narozeniny významný koksárenský specialista, vysokoškolský pedagog a dlouholetý spolupracovník početné řady průmyslových firem prof. Ing. Miroslav Kaloč, CSc.

Celý tvůrčí i pedagogický život prof. Kaloče je spjat s koksochemií, uhelnou chemií a chemií uhlíku. Této problematice se profesně věnuje již od roku 1959, kdy ukončil svá vysokoškolská studia na Hutnické fakultě tehdejší Vysoké školy báňské v Ostravě. S VŠB (dnes VŠB-TUO – Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava) spojil celý svůj odborný život a na ní si průběžně zvyšoval svou odbornou kvalifikaci. V roce 1966 obhájil kandidátskou disertační práci na téma „Problémy karbonizace smoly“, v roce 1971 byl jmenován docentem pro obor „Koksárenství“ a v roce 1988 byl jmenován profesorem pro obor „Chemie a technologie paliv“.

Ve své činnosti vysokoškolského pedagoga na VŠB se věnoval nejen tradičně přednášeným předmětům (Koksárenství, Technologie tuhých paliv apod.), ale do výukového procesu zavedl i řadu nově orientovaných odborných předmětů (např. Energochemie uhlí, Uhlíkaté a keramické materiály, Průmyslový uhlík atd.). V rámci této pedagogické činnosti vydal celkem 22 vysokoškolských skript a vychoval početnou řadu inženýrů. Významná je i jeho školitelská činnost a vedení doktorandů. Do letošního roku pod jeho vedením obhájilo disertační resp. doktorskou práci 30 doktorandů. Bohaté je také jeho působení v oblasti oponentského a recenzního posuzování diplomových, disertačních i habilitačních prací, posuzování nejruznějších studií, grantů a projektů.

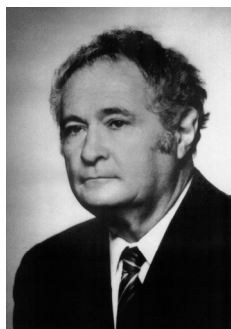
Hlavním těžištěm vědecké, odborné a výzkumné činnosti prof. Kaloče se stala problematika strukturních a texturních změn uhelné hmoty v průběhu její tepelné expozice, chemie uhlí a chemie uhlíku. V této oblasti dosáhl prof. Kaloč mezinárodního věhlasu, jehož důkazem je

např. členství v německé společnosti Verein Deutschen Kokerei Fachleute. Výsledkem jeho práce je autorství neb spoluautorství celkem 114 publikovaných odborných sdělení (z toho 39 v renomovaných zahraničních časopisech), bohatá citovanost jeho prací ve vědecké i odborné literatuře, 119 přednášek na vědeckých konferencích (z toho 89 v zahraničí, včetně Číny a Austrálie), autorství nebo spoluautorství 3 knih a 161 vědecko-výzkumných, vědeckotechnických a technických zpráv. V posledních letech se odborný zájem prof. Kaloče rozšířil i na studium uhlíkatých sorbetů, zpracování odpadů a biomasy, kompozitních materiálů a především uhlíkových membrán, což řeší v rámci projektů MŽP ČR a grantů GA ČR. Charakteristickým rysem profesního působení jubilanta je trvalé úzké sepnutí s průmyslovou praxí, s ostravskými koksovny, doly a hutními i chemickými podniky.

Jako ocenění dosavadní práce prof. Kaloče mu předal prof. Taraba, předseda ostravské pobočky České společnosti chemické, spolu s předsedkyní a místopředsedou ČSCH prof. J. Ulrichovou a prof. V. Šimánkem i zástupcem České společnosti průmyslové chemie doc. J. Vymětalem Cenu Viléma Bauera. Tato cena je udělována významným pedagogům za přínos k výuce chemie a byla jubilantovi předána v kruhu jeho přátel a spolupracovníků na VŠB-TUO v Ostravě.

K významnému životnímu jubileu přejeme panu profesorovi Kaločovi jménem jeho bývalých i současných spolupracovníků, žáků a přátel pevně zdraví, hodně pohody, radosti ze života a plnou množinu dalších úspěšných nápadů pro rozvoj chemie uhlí i uhlíku.

za všechny Jan Vymětal



Za profesorem Eduardem Růžičkou

Universitní profesor, RNDr. Eduard Růžička, CSc., se narodil 10. prosince 1917 ve Zbýňově u Rájeckých Teplíc. Opustil nás při téměř nedožitých devadesátinách, 30. září 2006. Jeho život byl plnohodnotný a naplněný.

Po maturitě v Žilině jeho studium na Přírodovědecké fakultě v Brně přerušila 2. světová válka. V této době se vrátil na Slovensko a aktivně se účastnil odbojových aktivit vedoucích k poválečné konstituci Československé republiky.

Po válce se ihned vrátil do Brna k dokončení vysokoškolského studia na Masarykově univerzitě. Absolvoval v roce 1946. Zde také obdržel doktorát RNDr. jako žák prof. Arnošta Okáče v roce 1948.

Již před obhajobou doktorátu přijal místo asistenta na obnovené Univerzitě Palackého v Olomouci v rámci tzv. „bienia přírodních věd“. Spolu s prof. Mečislavem Kurašem se stal hlavním projektantem a organizátorem dalšího vývoje přírodovědného studia a výzkumu v oboru chemie

na teprve připravované, samostatné Přírodovědecké fakultě UP. Cíleně ke konstituování přírodovědné chemie na UP působil jako proděkan „Vysoké školy pedagogické“ v letech 1954–1960.

Měl nepochybný podíl na vzniku samostatné Přírodovědecké fakulty UP v roce 1960, sám se stal vedoucím, tehdy trochu velké, ale dokonale spolupracující, Katedry organické, analytické a fyzikální chemie.

Na tomto místě musíme prof. Růžičkovi vyjádřit první dík a obdiv. My, kteří jsme na katedru se složitým jménem nastupovali koncem 50. a počátkem 60. let a byli jsme pro pana profesora až do tohoto roku „mládenci“, jsme se tehdy diskusí a spoluprací s „organiky“ a „fyzikálníky“ jako „analytici“ naučili to, co hodnotí naši spolupracovníci a studenti dodnes. Teprve později jsem také zjistil, že prof. Růžička při postupné specializaci na svůj bytostní obor analytické chemie, promyšleně přijímá jako asistenty absolventy z Bratislavy, Brna, Pardubic a tak v rámci tehdejší ČSR předjímá to, co se dnes děje v rámci Evropy.

Nelze také ovšem pominout vlastní pedagogickou a vědeckou potenci prof. Růžičky. To, že přednášel současně organickou a analytickou chemii pro učitele snad není hřích, absolventi tzv. učitelského studia dodnes oceňují propojení informací obou oborů. Měl také zásluhu na tom, že na přírodovědné chemii v Olomouci vznikl a dobře se konstitoval jako první obor pětiletého odborného studia obor *Analytické chemie*.

V době své maximální vědecké aktivity, v 50. až 70. letech, se věnoval tehdy prioritnímu tématu chudších analytických laboratoří: přípravě, základnímu výzkumu a využití analytických činidel. Jeho příspěvky *Využití oxazinových, fenothiazinových a diazinových barviv jako činidel a indikátorů* se staly součástí monografií a učebních textů (důkaz Sn^{2+} , BrO_3^- , redoxní titrace iontů i organických sloučenin). Specifickým, asi nedoceneným příspěvkem jsou reduktometrické titrace v amfiprotních polyhydroxy-rozpouštědlech typu polyglykolů.

Vědecké, koncepční a organizační zásluhy prof. Růžičky byly také oceněny, a to již za jeho života. Za svou činnost ve vědeckých radách vysokých škol, v Československé společnosti chemické, oborových radách Ministerstva školství, v Komisi expertů MŠ (předsednictví chemické sekce) obdržel řadu vyznamenání a medailí, mj.: Zlaté medaile Masarykovy univerzity v Brně, Vysoké školy báňské v Ostravě, samozřejmě medaile UP v Olomouci, Hanušova medaile Československé společnosti chemické a Vyznamenání za vynikající práci převzal z rukou ministra školství prof. Hájka v prosinci roku 1967. V roce 2003 při slavnosti k 50. výročí vzniku samostatné Přírodovědecké fakulty obdržel poslední, mimořádnou zlatou medaili naší univerzity jako zakladatel přírodovědné chemie v Olomouci.

Pan profesor měl rád společnost, byl velmi přátelský, vtipný glosátor dění a na sportovních výletech nás udivoval bravurní fotbalovou technikou.

Závěrem bych rád poděkoval prof. Růžičkovi jako diplomatovi. Musím konstatovat, že po roce 1969 „přežil“ asi jako jediný nestranický, „vyškrtnutý“ vedoucí katedry

na fakultě a to až do odchodu do důchodu v roce 1982. To, samo o sobě by mohlo být interpretováno i negativně. Zároveň ovšem dobře vím, že naše, tehdy 30–40-letá „mládež“ byla v době „nové naděje“ a později i v počínajícím disentu velmi aktivní. Z pracovníků chemie na PřF UP nemusel odejít nikdo, mne se to týkalo bezprostředně, takže „pane Professore s láskou“ budeme na Vás i Vaši lidskou inteligenci vzpomínat s úctou.

za Vaše kolegy a žáky Zdeněk Stránský

Vzpomínka přednesená u příležitosti nedožitých osmdesátých narozenin doc. Dr. Ing. Karla Bláhy, CSc. na zasedání Hlavního výboru ČSCH dne 22.11.2006

Doc. Dr. Ing. Karel Bláha, CSc. (1926–1987), jeden z nejvýznamnějších poválečných českých chemiků se narodil ve Vejvanově v okrese Rokycany. Po maturitě na gymnáziu v Plzni studoval na Vysokém učení chemicko-technologického inženýrství v Praze, které absolvoval v roce 1949; o rok později tamtéž získal doktorát technických věd.

Deset let působil v Laboratoři heterocyklických sloučenin Československé akademie věd, kde se zabýval hlavně chemií alkaloidů. Laboratoř heterocyklických sloučenin byla založena v roce 1952 pro Prof. Lukeše – to byla tehdy obvyklá praxe, pro akademiky se zřizovala specializovaná pracoviště. Prof. Lukeš byl kromě vedení Laboratoře také vedoucím katedry organické chemie VŠCHT; zaměstnanci byli někteří pracovníci katedry a obě pracoviště byla personálně a materiálně propojena. Zmiňuji se o tom podrobněji, protože na tuto bohatýrskou dobu na technice doc. Bláha velmi často vzpomínal, prof. Lukeše si nesmírně vážil a při každé možné příležitosti se k němu hlásil jako ke svému nejdůležitějšímu učiteli. Nicméně v roce 1960 prof. Lukeš umírá, čímž se pro Karla Bláhu, a teď ho přesně ocituji, „stala půda na technice příliš horkou“, takže přechází spolu s několika dalšími známými českými chemiky v podobné situaci na ČSAV, kde ideologická hlediska hrála menší úlohu, a to do Ústavu organické chemie a biochemie. Tam působil ve skupině chemie peptidů vedené jedním z významných světových představitelů tohoto oboru Josefem Rudingerem, po jehož odchodu do emigrace se stává vedoucím skupiny. Karel Bláha přináší do skupiny zaměřené na syntézu rozsáhlé znalosti fyzikálních metod, které tehdy procházely svým zlatým obdobím. Rozhodujícím způsobem u nás přispěl k zavedení a rozšíření chiroptických přístupů, což souviselo s jeho hlubokým zájmem o stereochemii. Během pobytu na Polytechnic Institute of Brooklyn, USA, se pod vedením Murray Goodmana zabývá metodami studia konformace peptidů a bílkovin. V roce 1972 dokončuje a odevzdává doktorskou disertaci, další řízení je však zastaveno. V roce 1982 se v Praze konal pod jeho předsednictvím 12. sjezd Evropské peptidové společnosti. Toto perfektně zorganizované a úspěšné setkání bylo příležitostí pro světové peptidové



kapacity vyjádřit Karlu Bláhovi (již desátý rok nemohl cestovat do ciziny) podporu a úctu. Jeho postavení se zlepšuje až v osmdesátých letech – v roce 1982 se stává vedoucím oddělení organické chemie na ÚOCHB a později se mu opět otevírá možnost cestovat. Naposledy jsem s ním hovořil na oslavě jeho šedesátin. Byl plný naděje a dalších plánů – vše se zdálo být na dosah a jeho celoživotní neuvěřitelná píle se mohla nyní konečně zúročit na pozicích, kam již dávno patřil. Bohužel, osud mu vyměřil už jen jeden rok.

Doc. Bláha byl jedním z vědců obdařených schopností zaujmout přednáškou a byl proto velmi žádaný o proslovy na nejrůznějších sjezdech a konferencích. V roce 1969 se habilitoval na Lékařské fakultě Univerzity Palackého (u svého přítele profesora Františka Šantavého) a pravidelně potom jezdil do Olomouce přednášet. Že uměl poutavě přednášet o aminokyselinách a peptidech není tedy příliš překvapivé, i když zaujmout naše studenty lékařství čímkoli, co se týká chemie, není zrovna jednoduché. Nicméně ze všech přednášek si nejvíce pamatuji na tu, ke které byl přemluven někdy v sedmdesátých letech na olomoucké Filozofické fakultě. Byla to přednáška v rozsahu dvou vyučovacích hodin, pro studenty češtiny, o českém odborném jazyce: krásná, logická, brilantně podaná, která strhla k nadšenému přijetí jak mne, tak všechny přítomné studentky (studenti v té době na češtině asi neexistovali).

Další oblastí, ve které se projevila erudice Karla Bláhy, byla jeho činnost redaktorská a názvoslovná. Od roku 1957 byl redaktorem *Collection*, od roku 1962 šéfredaktorem až do svého odchodu. Je nepochybně jedním z těch, kteří mají rozhodující zásluhu na minulém i současném renomé tohoto časopisu. Od roku 1963 pracoval jako předseda komise pro nomenklaturu organické chemie Československé společnosti chemické, od roku 1969 jako člen komise pro organickou nomenklaturu IUPAC (dva roky byl místopředsedou této mezinárodní komise). Ve výčtu aktivit nelze zapomenout jeho obětavou práci v Československé společnosti chemické (1978 místopředseda, dále šéfredaktor *Bulletinu*), jmenovitě v tehdejší Pražské pobožce a ve skupině organické chemie, a při pořádání organických a farmaceutických „Liblic“.

Je autorem nebo spoluautorem více než 200 publika-

cí, 70 přehledných referátů a 5 monografií; dále byl jedním z hlavních autorů anglicko-českého a česko-anglického chemického slovníku, vydaného v roce 1988. Rád bych zde jeho monografie připomenul: *Jak psát o chemii* je útlý, krásný text, který vyšel ve dvou vydáních (1974, 1983) a já jej stále doporučuji jako nejlepší základní informaci pro začínající autory i s vědomím toho, že technické zpracování rukopisu je dnes diametrálně odlišné. O to je to četba zajímavější. *Nomenklaturu organické chemie* (spolu s M. Ferlesem a J. Staňkem), která vyšla ve třech vydáních, naposledy v roce 1985, držel v ruce s trochou nadšázky snad každý organický chemik, který působil v poslední třetině minulého století. Představy o tom, co je nezbytným minimem organické chemie, jsou shrnuty v textu *Organická chemie pro fyziky a fyzikální chemiky*, který sloužil hlavně pro postgraduální studenty. V roce 1966 vyšly *Základy stereochemie a konformačního rozboru* (spolu s O. Červinkou a J. Kovářem). Možná jste si všimli pojmu konformační *rozbor*, což je ovšem termín zcela nepoužívaný. Karel Bláha byl totiž vášnivým zastáncem tzv. konzervativního pravopisu. V šedesátých letech u nás panovala kuriozní situace, kdy dvě nakladatelství, vydávající převážnou většinu chemických textů, dodržovala odlišná pravidla. Academia užívala konzervativní pravopis, Státní nakladatelství technické literatury pravopis progresivní, bližší obecné češtině. *Základy stereochemie* měly tu smůlu, že vyšly u SNTL a než by Bláha připustil obálku se slovem *analýza*, tak použil výrazně český výraz *rozbor*. Kniha měla úspěch a brzy byla rozebrána, druhého vydání se však nedočkala, protože Jan Kovář odešel do ciziny.

Později (1971) byla vydána v Anglii v nakladatelství Iliffe. Bláhovým nejobsáhlejším dílem je téměř tisícistránková rešeršní monografie z řady „*Preparativní reakce v organické chemii*“ o organokovových sloučeninách. Na počátku sedmdesátých let ještě připravoval jako hlavní editor velkou příručku o fyzikálních metodách v organické chemii, téměř všechny kapitoly byly napsány, kniha nakonec nevyšla.

Měl jsem to štěstí, že jsem strávil v laboratoři doc. Bláhy necelé čtyři roky (1969–1972), v období kdy centrem jeho zájmu byly sloučeniny s netytickými amidovými (chcete-li peptidovými) vazbami, tzn. s vazbami v *cis*-konfiguraci, a pokud možno ještě navíc vychýlenými z planarity. Dále jsem měl tu čest s ním spolupracovat, i když už jen v omezeném rozsahu a na dálku z Olomouce ještě dalších 14 roků. Nemohu než stále vzpomínat a obdivovat jeho cit pro chemii, schopnost vidět řešení, ochotu vždy komukoli pomoci a přirozenou autoritu, jak u kolegů, kteří byli již sami výraznými osobnostmi, tak u začátečníků, jako jsem byl já. Jeho pracovní nasazení se bohužel nedalo označit jako zdravý životní styl; na ústavu byl od rána do večera bez jakékoli stravy kromě nikotinu a kofeinu a věnoval se tam chemii, doma, v noci se pak věnoval redakčním povinnostem a autorským závazkům.

Karel Bláha vykonal pro československou organickou chemii opravdu hodně. Snad si mohu dovolit říci za ostatní, že pro nás, jeho žáky a spolupracovníky, zůstává vzorem vědce a člověka, jakých není mnoho.

J. Vičar

Výročí a jubilea

Jubilanti v 2. čtvrtletí 2007

80 let

Prof. Ing. Dr. Tech. Jaro Komenda, CSc., (4.4.), PŘF MU Brno

Ing. Josef Sýkora, CSc., (20.4.), Litvínov

Prof. RNDr. Eva Smolková, DrSc., (27.4.), PŘF UK Praha

Prof. Ing. Bohumil Hájek, DrSc., (29.5.), VŠCHT Praha

Prof. Ing. Čestmír Černý, DrSc., (24.6.), VŠCHT Praha

75 let

Doc. Ing. Karel Štamberg, CSc., (3.4.), ČVUT Praha

Ing. Jaromír Kletečka, CSc., (4.4.), Ústav pro hosp. v zemědělství Praha

Ing. Miloslava Márová, (16.4.), ÚSVU Praha

Ing. Jiří Kliment, (19.4.), Fotochema Český Brod

MUDr. Pavel Chýle, CSc., (20.4.), STI potravinářského průmyslu

RNDr. Josef Halbych, CSc., (21.4.), PŘF UK Praha

Doc. Ing. Josef Panchartek, CSc., (14.5.), Univerzita Pardubice

RNDr. Anna Habersbergerová, CSc., (21.5.), ÚJV Řež u Prahy

Ing. Rudolf Mráz, (26.5.), VŠCHT Praha

Ing. Libuše Havlíčková, CSc., (10.6.), VÚOS Pardubice

Doc. Ing. Jiří Vlček, CSc., (24.6.), VŠCHT Praha

70 let

RNDr. Jiří Honzák, CSc., (5.4.), Český hydrometeorologický ústav Praha

RNDr. Jaroslava Medunová, (12.4.), SZŠ Ostrava

Ing. Jaroslav Mládek, (17.4.), OHS Most

Prof. Ing. Milan Kraitr, CSc., (18.4.) ZČU Plzeň

Ing. Pavel Řezníček, (25.4.), Druchema Praha

Prof. Ing. Lubomír Lapčík, DrSc., (6.5.), UTB Zlín

Ing. Karel Mocek, CSc., (6.5.), ÚFCH J. H. AV ČR Praha

Ing. Zdeněk Brož, CSc., (31.5.), ÚCHP Praha

65 let

Ing. Jaroslav Šebesta, (22.4.), Státní veterinární ústav Praha

Ing. Alena Cejnarová, (25.4.), ČKD polovodiče Praha
RNDr. Olga Čechová, CSc., (15.5.), FN Brno
Ing. Marie Matuchová, CSc., (23.5.), ČVUT Praha
Ing. Jaroslav Pata, CSc., (7.6.), VÚ bezpečnosti práce
Praha
Doc. RNDr. Jiří Fišer, CSc., (18.6.), PřF UK Praha
Ing. Josef Materna, (26.6.), MÚ Kralupy nad Vltavou
Ing. Rudolf Smrž, CSc., (28.6.), Synthron CZ Praha

60 let

RNDr. Jiří Bárta, (4.5.), Gymnázium Hlučín
RNDr. Miloš Demjanenko, CSc., (21.6.), Praha

Blahopřejeme

Zemřelí členové Společnosti

Ing. Dr. Tech. Karel Pospíšil, OHS Prostějov, zemřel
v červnu 2006 ve věku 83 let
Ing. Karel Setínek, CSc., ÚCHP AV ČR, zemřel
24. srpna 2006 ve věku 79 let
Prof. RNDr. Ivan Vavruch, DrSc., Ciba-Geigy, zemřel
16. září 2006 ve věku 87 let
Ing. Václav Řeřicha, SKVITR, zemřel 7. října 2006 ve
věku 85 let
Doc. RNDr. Jiří Banýr, CSc., zemřel 27. listopadu 2006
ve věku 71 let

Čest jejich památce



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

Proč se stát členem České společnosti chemické

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

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

Jak se stát členem ČSCH

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

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

Vážení přátelé,

Prosíme o vyplnění následujícího dotazníku, který slouží k aktualizaci členské základny České společnosti chemické.

Prosíme o zaslání na adresu sekretariátu : **Česká společnost chemická, Novotného lávka 5, Praha 1, 116 68.**

Na vyžádání dotazník zašleme v elektronické podobě: **chem.spol@csvts.cz.**

Děkujeme za spolupráci

Jméno, příjmení tituly evidenční číslo.....

Datum narození Pracoviště

Korespondenční adresa PSČ.....

E-mail :

Členství v odborných skupinách ČSCH

Pracuji / mám zájem pracovat v odborné skupině:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> 01 analytická chemie | <input type="checkbox"/> 16 makromolekulární chemie |
| <input type="checkbox"/> 02 anorganická chemie | <input type="checkbox"/> 17 nátěrové hmoty, pryskyřice, pigmenty |
| <input type="checkbox"/> 03 elektrochemie | <input type="checkbox"/> 18 |
| <input type="checkbox"/> 04 organická, bioorg. farmaceut. chemie | <input type="checkbox"/> 19 potravinářská a agrikulturní chemie |
| <input type="checkbox"/> 05 zeolity | <input type="checkbox"/> 20 reologie |
| <input type="checkbox"/> 06 historie chemie | <input type="checkbox"/> 21 toxikologie |
| <input type="checkbox"/> 07 chemická literatura | <input type="checkbox"/> 22 tuky, detergenty, kosmet. chemie |
| <input type="checkbox"/> 08 chemická termodynamika | <input type="checkbox"/> 23 chemické vzdělávání |
| <input type="checkbox"/> 09 fytochemie | <input type="checkbox"/> 24 chemická fyzika |
| <input type="checkbox"/> 10 chemie životního prostředí | <input type="checkbox"/> 25 termická analýza |
| <input type="checkbox"/> 11 chromatografie a elektroforéza | <input type="checkbox"/> 26 fotochemie |
| <input type="checkbox"/> 12 jaderná chemie | <input type="checkbox"/> 27 chemometrie |
| <input type="checkbox"/> 13 katalýza | <input type="checkbox"/> 28 chemie a technologie sacharidů |
| <input type="checkbox"/> 14 | <input type="checkbox"/> 29 analytická toxikologie |
| <input type="checkbox"/> 15 kvasná chemie a biotechnologie | |

Členství v místních pobočkách ČSCH

Pracuji / mám zájem pracovat v místní pobočce:

1. Brno 2. Olomouc 3. Ostrava 4. Pardubice 5. Plzeň 6. Zlín

OBSAH

ÚVODNÍK	1
REFERÁTY	
Krystalizace farmaceutických substancí B. Kratochvíl	3
Hormony a láska L. Stárka	13
Biofarmaceutika (bioléčiva) L. Beneš	18
Bioléčiva – jaký je jejich skutečný potenciál? Z. Chrastilová, M. Macková, J. Šotola a V. Král	25
Amylasy – význam stanovení jejich aktivity L. Zajoncová a M. Šebela	36
Necukerné přírodní látky sladké chuti O. Lapčík, J. Čopíková, M. Uher, J. Moravcová a P. Drašar	44
Využití instrumentálního měření barevnosti ve vývoji a v kontrole jakosti léčiv J. Šubert a J. Čižmárik	55
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Antioxidační aktivita potenciálních anti- hypertenziv s duálním účinkem F. Šeršeň, D. Loss, J. Csöllei, I. Popa, J. Vančo a F. Gregáň	60
Štúdium vybraných extracelulárních a imobili- zovaných aminopeptidáz lastovičníka J. Stano, K. Mičieta, M. Koreňová a V. Blanáriková	65
Mikrokrystalická celulóza v perorálních lékových formách M. Rabišková, A. Häring, K. Minczingerová, M. Havlásek a P. Musilová	70
OPRAVA	77
LIBLICE 2006 – dodatky	79

CONTENTS

EDITORIAL	1
REVIEW ARTICLES	
Crystallization of Pharmaceutical Substances B. Kratochvíl	3
Hormones and Love L. Stárka	13
Biopharmaceuticals L. Beneš	18
Biopharmaceuticals – What Is Their Real Potential? Z. Chrastilová, M. Macková, J. Šotola, and V. Král	25
Amylases – Significance of Determination of their Activity L. Zajoncová and M. Šebela	36
Sweet Non-saccharide Natural Compounds O. Lapčík, J. Čopíková, M. Uher, J. Moravcová, and P. Drašar	44
Application of Instrumental Colour Measure- ment in Development and Quality Control of Drugs J. Šubert and J. Čižmárik	55
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Antioxidative Activity of Potential Anti- hypertensives with Dual Effect F. Šeršeň, D. Loss, J. Csöllei, I. Popa, J. Vančo, and F. Gregáň	60
Study of Selected Extracellular and Immo- bilized Aminopeptidases in Greater Celandine J. Stano, K. Mičieta, M. Koreňová, and V. Blanáriková	65
Microcrystalline Cellulose In Oral Dosage Forms M. Rabišková, A. Häring, K. Minczingerová, M. Havlásek, and P. Musilová	70
ERRATA	77
LIBLICE 2006 – Supplement	79

BULLETIN ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

Chemie jako zdroj inspirace v molekulových vědách R. Zahradník	85
Metody prvkové analýzy využitelné pro RoHS M. Pouzar a T. Černohorský	92
Ze života chemických společností	94
Odborná setkání	99
Zprávy	102
Noví členové ČSCH	105
Chemik na cestách	106
Výuka chemie	107
Diskuse	109
Členská oznámení a služby	110
Osobní zprávy	110
Výročí a jubilea	115

BULLETIN OF THE CZECH CHEMICAL SOCIETIES

Chemistry as a Source of Inspiration in Molecular Sciences R. Zahradník	85
Methods of Elemental Analysis Utilizable in RoHS M. Pouzar and T. Černohorský	92
From the Chemical Societies	94
Meetings and Conferences	99
News	102
New Members	105
Chemist on a Business Trip	106
Education in Chemistry	107
Discussion	109
Member Services and Announcements	110
Personal News	110
Anniversaries and Jubilees	115

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 101 (2007), čís./no. 1 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 131, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 117 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT v Praze, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámotný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/ EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stíbor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, simanek@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2007 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plné předplatné 2007 (12 čísel) 1512 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 756 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2006 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Dáno do tisku 3.1.2007.