

Jak dál...

Je čas vizí, slibů a předsevzetí do 3. tisíciletí nebo alespoň do příštího století. Neodvažuji se předpovědět, jak budou Chemické listy vypadat za 100 let a jestli se vůbec lidstvo dožije 4. milénia. Občas si v úvodníku připomeneme dobu před sto lety a zjišťujeme, že některé věci přetrvávají staletí. Přidržíme se proto podstatně bližšího horizontu a také rekapitulujeme rok právě uplynulý.

Jak jinak do nového roku než s novou, atraktivní obálkou. Grafička naší chrudimské tiskárny nám předložila lákavé návrhy, kterým jsme po menších úpravách neodolali. Posuďte sami. Nepříjemnou novinkou je bohužel zdražení předplatného. Nevedla nás k němu honba za vyšším ziskem, mimochodem Chemické listy nejsou a ani nemohou být ziskové, ale růst ceny papíru a poštovních nákladů. Musíme udržet celý systém financování časopisu v chodu a proto doufám, že naši předplatitelé tento nepopulární krok přijmou s pochopením.

Přirozenou touhou každého šéfredaktora je, aby časopis jemu svěřený byl co nejaktuálnější. Chemické listy se snaží, zejména ve svých bulletinových číslech, publikovat jak aktuální témata chemicko-společenská, tak odborná. Je mnoho aktuálních témat, kterým by Chemické listy měly věnovat pozornost. Některá byla loni zmíněna a než se stačila rozvinout do diskuse, je věc zřejmě uzavřena (chemická část Nové maturity). Jiná vážná témata byla jen letmo připomenuta (populační pokles versus slibovaný nárůst počtu vysokoškoláků) a některá zůstala ležet nezvednuta (odborná prestiž sjezdů našich Spo-

lečností). Jsou však i témata věčná (chemické názvosloví). Odborně jsem v uplynulém roce postrádal referát o dendrimerech nebo o supramolekulární chemii. Nicméně i letos bude z čeho vybírat a myslím, že pan profesor Karel Preis by měl radost. Mrzí mě však, že mnoho zajímavě zpracovaných témat zůstane napsáno pouze pro grantové přihlášky a impaktivní matematika nemotivuje autory k dotažení rukopisu pro Chemické listy.

Co bych si přál do nového roku? Prosím, nastavte daleko více zrcadlo našemu snažení než dosud. Diskusní rubrika živoří a chodbové řeči zůstanou jen na chodbě.

Důležitým organizačním úkolem v letošním roce bude obsazení místa nové výkonné redaktorky za Ing. C. Jirátovou, která odchází do důchodu. Doufám, že budeme mít s kolegy při výběru šťastnou ruku. Předběžný zájem mě přesvědčuje, že bude z čeho vybírat. Práce výkonné redaktorky je totiž pro hladký chod časopisu klíčová.

Závěrem mi dovolu, abych znovu citoval slova našeho zakladatele prof. Preise z roku 1876, protože to jsou ta pravá, která přetrvávají staletí: „Nám podepsaným pak byl svěřen čestný a důležitý úřad redaktorský. Uvazujice se v řízení tohoto časopisu, obracíme se zároveň k Vám kollegové s žádostí důtklivou, by jste nás vydatně a důsledně podporovali u vykonávání úkolu našeho, zajisté dosti nesnadného!“

Bohumil Kratochvíl

Redakce časopisu

**Chemické
listy**

uděluje cenu Karla Preise za rok 2000

Lucii BOŘEK-DOHALSKÉ a Marii STIBOROVÉ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

za práci

***Taxany – protinádorová léčiva
s unikátním mechanismem účinku***

Chem. Listy 94, 226 (2000)

SRDEČNĚ BLAHOPŘEJEME

ODHAD TEPELNÝCH KAPACIT BINÁRNÍCH OXIDŮ V PEVNÉM STAVU

JINDŘICH LEITNER^a, PAVEL CHUCHVALEC^b
a DAVID SEDMIDUBSKÝ^c

^aÚstav inženýrství pevných látek, ^bÚstav fyzikální chemie,
^cÚstav anorganické chemie, Vysoká škola chemicko-techno-
logická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo dne 1.VIII.2000

Klíčová slova: odhad, tepelné kapacity, binární oxidy

Obsah

1. Úvod
2. Tepelná kapacita
3. Popis metod
4. Porovnání jednotlivých metod
5. Příklad použití
6. Závěr

1. Úvod

Materiály na bázi oxidů nacházejí v současné době velice široké uplatnění v řadě aplikací, z nichž některé uvádí následující přehled:

- skla (systém $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--B}_2\text{O}_3\text{--MgO--CaO--PbO--Na}_2\text{O--K}_2\text{O}$, speciální skla pro optiku, optická vlákna),
- konstrukční keramika (systém $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--MgO}$, zirkoničitá keramika, sialon),
- kompozitní materiály (oxidy se užívají jako výztuž v kovové matici nebo jako matrice zpevněná neoxidickými vlákny),
- povlaky a tenké vrstvy (ochranné vrstvy pro součásti plynových turbin – systém $\text{ZrO}_2\text{--Y}_2\text{O}_3\text{--CaO--MgO}$, dielektrické vrstvy v elektronice – SiO_2 , aktivní vrstvy chemických senzorů – ZnO , SnO_2 , Fe_2O_3),
- materiály pro magnetický záznam ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, CrO_2 , směsné ferrity ($\text{Zn,Mn,CuFe}_2\text{O}_4$),
- konstrukční prvky palivových článků ($(\text{La,Sr})\text{MnO}_3$, $\text{Y}_2\text{O}_3\text{--ZrO}_2$),
- vysokoteplotní supravodiče (YBaCuO , BiSrCaCuO , HgBaCaCuO).

Při podrobném studiu procesů přípravy a zpracování těchto materiálů je často užívána termodynamika jako nástroj k hlubšímu pochopení vztahů mezi podmínkami procesu, složením a strukturou daného materiálu a jeho užitnými vlastnostmi. Aby bylo možné požadované rovnovážné výpočty

provádět, jsou pro každou z uvažovaných látek nezbytná vstupní termodynamická data – obvykle hodnoty slučovacího tepla a molární entropie při teplotě 298,15 K a koeficienty teplotní závislosti izobarické molární tepelné kapacity nebo přímo koeficienty teplotní závislosti molární Gibbsovy energie. Pro řadu pevných oxidů jsou tato data tabelována v širokém oboru teplot např.^{1–8} nebo dostupná v počítačových databázích. K dispozici jsou rovněž obsáhlé datové soubory pro silikáty a jiné oxidické přírodní minerály např.^{9–15}

Molární tepelné kapacity jsou jednou ze základních termodynamických funkcí pevných látek. Pro jejich stanovení se užívají různé kalorimetrické metody a v současné době je lze měřit od velmi nízkých teplot (cca 10^{-1} K) do teploty tání. Pro většinu binárních oxidů byla kalorimetrická měření tepelných kapacit prováděna a získané údaje jsou běžně dostupné v literatuře. V některých případech však experimentální data dosud chybí. Pro získání chybějících dat anorganických sloučenin v pevném stavu byla navržena celá řada empirických metod jejich odhadu. Řada těchto metod je popsána v přehledných pracích např.^{6,16,17}

Cílem předložené práce je shrnutí dosud navržených metod, které lze užít pro odhad molárních tepelných kapacit oxidů v pevném stavu, ověření jejich věrohodnosti a posouzení spolehlivosti takto získaných údajů při rovnovážných výpočtech v oxidických systémech. V práci jsou diskutovány metody použitelné pro odhad termodynamických vlastností jednoduchých (binárních) oxidů. Ačkoliv byly pro téměř všechny tyto oxidy věrohodné experimentální hodnoty termodynamických funkcí publikovány, je porovnání a posouzení jednotlivých metod významné s ohledem na skutečnost, že některé z nich byly později rozšířeny i pro oxidy směsné*.

2. Tepelná kapacita

Tepelná kapacita C je obecně definována vztahem

$$C = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} \frac{Q}{\Delta T} \quad (1)$$

kde Q je teplo potřebné k ohřátí homogenního systému o infinitesimální přírůstek teploty dT . Jelikož množství dodaného tepla závisí na cestě (tedy na podmínkách, za jakých k ohřátí dochází) je nutné v definici tepelných kapacit tyto podmínky jednoznačně specifikovat. Prakticky významné jsou tepelné kapacity za stálého tlaku C_p a stálého objemu C_v definované vztahy

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad (2)$$

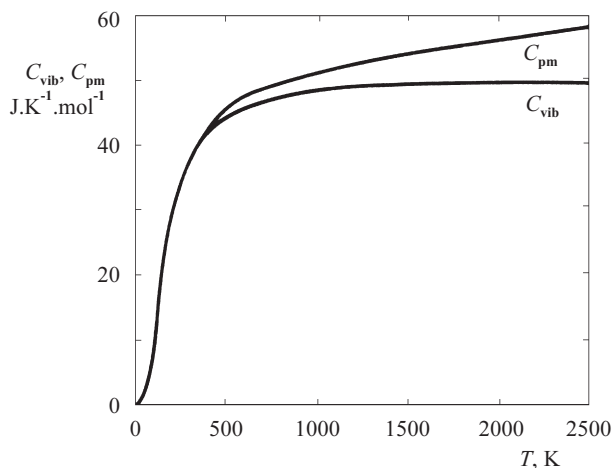
* Pod pojmem směsný oxid zde rozumíme jak ternární a vyšší sloučeniny kyslíku s dvěma či více různými kationty a anionty O^{2-} (např. podvojně oxidy se strukturou spinelu nebo perovskitu), tak i takové sloučeniny, v jejichž struktuře lze rozlišit komplexní anion tvořený atomy kyslíku a elektronegativnějšího prvku, které lze považovat za soli kyslíkatých kyselin (např. chromany a wolframany) a to i v případě, že tyto anionty vytvářejí řetězce, rovinnou síť či prostorový skelet (např. křemičitany).

$$C_v = \left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_v \quad (3)$$

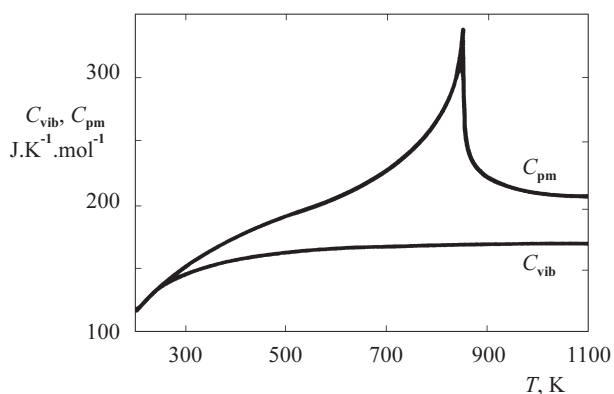
kde H resp. U je entalpie resp. vnitřní energie uvažovaného homogenního systému. Izobarické tepelné kapacity pevných látek lze vyjádřit jako sumu příspěvků

$$C_p = C_{\text{vib}} + C_{\text{dil}} + C_{\text{el}} + C_{\text{mg}} \quad (4)$$

Vibrační příspěvek C_{vib} je projevem tepelných kmitů krystalové mřížky a teoreticky jej lze vyjádřit na základě Einsteinova nebo Debyeova modelu krystalu¹⁸. Příspěvek C_{dil} je úměrný té části přijatého tepla, které je při izobarické expanzi krystalové mřížky přeměněno na objemovou práci. Příspěvek volných elektronů C_{el} se projevuje pouze u kovů a příspěvek C_{mg} u látek, u kterých dochází při zahřívání ke změně magnetického uspořádání – z feromagnetického nebo antiferomagnetického na paramagnetické (z binárních oxidů to jsou např. CoO, CuO, Fe₂O₃, MnO nebo NiO). Do magnetického příspěvku k C_p lze zahrnout i tepelné excitace uspořádané mříže spinů (magnony) s charakteristickou nízkoteplotní závislostí $T^{3/2}$



Obr. 1. Teplotní závislost vibračního příspěvku C_{vib} vypočtená z Debyeova modelu a experimentálně získané standardní molární tepelné kapacity C_{pm}^0 pro pevný MgO (cit.¹⁹)



Obr. 2. Teplotní závislost vibračního příspěvku C_{vib} vypočtená z Debyeova modelu a experimentálně získané standardní molární tepelné kapacity C_{pm}^0 pro pevný Fe₃O₄ (cit.²⁰)

a T^3 pro feromagnetické respektive antiferomagnetické uspořádání.

Teplotní závislost C_p lze kvalitativně odvodit z teplotní závislosti jednotlivých příspěvků. V rámci Einsteinova i Debyeova modelu krystalu je C_{vib} monotónně rostoucí funkcí teploty s limitou $3R$ pro $T \rightarrow \infty$ (vztaženo na 1 mol atomů). Rovněž příspěvek $C_{\text{dil}} = TV\alpha^2/\beta$ (α je koeficient objemové teplotní roztažnosti a β je koeficient stlačitelnosti) je rostoucí funkcí teploty, a tak u nekovů beze změny magnetického uspořádání je C_p monotónně rostoucí funkcí teploty. Na obr. 1 je pro ilustraci znázorněn průběh teplotní závislosti C_{vib} vypočtené z Debyeova modelu a experimentálně získané C_p pro pevný MgO (cit.¹⁹). Teplotní závislost magnetického příspěvku vykazuje maximum při Curieově teplotě T_C resp. Néelově teplotě T_N , které se projevuje i na teplotní závislosti C_p . Teplotní závislost molární tepelné kapacity Fe₃O₄, u kterého dochází při $T_C = 848$ K (cit.²⁰) ke změně magnetického uspořádání je znázorněna na obr. 2.

3. Popis metod

Pro odhad tepelných kapacit binárních oxidů v pevném stavu se užívají empirické příspěvkové metody, v rámci kterých je požadovaná termodynamická funkce (standardní molární tepelná kapacita při teplotě 298,15 K, $C_{\text{pm}}^0(298,15 \text{ K})$, resp. konstanty teplotní závislosti $C_{\text{pm}}^0(T)$) počítána jako suma příspěvků jednotlivých atomů nebo iontů. Hodnoty příspěvků bývají vyhodnocovány optimalizačním postupem (metodou nejmenších čtverců) z experimentálních údajů pro různé soubory látek.

První příspěvkovou metodu pro odhad tepelných kapacit navrhl Kellogg²¹. Na základě dostupných experimentálních hodnot $C_{\text{pm}}^0(298,15 \text{ K})$, pro sloučeniny s převážně iontovou vazbou vyhodnotil příspěvky pro jednotlivé kationty a anionty (jedno- i víceatomové). Hodnoty kationtových příspěvků nezávisely na jejich valenci, avšak hodnoty aniontových příspěvků závisely na valenci kationtu v dané sloučenině. Výsledná hodnota $C_{\text{pm}}^0(298,15 \text{ K})$ pro pevný oxid A_mO_n je pak dána rovnicí

$$C_{\text{pm}}^0 = m.C(A) + n.C(O^{2-}) \quad (5)$$

Kubaschewski a Ünal²² na základě většího souboru dat (cca 250 látek) aktualizovali příspěvky kationtů 49 prvků a pro příspěvky aniontů stanovili jednu průměrnou hodnotu nezávislou na mocenství kationtu. Hodnota příspěvku k $C_{\text{pm}}^0(298,15 \text{ K})$ pro anion O^{2-} je $C(O^{2-}) = 18,41 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$, hodnoty příspěvků kationtů jsou uvedeny v tabulce I. Stejně jako v případě původních Kelloggových kationtových příspěvků nezávisí tyto hodnoty na náboji kationtů a lze je tedy chápat spíše jako příspěvky atomární.

Tito autoři dále navrhli metodu pro odhad konstant jednoduché teplotní závislosti molárních tepelných kapacit ve tvaru

$$C_{\text{pm}}^0 = A + B.T + C/T^2 \quad (6)$$

Pro odhad konstant A a B je užitá hodnota $C_{\text{pm}}^0(298,15 \text{ K})$ a teplota tání T_m příslušné sloučeniny, hodnota konstanty $C = -4,2 \text{ J.K}^{-1}.\text{g}.\text{at}^{-1}$ je zobecněná. Popsaný postup lze užít pouze pro látky jejichž T_m je menší než cca 2300 K.

Tabulka I

Vybrané hodnoty iontových/atomárních příspěvků pro odhad C_{pm}^0 (298,15 K) pevných látek (kompletní seznam je k dispozici v plné verzi článku na webové stránce časopisu Chemické listy)

Kation	Příspěvky k C_{pm}^0 [$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$] při $T = 298$ K				
	[77KUB] [98SPE]	[87KUM] [95MOI]	[89HUA]	[92HUR]	[96GOL]
Ag ²⁺	25,73	28,60	28,60	26,63	23,64
Al ³⁺	19,66	17,60	18,68	18,07	4,32
As ³⁺	25,10	26,70	27,00	26,63	13,49
As ⁵⁺	25,10			26,63	4,54
Au ⁺			26,76	26,63	
B ³⁺		6,10	5,11	10,10	-5,14
Ba ²⁺	26,36	28,40	31,83	32,37	23,25
Be ²⁺	9,62	12,60	12,93	12,47	2,05
Bi ³⁺	26,78	29,00	28,40	26,63	19,76
Ca ²⁺	24,69	27,30	29,13	28,25	18,04
Cd ²⁺	23,01	28,00	31,38	26,63	21,77
Ce ²⁺	23,43	27,60		26,63	
Ce ³⁺	23,43	31,40	31,80	26,63	19,89
Ce ⁴⁺	23,43	28,20		26,63	15,57
Cm ³⁺				26,63	-1,60
Co ²⁺	28,03	31,30	34,18	25,71	24,95
Co ³⁺	28,03	12,40		25,71	19,53
Cr ²⁺	23,01	21,00		26,63	16,01
Cr ³⁺	23,01	29,10	39,02	26,63	17,42
Cr ⁴⁺	23,01	21,80		26,63	
Cr ⁶⁺	23,01			26,63	4,49

Obdobnou metodu pro odhad hodnot C_{pm}^0 (298,15 K) navrhl Kumok²³. I v tomto případě jsou molární tepelné kapacity pevných oxidů odhadovány pomocí rovnice (5), avšak hodnoty příspěvků kationtů závisí na jejich mocnostech. Příspěvky pro 108 jednoatomových kationtů odvozených od 68 prvků jsou shrnuty v tabulce I. Kumokova hodnota příspěvku pro anion O^{2-} je $C(\text{O}^{2-}) = 16,7 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Určitou modifikaci jednoduché příspěvkové metody (5) navrhli Huang a Xu²⁴. Výsledná hodnota C_{pm}^0 (298,15 K) je dána součtem dvou příspěvků – iontového, který se počítá aditivně z iontových příspěvků kationtu a aniontu a příspěvku, který relativním způsobem vyjadřuje míru „kovalence“ vazby v dané sloučenině. Pro výpočet C_{pm}^0 (298,15 K) pevného oxidu o stechiometrii A_mO_n tak platí

$$C_{\text{pm}}^0 = m \cdot C(\text{A}^{2nm}) + n \cdot C(\text{O}^{2-}) + \mathbf{R} \frac{(n+m) \cdot Z}{8d} (3,19 - \Delta X) \quad (7)$$

V této rovnici je \mathbf{R} univerzální plynová konstanta, Z je náboj kationtu, d je hlavní kvantové číslo valenčních elektronů kationtu a ΔX je rozdíl Paulingových elektronegativit atomu který tvoří kation a kyslíku ($X_{\text{O}} = 3,44$, cit.²⁵). Hodnota 3,19 v třetím členu rovnice (7) odpovídá maximálnímu rozdílu elektronegativit v Paulingově škále pro sloučeninu CsF, která byla zvolena jako referenční látka se 100 % iontovou vazbou. Iontové příspěvky byly vyhodnoceny z publikovaných hodnot

C_{pm}^0 (298,15 K) pro 126 sloučenin převzatých z tabulek JANAF (cit.²⁶). Příspěvek pro anion O^{2-} je $C(\text{O}^{2-}) = 12,65 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$. Hodnoty příspěvků pro 78 kationtů odvozených od 63 prvků jsou uvedeny v tabulce I. Průměrná chyba odhadnutých hodnot C_{pm}^0 (298,15 K) celého souboru 126 binárních sloučenin, které byly užity pro vyhodnocení iontových příspěvků je $1,79 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$. V souboru 32 jednoduchých oxidů je průměrná chyba $1,55 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Poněkud obecnější příspěvkovou metodu pro odhad tepelných kapacit pevných látek navrhli Hurst a Harrison²⁷. Na základě této varianty jsou hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) počítány aditivně z atomárních příspěvků, které byly získány regresní analýzou publikovaných dat celkem pro 721 anorganických i organických sloučenin. Tímto způsobem byly stanoveny příspěvky pro 32 prvků. Pro kyslík byla získána hodnota $C(\text{O}) = 13,42 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, atomární příspěvky dalších prvků, které tvoří pevné oxidy jsou uvedeny v tabulce I. Pro další prvky, jejichž specifické příspěvky nebyly vyhodnoceny, autoři užívají generalizovanou hodnotu $26,63 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$. Průměrná relativní chyba odhadu C_{pm}^0 (298,15 K) celého souboru 721 látek je 9,6 %, pro soubor 426 anorganických látek je 9,4 %.

Pro odhad koeficientů teplotní závislosti C_{pm}^0 ve tvaru

$$C_{\text{pm}}^0 = A + B \cdot T + C/T^2 + D \cdot T^2 \quad (8)$$

navrhli Golam Mostafa a spol.²⁸ metodu, na základě které jsou parametry rovnice (8) počítány aditivně jako suma příspěvků jednotlivých iontů. Z publikovaných údajů pro 664 anorganických sloučenin většinou převzatých z tabulek⁵ byly regresní analýzou získány příspěvky pro 129 kationtů a 17 aniontů. Příspěvek pro anion O^{2-} při teplotě 298,15 K je $C(\text{O}^{2-}) = 22,98 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$. Hodnoty kationtových příspěvků pro 298,15 K jsou uvedeny v tabulce I. Průměrná chyba odhadnuté hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) je 3,18 %, maximální odchylka je 13,63 %. Průměrná chyba odhadnutých hodnot se s rostoucí teplotou zvyšuje.

4. Porovnání jednotlivých metod

Zcela korektní kvantitativní porovnání výše popsaných metod pro odhad molárních tepelných kapacit pevných oxidů není možné. Hodnoty iontových resp. atomárních příspěvků byly vyhodnoceny pro různé soubory experimentálních dat, lišící se v počtu zahrnutých látek, jejich chemickou podstatou (anorganické sloučeniny s převážně iontovou nebo převážně kovalentní vazbou, organické sloučeniny) i ve vlastních hodnotách C_{pm}^0 (298,15 K). Proto je třeba vedle orientačního kvantitativního porovnání na základě průměrné chyby resp. střední kvadratické odchylky rovněž uvážit obecnost metody a možnost predikce teplotní závislosti C_{pm}^0 .

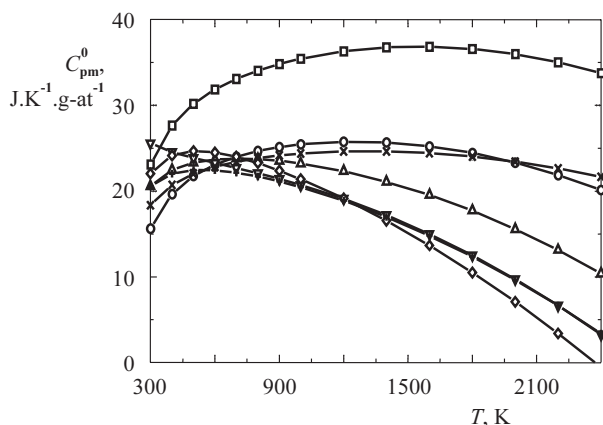
Z hlediska obecnosti jsou výhodnější metody založené na atomárních příspěvcích, neboť takové lze jednoduše užít i v případě oxidů jejichž kation má formálně neceločíselné mocenství jako např. $\text{Pr}_{12}\text{O}_{22}$, Tb_7O_{12} , Ti_4O_7 , V_3O_5 nebo $\text{WO}_{2,72}$. V případě oxidu V_3O_5 přísluší 3 atomům vanadu formální mocenství 10+. To lze vytvořit různými kombinacemi iontů: $\text{V}^{2+}\text{-V}^{3+}\text{-V}^{5+}$ nebo $\text{V}^{2+}\text{-V}^{4+}\text{-V}^{4+}$ nebo $\text{V}^{3+}\text{-V}^{3+}\text{-V}^{4+}$, které vedou k různým výsledným hodnotám C_{pm}^0 (298,15 K): 153,72 resp. 162,18 resp. 160,97 $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ při užití příspěvků podle²⁸.

S atomárními příspěvky pracuje metoda Kellogga-Kuba-

Tabulka II

Relativní odchylky odhadnutých hodnot C_{pm}^0 (298,15 K) vybraných oxidů (kompletní seznam je k dispozici na webovské stránce Chemických listů)

Oxid	C_{pm}^0 (298 K) [J.K ⁻¹ .mol ⁻¹]	Rel. chyba C_{pm}^0 (298 K) [%]				
		[77KUB] [98SPE]	[87KUM] [95MOI]	[89HUA]	[92HUR]	[96GOL]
Ag ₂ O	66,32	-5,4	-11,4	-6,9	-0,5	-6,0
Al ₂ O ₃	79,01	-19,7	-8,0	-4,3	3,3	1,8
As ₂ O ₃	96,98	-8,7	-6,7	-2,6	3,6	1,1
As ₂ O ₅	116,56	-22,0			-3,3	-6,4
Au ₂ O ₃	114,02				18,0	
B ₂ O ₃	62,98		1,1	1,4	4,0	6,9
BaO	47,06	4,9	4,2	4,5	2,7	1,8
BeO	24,98	-12,2	-17,3	-13,4	-3,6	-0,2
Bi ₂ O ₃	112,13	3,0	3,6	11,4	16,6	3,3
CaO	42,42	-1,6	-3,7	-0,3	1,8	3,3
CdO	44,16	6,2	-1,2	-2,4	9,3	-1,3
Ce ₂ O ₃	117,05	12,8	3,5	11,3	20,1	7,1
CeO ₂	61,53	0,4	-0,1		13,1	0,0
Co ₃ O ₄	123,42	-27,8	0,4		-6,0	-26,3
CoO	55,22	15,9	13,1	12,1	29,1	13,2
Cr ₂ O ₃	114,26	11,4	5,2	-6,3	18,2	9,2
Cr ₃ O ₄	135,64	-5,2	-7,6		1,5	-5,3
CrO ₃	79,12	1,1			15,5	7,2



Obr. 3. Teplotní závislosti C_{pm}^0 pro vybrané oxidy predikované na základě metody navržené Golamem Mostafou²⁸, \square O₂, \circ Al₂O₃, Δ CaO, ∇ Er₂O₃, \diamond PuO₂, \times ThO₂, \times MgO

schewského (dále KK) a metoda Hursta-Harrisona (dále HH). Metoda HH nabízí individuální příspěvky pouze pro 24 prvků, které vytvářejí pevné oxidy. Zobecněný příspěvek pro ostatní prvky vede např. pro oxidy typu A₂O₃ k hodnotě C_{pm}^0 (298,15 K) = 93,52 J.K⁻¹.mol⁻¹. Experimentální hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) sesquioxidů 14 prvků vzácných zemin (mimo Pm) leží v rozmezí 102–117 J.K⁻¹.mol⁻¹ a průměrná chyba podhodnoceného odhadu je 17,4 %. V případě metody KK byly vyhodnoceny individuální příspěvky pro La, Ce, Pr, Nd, Sm, Gd a Ho a průměrná chyba rovněž ve všech případech podhodnoceného odhadu je zhruba poloviční, 8,1 %.

Odhad koeficientů teplotní závislosti C_{pm}^0 umožňuje me-

toda KK a rovněž postup navržený Golamem Mostafou (dále GM). Zcela zásadním problémem metody GM je však to, že teplotní závislost příspěvku $C(O^{2-})$ vykazuje při teplotě cca 1547 K maximum a dále je klesající. Tento fyzikálně nereálný průběh je pak zachován i pro závislost $C_{\text{pm}}^0(T)$ řady oxidů a v některých případech (viz obr. 3), kdy byly rovněž pro příslušné kationty vyhodnoceny záporné příspěvky ke konstantě D (viz rovnici (8)), je maximum posunuto do oblasti nižších teplot. Dalším nedostatkem GM metody je skutečnost, že v hlavním zdroji vstupních dat⁵ nejsou v některých případech uváděny experimentálně získané hodnoty parametrů rovnice (8), ale hodnoty již dříve odhadnuté. Jedná se např. o data pro oxidy PrO₂, TbO₂, TcO₂ a TcO₃, které byly užity k vyhodnocení příspěvků pro kationty Pr⁴⁺, Tb⁴⁺, Tc⁴⁺ a Tc⁶⁺.

Pro orientační kvantitativní porovnání byly pomocí výše uvedených metod na základě příspěvků uvedených v tabulce I odhadnuty hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) pro 111 oxidů 67 prvků. V případě oxidů typu A₃O₄ (A = Co, Cr, Fe nebo Mn) byly kationtové příspěvky vypočteny jako vážený průměr z hodnot pro A²⁺ a A³⁺. V ostatních případech neceločíselného mocenství kationtu nebyl odhad na základě iontových příspěvků^{23,24,28} prováděn. Získané hodnoty byly porovnány s údaji publikovanými. Ve všech případech se jedná o hodnoty experimentální, buď kalorimetrické nebo získané simultánním zpracováním termochemických a rovnovážných údajů. Tato data byla ve většině případů převzata z tabulek⁵. Některé oxidy v této sbírce nejsou zahrnuty, a tak příslušné hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) pocházejí z jiných zdrojů: Pu₂O₃ (cit.²⁹), Er₂O₃ (cit.³⁰). V některých případech byla užita nověji publikovaná data: Al₂O₃ (cit.³¹), BaO, SrO (cit.³²), Bi₂O₃ (cit.³³), CaO (cit.³⁴), Cu₂O, CuO (cit.³⁵), In₂O₃ (cit.³⁶). V několika dalších případech byla tabelovaná data⁵ potvrzena novějšími kalori-

metrickými údaji: Ce_2O_3 (cit.³⁷), Fe_3O_4 (cit.³⁸), FeO (cit.³⁹), MnO (cit.⁴⁰), Y_2O_3 (cit.⁴¹), ZrO_2 (cit.⁴²). Vypočtené relativní odchylky jsou uvedeny v tabulce II.

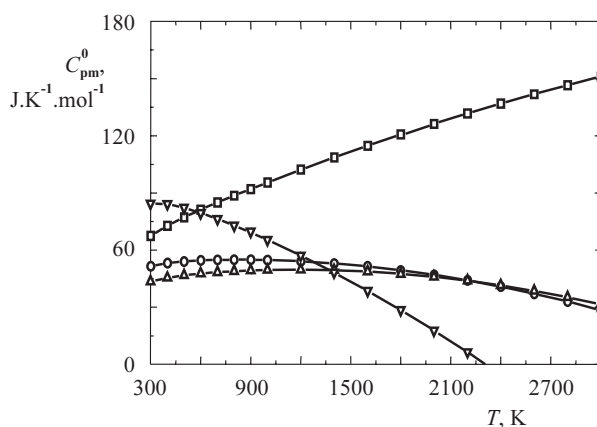
Z porovnání plyne, že nejobecnější je metoda HH, která umožňuje odhad hodnot C_{pm}^0 (298,15 K) pro všech 111 oxidů z testovacího souboru. Tato obecnost je ale, jak by se dalo i očekávat, vyvážena nehorší shodou s údaji experimentálními – průměrná chyba činí 9,06 %. Podrobnější analýza získaných údajů ukázala, že špatná shoda je důsledkem dvou faktorů – mnoha zobecněných hodnot příspěvků oxidotvorných prvků a použité hodnoty atomárního příspěvku pro kyslík. Hodnota $C(\text{O})$ byla optimalizována na základě dat jak pro anorganické, tak organické sloučeniny. Použijeme-li pro odhad C_{pm}^0 (298,15 K) pevných oxidů modifikovanou hodnotu $C(\text{O}) = 15,3 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$, sníží se průměrná chyba na 7,26 %.

Podle obecnosti použití (počtu odhadnutých dat) je jako druhá metoda GM (92 oxidů), která vykazuje nejlepší shodu s experimentálními daty – průměrná chyba 4,27 %. Při hodnocení tohoto výsledku je však nezbytné zohlednit skutečnost, že v několika případech byly iontové příspěvky v rámci GM metody vyhodnoceny z jediného údaje, a to z hodnoty C_{pm}^0 pro daný oxid. Jedná se o příspěvky pro čtyřmocné ionty Ce^{4+} , Ir^{4+} , Pb^{4+} , Re^{4+} , Ru^{4+} a Sn^{4+} stanovené z dat pro oxidy AO_2 . Nulové odchylky odhadnutých a tabelovaných hodnot tak snižují výslednou průměrnou odchylku této metody. Přepočtená průměrná chyba pro 86 odhadnutých hodnot je 4,57 %. Rovněž je nutné vzít v úvahu to, že GM metoda poskytuje pro kationty B^{3+} , P^{5+} , Pu^{6+} , Se^{6+} a Si^{4+} při teplotě 298,15 K záporné příspěvky, což postrádá jakoukoli fyzikální interpretaci.

Z posuzovaných metod je nejméně obecnou procedura navržená Huangem a Xu²⁴ (dále HX). Vyhodnocené kationtové příspěvky umožňují odhad pouze 71 oxidů při průměrné relativní chybě 5,22 %. V této souvislosti se zdá diskutabilní přínos složitějšího odhadového postupu (rovnice (7), kdy zahrnutí korekce na stupeň kovalence vazby nepřináší očekávané zpřesnění.

Na základě provedeného rozboru lze konstatovat, že pro odhad hodnot C_{pm}^0 (298,15 K) oxidů v pevném stavu je v současné době nejvhodnější příspěvková metoda navržená Golamem Mostafou²⁸, která je dosti obecná i dostatečně přesná. Velmi problematické je však její použití pro predikci teplotní závislosti $C_{\text{pm}}^0(T)$. Její omezení v obecnosti nespočívá s tím, že je vybudována na iontových příspěvcích, a tedy v případě oxidů s neceločíselným průměrným nábojem kationtu, např. u některých oxidů v systému Pr–O, Tb–O, Ti–O, V–O, U–O aj., je nepoužitelná. V případech, kdy v rámci metody GM nebyl příspěvek kationtu stanoven, je možné tento příspěvek určit z experimentální hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) jiné sloučeniny (nejlépe izostrukturální) popř. i více sloučenin obsahující daný kation a z příspěvku příslušného aniontu. Tento postup je však omezen relativně malým počtem aniontů (celkem 17), pro které byly příspěvky vyhodnoceny, přičemž chybí data např. pro chalcogenidové anionty S^{2-} , Se^{2-} a Te^{2-} . (Pro srovnání: v rámci metody KK bylo stanoveno celkem 41 příspěvků pro jedno i víceatomové anionty, Kumokova metoda poskytuje příspěvky pro 133 aniontů!)

Dále je třeba poznamenat, že všechny zde uvedené metody poskytují pro daný oxid o určité stechiometrii jednu hodnotu C_{pm}^0 (298,15 K) – není tedy možné rozlišovat mezi různými strukturálními modifikacemi. Z porovnání kalorimetricky získaných hodnot C_{pm}^0 (298,15 K) pro stabilní a metastabilní



Obr. 4. Teplotní závislosti C_{pm}^0 pro vybrané oxidy predikované na základě metody navržené Golamem Mostafou²⁸, \square In_2O , \circ SmO , \triangle YbO , ∇ PtO_2

modifikace různých oxidů (např. As_2O_3 , Eu_2O_3 , Gd_2O_2 , SiO_2 nebo TiO_2) však plyne, že jejich rozdíl je ve všech případech menší než průměrná chyba odhadových metod, a tak lze predikovanou hodnotu užít pro všechny strukturální modifikace uvažovaného oxidu.

5. Příklad použití

Popsané metody byly užity pro odhad hodnot C_{pm}^0 (298,15 K) pevných oxidů In_2O , NdO , SmO , YbO , PdO_2 , PtO_2 , a RhO_2 , pro které experimentální údaje dosud chybí. Výsledky jsou shrnuty v tabulce III, kde jsou rovněž uvedeny (v závorce) hodnoty získané na základě nově vyhodnocených příspěvků a dále hodnoty doporučené. Pro oxidy In_2O , SmO , YbO , a PtO_2 byly dále na základě metody GM odhadnuty konstanty teplotní závislosti $C_{\text{pm}}^0(T)$ podle rovnice (8). Získané závislosti jsou vyneseny na obr. 4.

Pro In_2O jsou hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) získané na základě různých příspěvků blízké. V rámci GM metody byl příspěvek pro kation In^+ získán z dat pro InCl , InBr a InI uvedených v tabulkách⁵. Experimentální údaje jsou však pouze pro InCl , pro další látky jsou zde uvedeny hodnoty odhadnuté. Průběh teplotní závislosti $C_{\text{pm}}^0(T)$ je pro In_2O akceptovatelný. V případě NdO je k dispozici příspěvek pouze v rámci metody KK. Z dostupných experimentálních dat – hodnot C_{pm}^0 (298,15 K) pro pevné NdS a NdTe (cit.⁵) a Kumokových hodnot příspěvků pro anionty S^{2-} a Te^{2-} byl vypočten příspěvek $C(\text{Nd}^{2+}) = 26,24 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$. Z něj určená hodnota C_{pm}^0 (NdO , s, 298,15 K) = $42,94 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ je v dobré shodě s výsledkem odhadu pomocí metody KK. Odhaduté hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) pro SmO se významně liší. V rámci GM metody byl příspěvek pro kation Sm^{2+} získán z dat pro tepelnou kapacitu SmCl_2 (cit.⁵), která však byla odhadnuta. Získaná teplotní závislost, která prochází v oblasti teplot 700–900 K nevýrazným maximem a dále je klesající, je nereálná. Obdobná situace je pro YbO . Hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) získané na základě Kumokovy a GM metody se příliš neliší, avšak teplotní závislost $C_{\text{pm}}^0(T)$ je z výše uvedených důvodů nepřijatelná. Při odhadu C_{pm}^0 (298,15 K) pro PtO_2 byly užity všechny metody. Příspěvek $C(\text{Pt}) = 18,99 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ v rámci metody KK byl získán z experimentálních

Tabulka III

Odhadnuté hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K)

Oxid	C_{pm}^0 (298 K) [J.K ⁻¹ .mol ⁻¹]					Doporučené hodnoty
	[77KUB] [98SPE]	[87KUM] [95MOI]	[89HUA]	[92HUR]	[96GOL]	
In ₂ O	66,95	64,1	–	66,68	67,35	67,3
NdO	42,68	(42,94)	–	40,05	–	42,8
SmO	43,51	52,4	–	40,05	51,5	51,5
YbO	–	45,7	–	40,05	43,33	43,3
PdO ₂	(56,39)	(58,25)	–	53,47	–	57,3
PtO ₂	(55,81)	57,6	73,02	53,47	84,35	56,7
RhO ₂	–	–	–	53,47	–	55

hodnot⁴³ pro PtS₂ a PtTe₂ a příslušných aniontových příspěvků. Získané hodnoty se významně liší a rovněž teplotní závislost podle GM metody je nereálná. Příspěvky pro kation Pt⁴⁺ v rámci GM metody byly získány z odhadnutých údajů⁵ pro PtCl₄ a PtBr₄. Z experimentálních hodnot C_{pm}^0 (298,15 K) pro PdS₂ (cit.⁵) a PdTe₂ (cit.⁴³) a příslušných aniontových příspěvků byly vypočteny příspěvky $C(\text{Pd}) = 19,57 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ (metoda KK) a $24,85 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ (Kumokova metoda). Tyto hodnoty byly užity pro odhad C_{pm}^0 (298,15 K) pro PdO₂. Získané hodnoty jsou v dobré shodě (rozdíl je cca 3,2 % vztaheno k jejich průměru).

Pro odhad C_{pm}^0 (298,15 K) všech uvažovaných oxidů byla užita rovněž metoda HH. Jelikož v rámci této metody jsou pro všechny prvky užívány generalizované hodnoty příspěvku, dostáváme pro oxidy typu AO a AO₂ stejné hodnoty molárních tepelných kapacit, které se více či méně liší od hodnot získaných na základě individuálních příspěvků jednotlivých atomů resp. kationtů.

Získané hodnoty tepelných kapacit lze užít při různých termodynamických výpočtech a následující příklad dokumentuje vliv chyby odhadnuté hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) na vypočtené výsledky. Uvažujme rozklad pevného oxidu AO₂ (A = Pd, Pt, Rh a Ru), který probíhá podle rovnice



a odhadněme maximální chybu standardní reakční entalpie ΔH_r^0 , standardní reakční entropie ΔS_r^0 a rozkladného tlaku $p(\text{O}_2)$ při teplotě 1000 K. Při odhadu chyby budeme předpokládat, že změna tepelné kapacity ΔC_{pr}^0 uvedené reakce na teplotě nezávisí a při výpočtu užijeme hodnotu ΔC_{pr}^0 (298,15 K). Relativní chybu odhadnuté hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) oxidů uvažujme 10 %, což ve všech případech odpovídá absolutní chybě cca $5,6 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$. Odhadnuté maximální chyby reakční entalpie a entropie jsou: $\delta(\Delta H_r^0) = 3,9 \text{ kJ}$ a $\delta(\Delta S_r^0) = 6,8 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$. Pro RuO₂ jsou k dispozici z experimentálních dat získané hodnoty ΔH_r^0 (298,15 K) = $-305,0 \text{ kJ}$ a ΔS_r^0 (298,15 K) = $175,5 \text{ J.K}^{-1}$, a lze tedy posoudit relativní význam chyby tepelné kapacity, který s rostoucí teplotou roste. V případě reakční entalpie se jedná o relativní chybu cca 1,2 %, což je srovnatelné s chybou kalorimetricky stanoveného slučovacího tepla oxidu při teplotě 298,15 K a tedy hodnoty ΔH_r^0 (298,15 K). Chyba reakční entropie cca 3,9 % však několikanásobně pře-

vyšuje obvyklou chybu kalorimetrických hodnot molárních entropií, ze kterých je hodnota ΔS_r^0 (298,15 K) počítána.

Při stanovení chyby standardní reakční Gibbsovy energie, a tedy rozkladného tlaku $p(\text{O}_2)$ se chyby entalpie a entropie částečně kompenzují. Při teplotě 1000 K tak chyba $\delta(C_p^0) = 5,6 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ vede k relativní chybě $\delta(p(\text{O}_2)) = 0,4 \%$, což je prakticky zanedbatelné.

6. Závěr

Z podrobného rozboru a posouzení různých metod, které lze užít pro odhad tepelných kapacit jednoduchých oxidů vyplývá, že v současné době je možné získat odhadem hodnoty C_{pm}^0 (298,15 K) s průměrnou chybou cca 5 až 10 %. Tato chyba nemusí být při rovnovážných výpočtech příliš významná s ohledem na její částečnou kompenzaci v entalpickém a entropickém příspěvku ke Gibbsově energii.

Empirická predikce tepelných kapacit při vyšších teplotách není příliš spolehlivá a věrohodná. Tento nedostatek překonávají některé semiempirické výpočetní metody, např. postup navržený Inabou¹⁹. Ten spočívá ve výpočtu Debyeovy teploty a koeficientů objemové teplotní roztažnosti a stlačitelnosti z empiricky získaných parametrů Morseova potenciálu a následném výpočtu vibračního příspěvku C_{vib} na základě Debyeova modelu krystalu a výpočtu dilatačního příspěvku C_{dil} . Vypočtené teplotní závislosti C_{pm}^0 pro řadu monooxidů, které nevykazují změny magnetického uspořádání jsou v poměrně dobré shodě s údaji experimentálními.

Tato práce vznikla za finanční podpory GAČR v rámci projektu 106/00/0568.

LITERATURA

1. Kubaschewski O.: High Temp. – High Pressures 4, 1 (1972).
2. Glushko V. P., Gurvich L. V., Bergman G. A., Veic I. V., Medvedev B. A., Khachkuruzov G. A., Yungman B. S.: *Termodinamicheskie svoistva individualnykh veshchestv*, sv. I–IV. Nauka, Moskva 1978–1982.
3. Pankratz L. B.: *Thermodynamic Properties of Elements*

- and Oxides* (Bulletin 672). U.S. Bureau of Mines, Washington 1982.
4. Kulikov I. S.: *Thermodynamics of Oxides: Handbook*. Metallurgiya, Moscow 1986.
 5. Knacke O., Kubaschewski O., Hesselmann K.: *Thermochemical Properties of Inorganic Substances*. Springer, Berlin 1991.
 6. Kubaschewski O., Alcock C. B., Spencer P. J.: *Materials Thermochemistry*. Pergamon, Oxford 1993.
 7. Barin I.: *Thermochemical Data of Pure Substances*. Wiley-VCH, Weinheim 1995.
 8. Chase M.W., Jr. (Ed.): *NIST-JANAF Thermochemical Tables*, 4th Ed., J. Phys. Chem. Ref. Data, Monograph No. 9, 1998.
 9. Berman R. G., Brown T. H.: *Contrib. Mineral. Petrol.* 89, 168 (1985).
 10. Berman R. G.: *J. Petrol.* 29, 445 (1988).
 11. Saxena S. K., Chatterjee N., Fei Y., Shen G.: *Thermodynamic Data on Oxides and Silicates*. Springer, Berlin 1993.
 12. Robie R. A., Hemingway B. S.: *Thermodynamic Properties of Minerals and Related Substances at 298.15 K and 1 bar Pressure and at Higher Temperatures*. U.S. Government and Printing Office, Washington 1995.
 13. Gottschalk M.: *Eur. J. Miner.* 9, 175 (1997).
 14. Holland T. J. B., Powell R.: *J. Metamorph. Geol.* 16, 309 (1998).
 15. Chatterjee N. D., Kruger R., Haller G., Olbricht W.: *Contrib. Mineral. Petrol.* 133, 149 (1998).
 16. Moiseev G. K., Šesták J.: *Prog. Cryst. Growth Charact.* 30, 23 (1995).
 17. Spencer P. J.: *Thermochim. Acta* 314, 1 (1998).
 18. Kittel Ch.: *Úvod do fyziky pevných látek*, str. 139. Academia, Praha 1985.
 19. Inaba H.: *J. Phase Equilib.* 20, 187 (1999).
 20. Grønvold F., Sveen A.: *J. Chem. Thermodyn.* 6, 859 (1974).
 21. Kellogg H. H., v knize: *Applications of Fundamental Thermodynamics to Metallurgical Processes* (Fitterer G. R., ed.), str. 357. Gordon and Breach, London 1967.
 22. Kubaschewski O., Únal H.: *High Temp. – High Pressures* 9, 361 (1977).
 23. Kumok V. N.: *Problem of Correlation Methods for Evaluation of Thermodynamic Characteristics. Direct and Reverse Tasks of Chemical Thermodynamics*, str. 108. Nauka, Novosibirsk 1987.
 24. Huang G., Xu Z.: *Thermochim. Acta* 145, 363 (1989).
 25. Lagowski J. J.: *Modern Inorganic Chemistry*, str. 148. Marcel Dekker, New York 1973.
 26. Chase M. W., Jr., Davies C. A., Downey J. R., Jr., Frurip D. J., McDonald R. A., Syverud A. N.: *JANAF Thermochemical Tables*, 3rd Ed., J. Phys. Chem. Ref. Data, 14 (Suppl. No. 1) 1–1856 (1985).
 27. Hurst J. E., Jr., Harrison B. K.: *Chem. Eng. Commun.* 112, 21 (1992).
 28. Golam Mostafa A. T. M., Eakman J. M., Montoya M. M., Yarbo S. L.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 35, 343 (1996).
 29. Cordfunke E. H. P., Konings R. J. M. (Eds.): *Thermochemical Data for Reactor Materials and Fission Products*. Elsevier, Amsterdam 1990.
 30. Barin I.: *Thermochemical Data of Pure Substances*. VCH, Weinheim 1993.
 31. Taylor J. R., Dinsdale A. T., Hillert M., Selleby M.: *CALPHAD* 16, 173 (1992).
 32. Cordfunke E. H. P., van der Laan R. R., van Miltenburg J. C.: *J. Phys. Chem. Solids* 55, 77 (1994).
 33. Risold D., Hallstedt B., Gauckler L. J., Lukas H. L., Fries S. G.: *J. Phase Equilib.* 16, 223 (1995).
 34. Taylor J. R., Dinsdale A. T.: *CALPHAD* 14, 71 (1990).
 35. Hallstedt B., Risold D., Gauckler L. J.: *J. Phase Equilib.* 15, 483 (1994).
 36. Cordfunke E. H. P., Westrum E. F., Jr.: *J. Phys. Chem. Solids* 53, 361 (1992).
 37. Huntelaar M. E., Booij A. S., Cordfunke E. H. P., van der Laan R. R., van Genderen A. C. G., van Miltenburg J. C.: *J. Chem. Thermodyn.* 32, 465 (2000).
 38. Takai S., Akishige Y., Kawaji H., Atake T., Sawaguchi E.: *J. Chem. Thermodyn.* 26, 1259 (1994).
 39. Grønvold F., Stølen S., Tolmach P., Westrum E. F., Jr.: *J. Chem. Thermodyn.* 25, 1089 (1993).
 40. Shapiro J. L., Woodfield B. F., Stevens R., Boerio-Goates J., Wilson M. L.: *J. Chem. Thermodyn.* 31, 725 (1999).
 41. Gavrichev K. S., Gorbunov V. E., Golushina L. N., Nikiforova G. E., Totrova G. A., Shaplygin I.S.: *Zh. Fiz. Khim.* 67, 1731 (1993).
 42. Tojo T., Atake T., Mori T., Yamamura H.: *J. Chem. Thermodyn.* 31, 831 (1999).
 43. Westrum E. F., Jr., Carlson H. G., Grønvold F., Kjekshus A.: *J. Chem. Phys.* 35, 1670 (1961).
- J. Leitner^a, P. Chuchvalec^b, and D. Sedmidubský^c** (^aDepartment of Solid-State Engineering, ^bDepartment of Physical Chemistry, ^cDepartment of Inorganic Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague): **Estimation of Heat Capacities of Binary Oxides in the Solid State**
- Empirical contribution methods are described that can be used for estimation of heat capacities of binary oxides in the solid state, and reliability of the data obtained in equilibrium calculations for oxide systems is assessed. On the basis of a comparison of estimated and experimental data for 111 binary oxides of 67 elements, it can be stated that the method proposed by Mostafa is the most appropriate for the estimation of molar heat capacity of solid oxides at 298 K ($C_{pm}^0(298.15)$) at present. The method is quite general and sufficiently accurate (the mean error for a set of 92 oxides is 4.27 %). However, its use for prediction of temperature dependence of $C_{pm}^0(T)$ is problematical: its course shows a maximum and a pronounced decrease in heat capacity with increasing temperature in many cases. In calculating thermodynamic functions of solid oxides at elevated temperatures, the error in the estimated C_{pm}^0 manifests in the entropy value whereas in the Gibbs energy value, where the enthalpic and entropic terms partly compensate, it virtually does not appear. Using the estimation methods, the hitherto unmeasured values of $C_{pm}^0(298.15)$ were obtained for the oxides In₂O, NdO, SmO, YbO, PdO₂, PtO₂ a RhO₂.

KONFORMAČNÍ FLEXIBILITA CYKLOSPORINŮ

BOHUMIL KRATOCHVÍL^a, MICHAL HUŠÁK^a
a ALEXANDR JEGOROV^b

^aÚstav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: bohumil.kratochvil@vscht.cz, michal.husak@vscht.cz, ^bGalena a.s., výzkumná jednotka, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, e-mail: alexandr_jegorov@galena.cz

Došlo dne 16.XI.2000

Klíčová slova: cyklosporin, konformace, kladráty

Obsah

1. Úvod
2. Přehled cyklosporinových struktur
3. Konformace cyklosporinového skeletu
 - 3.1. Konformace cyklosporinů ve volné formě v roztoku a v krystalech
 - 3.2. Cyklosporinové kladráty
 - 3.3. Konformace cyklosporinů v komplexu s cyklofilinem
 - 3.4. Konformace cyklosporinu A vázaného na FAB fragment monoklonální protilátky
4. Závěr

1. Úvod

Přírodní cyklosporiny jsou cyklické undekapeptidy produkované biotechnologicky, např. submerzní fermentací hub rodu *Tolypocladium*¹. Největší význam má tzv. cyklosporin A (CsA = cyklo(-MeBmt¹-Abu²-Sar³-MeLeu⁴-Val⁵-MeLeu⁶-Ala⁷-D-Ala⁸-MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-MeVal¹¹-)). Aminokyselinové zbytky CsA, kromě achirálního Sar³ a D-Ala⁸, mají L-konfiguraci. Ve srovnání s ostatními peptidy, CsA obsahuje především neobvyklou aminokyselinu, MeBmt¹ = (2*S*,3*R*,4*R*,6*E*)-3-hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-okt-6-enová kyselina² (obr. 1).

Od roku 1978 se roztok CsA používá v klinické praxi jako revoluční imunosupresivum pro potlačení reakce hostitele na tkáňové transplanáty a pro léčbu autoimunitních chorob (lékové formy Neoral[®], Novartis a Consupren[®], Galena). Podle současné představy³ prochází CsA buněčnou membránou do cytoplazmy, kde se váže přes rezidua 1, 2, 3, 9, 10 a 11 na cytosolický protein cyklofilin A (CypA), peptidylprolin-*cis-trans*-isomerasu (EC 5.2.1.8). Ve vzniklém komplexu, CypA/CsA (obr. 2) je k dispozici tzv. efektorová smyčka (effector loop), tvořená zbylými rezidui (4–8), pro interakci s dalším cytosolickým proteinem – kalcineurinem (Cn), fosfoprotein fosfohydrolasou (EC 3.1.3.16). Imunosupresivní účinek této

interakce se projeví tlumením tvorby interleukinu-2, růstového faktoru T lymfocytů, které jsou, jak známo, odpovědné za imunitní odezvu v lidském organismu. Všechny detaily popsaného mechanismu nejsou však dosud vysvětleny.

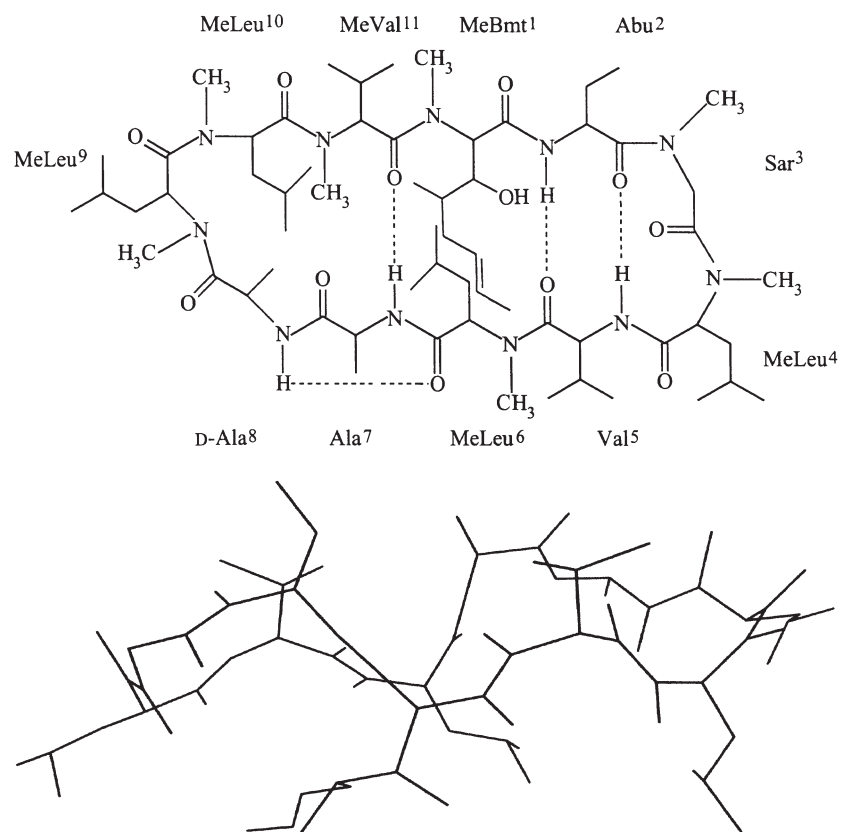
Ostatní přírodní cyklosporiny, které se od CsA liší substitucí jedné až dvou aminokyselin (v literatuře se označují např. písmeny B až Z nebo vyznačením substituce vůči CsA, tab. I), a různé semisyntetické deriváty, vykazují nižší imunosupresivní účinek než původní CsA. Dosud se však nepodařilo nalézt ani připravit derivát, který by měl lepší imunosupresivní vlastnosti při nižších vedlejších účincích. Efekt snížení, resp. ztráta imunosupresivity je ze strukturního hlediska pozoruhodná, protože cyklosporiny jsou poměrně velké molekuly ($M_r \approx 1200$), ale přesto i nepatrná chemická a tudíž i strukturní změna na jedné aminokyselině (např. demethylace) může vyvolat zásadní změnu biologické aktivity. Podle předběžných výzkumů je možné, že některé neimunosupresivní cyklosporiny by mohly být naopak aktivní při léčbě MDR (multidrug resistance)⁴.

Vzhledem k tomu, že změna biologické aktivity jednoznačně souvisí s konformační flexibilitou, lze získané výsledky použít při korelacích typu struktura/aktivita a drug designu. Tento článek mapuje současný stav znalostí o konformační flexibilitě cyklosporinů, především v krystalickém stavu, a je jedním z mnoha podobných, které přispívají k řešení rozsáhlého a nesnadného úkolu vysvětlit biologické děje na molekulární úrovni.

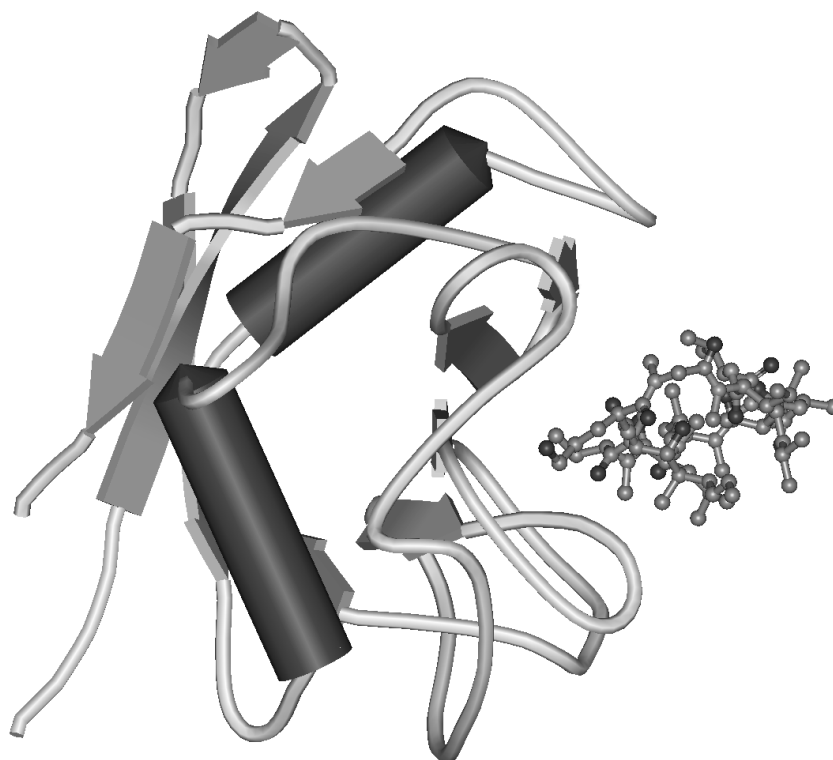
2. Přehled cyklosporinových struktur

Přírodních cyklosporinů a jejich metabolitů je dnes popsáno okolo 100. Cyklosporiny mohou navíc vystupovat jako ligandy v komplexech, např. s Li (viz^{5a,c}), Na (viz^{5b}), Mg (viz^{5b}), Ca (viz^{5b,c,d}), Zn (viz^{5d}), Cu (viz^{5d}). Na rozdíl od lineárních peptidů nemá cyklický skelet cyklosporinů k dispozici volnou karboxy nebo aminoskupinu a přítomné aminokyselinové zbytky jsou neutrální (Abu, Ala, Thr, MeVal, Val, Nva, Sar, MeLeu, Leu, Ile a MeBmt). V důsledku tohoto faktu a těsně uspořádané sekundární struktury jsou cyklosporiny lipofilní a hydrofobní. CsA má sedm *N*-methylovaných aminokyselinových zbytků (1, 3, 4, 6, 9, 10, 11) a tyto methylace umožňují vznik *cis/trans* izomerů peptidových vazeb (vzájemné postavení methylové skupiny a atomu kyslíku).

Nejvíce prostudovanou strukturou je samozřejmě molekula CsA, vzhledem ke svému terapeutickému používání. Cyklosporin A se původně podařilo vykryštalovat ve formě dihydrátu (tetragonální prostorová grupa $P4_1$)², který vzniká i ve výrobním procesu krystalizací CsA z acetonu. Vysušením dihydrátu lze připravit amorfní CsA. Později se podařilo připravit i bezvodý orthorombický cyklosporin (prostorová grupa $P2_12_12_1$)⁶. U tak významného léčiva, jakým CsA bezpochyby je, byla jeho nová modifikace ihned patentována⁷ a to i přesto, že potenciální lékové formy, v nichž by se krystalický CsA mohl uplatnit, např. topické masti (masti užívané lokál-



Obr. 1. Struktura cyklosporinu v CsA dihydrátu, systém intramolekulárních H-vazeb (nahore), antiparalelní β -list (dole)



Obr. 2. Komplex cyklofilinu A (vlevo) s cyklosporinem A (vpravo), efektivní smyčka na CsA zřetelně vystupuje z povrchu proteinu

Tabulka I

Přírodní cyklosporiny, kromě CsA, formulované jako jeho substituční deriváty^{27,28}

Název	Složení	Název	Složení
CsB	[Ala ²] CsA	CsP	[Bmt ¹ , Thr ²] CsA
CsC	[Thr ²] CsA	CsQ	[Val ⁴] CsA
CsD	[Val ²] CsA	CsR	[Leu ^{6,10}] CsA
CsE	[Val ¹¹] CsA	CsS	[Thr ² , Val ⁴] CsA
CsF	[3'-desoxy-MeBmt ¹] CsA	CsT	[Leu ¹⁰] CsA
CsG	[Nva ²] CsA	CsU	[Leu ⁶] CsA
CsH	[D-MeVal ¹¹] CsA	CsV	[Abu ⁷] CsA
CsI	[Val ² , Leu ¹⁰] CsA	CsW	[Thr ² , Val ¹¹] CsA
CsJ	[MeLeu ¹] CsA	CsX	[Nva ² , Leu ⁹] CsA
CsK	[3'-desoxy-MeBmt ¹ , Val ²] CsA	CsY	[Nva ² , Leu ⁶] CsA
CsL	[Bmt ¹] CsA	CsZ	[N-methyl-2-aminooktanová kys. ¹] CsA
CsM	[Nva ^{2,5}] CsA		-[Leu ⁵] CsA
CsN	[Nva ² , Leu ¹⁰] CsA		-[Leu ⁴] CsA
CsO	[MeLeu ¹ , Nva ²] CsA		-[Ile ⁴] CsA

Tabulka II

Přehled cyklosporinových struktur v krystalech stanovených difrakčními metodami

Název	Kód CSD ¹³	Prostorová grupa	Systém intramolekulárních H-vazeb
CsA dihydrát	DEKSAN	<i>P</i> 4 ₁	typ CsA dihydrát
CsA monohydrát	KEPNAU	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	typ CsA dihydrát
CsA dimethylisosorbid solvát	TECRIC	<i>P</i> 2 ₁	typ CsA DMI ^a
CsA di- <i>n</i> -butylether solvát	není zatím přidělen	<i>P</i> 2 ₁	typ CsA dihydrát
CsA tetrahydrofuran solvát	není zatím přidělen	<i>P</i> 2 ₁	typ CsA dihydrát
SulfhydrylCsA	ZAJDUJ	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	typ CsA dihydrát
ThioCsA diethylether solvát	JOKMAX	<i>P</i> 2 ₁	typ CsA DMI
IodoCsA	ICSSPA	<i>P</i> 2 ₁	typ CsA dihydrát
[<i>O</i> -acetyl-MeBmt ¹] CsA	není zatím přidělen	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	typ CsA dihydrát
[<i>O</i> -acetyl- ω -bromo-MeBmt ¹] CsA	není zatím přidělen	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	typ CsA dihydrát
[3, <i>O</i> -Didehydro-MeBmt ¹ , Val ²] CsA	ZADREB	<i>P</i> 3 ₁ 2 ₁	typ CsA dihydrát
diisopropylether solvát hemihydrát			
[3, <i>O</i> -Didehydro-MeBmt ¹ , Val ²] CsA	ZADRIF	<i>P</i> 3 ₂ 2 ₁	typ CsA dihydrát
CsE aceton solvát monohydrát	SUQNUM	<i>P</i> 2 ₁	typ CsE
CsE bis(2-butanol) monohydrát	není zatím přidělen	<i>P</i> 2 ₁	typ CsE
CsH diethylether hemisolvát monohydrát	CCDC 139242 (předběžný kód)	<i>I</i> 2	typ CsH
Dihydro-CsA bis(<i>tert</i> -butylmethylether) solvát	CCDC 153170 (předběžný kód)	<i>P</i> 2 ₁	typ CsA DMI
CsV bis(<i>tert</i> -butylmethylether) solvát	CCDC 153171 (předběžný kód)	<i>P</i> 2 ₁	typ CsA DMI

^a Dimethylisosorbid

ně), představují pouhý zlomek trhu. Není bez zajímavosti uvést, že třetí dosud známá krystalická forma CsA byla popsána v Čechách a jedná se o monoklinický CsA s různými solvoly (prostorová grupa *P* 2₁)^{8,9}.

Kromě struktur CsA, krystalovaných z různých rozpouštědel, byly vyřešeny i struktury cílových proteinových receptorů s cyklosporiny. Komplex CsA s cyclofilinem A je znám v několika formách, např. monomeru¹⁰ nebo dekameru¹¹. Jak konformace cyklosporinového skeletu, tak vazebné místo na cyclofilin je však ve všech těchto formách stejné. Komplex

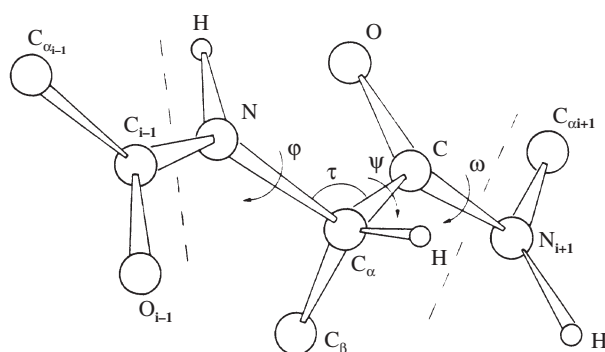
cyclofilin/cyklosporin A/kalcineurin (CypA/CsA/Cn) se zatím nepodařilo vykristalovat, takže jeho RTG-struktura není známa. Je však známa konformace CsA vázaného na FAB fragment monoklonální protilátky¹².

Přehled všech známých cyklosporinových struktur je uveden v tabulce II a III. Uvedený přehled není a zřejmě ani nemůže být kompletní. V pozadí lze hledat i dosud neúspěšnou snahu syntetizovat modifikovanou cyklosporinovou molekulu s ještě vyšším a specifitějším imunosupresivním účinkem a nižší toxicitou (cyklosporin A je totiž nezanedbatelně nefro-

Tabulka III

Přehled cyklosporinových struktur v komplexech s proteiny a s FAB fragmentem

Experimentální technika	Ligand	Kód PDB ¹⁴	Prostorová grupa
RTG-difrakce	FAB fragment (imunoglobulin Ig1-κ)	1IKF	$P 2_1 2_1 2_1$
RTG-difrakce	Cyklofilin A	1CWH	$P 2_1 2_1 2$
RTG-difrakce	Cyklofilin B	1CSN	$P 2_1 2_1 2_1$
RTG-difrakce	Cyklofilin A	2RMA, 2RMB	$P 2_1$
RTG-difrakce	Cyklofilin A	1MIK, 1BCK, 1CWA, 1CWB, 1CWC, 1CWF, 1CWI, 1CWJ, 1CWM, 1CWO	$P 2_1 2_1 2_1$
NMR	Cyklofilin A	1CSA, 3CSS, 1CSA, 1CSB	–



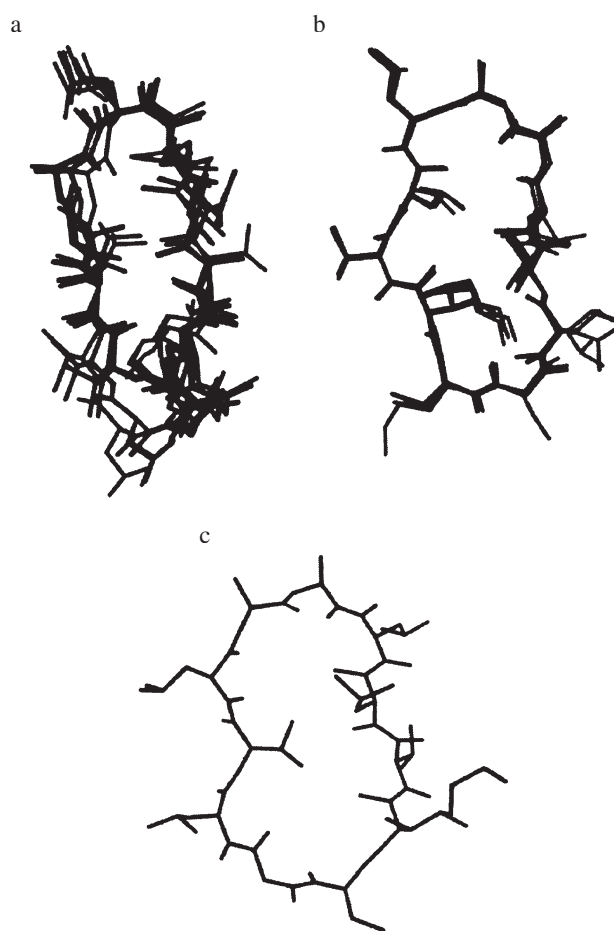
Obr. 3. Konvence značení torzních úhlů peptidových vazeb podle doporučení IUPAC-IUB komise pro biochemickou nomenklaturu (J. Mol. Biol. 52, 1 (1970)). Převzato z knihy: *Fundamentals of Crystallography* (Giacovazzo C. ed.). IUCr and Oxford University Press, New York 1992

toxický). Lze proto předpokládat, že některé struktury nebyly dosud zveřejněny. V této práci byl proto jako srovnávací materiál zvolen soubor cyklosporinových struktur obsažených především v databázích CSD (Cambridge Structural Database)¹³ a PDB (Protein Data Bank)¹⁴ a v našich nejnovějších pracích, kde kód CSD není ještě přidělen.

3. Konformace cyklosporinového skeletu

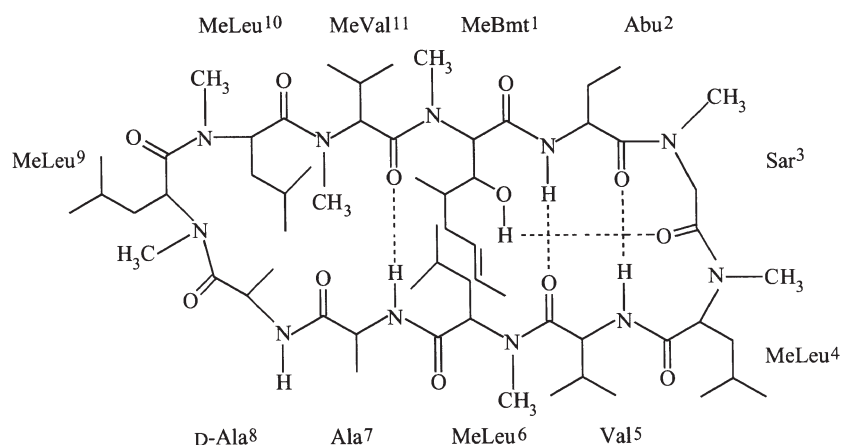
Konformace neboli prostorové uspořádání cyklosporinového skeletu je primárně dáno energetickou výhodností systému. V tomto systému se vytváří intramolekulární vodíkové vazby, které jsou dány jednak počtem donorů a akceptorů protonů, které má skelet k dispozici, a dále jejich prostorovou orientací. Např. sekundární struktura CsA v krystalickém stavu² má tvar antiparalelního složeného β -listu se čtyřmi intramolekulárními vodíkovými vazbami: D-Ala⁸NH...COMeLeu⁶, Ala⁷NH...COMeVal¹¹, Abu²NH...COVal⁵, Val⁵NH...COAbu², (viz obr. 1). Kvalitativní informaci o určité konformaci poskytuje obrázek tvaru molekuly, kvantitativním vyjádřením jsou hodnoty konvenčních torzních úhlů (značených ϕ , ψ , ω) peptidových vazeb, obr. 3, tab. IV.

U CsA lze rozlišit tři zásadní konformace cyklosporinového skeletu (obr. 4):

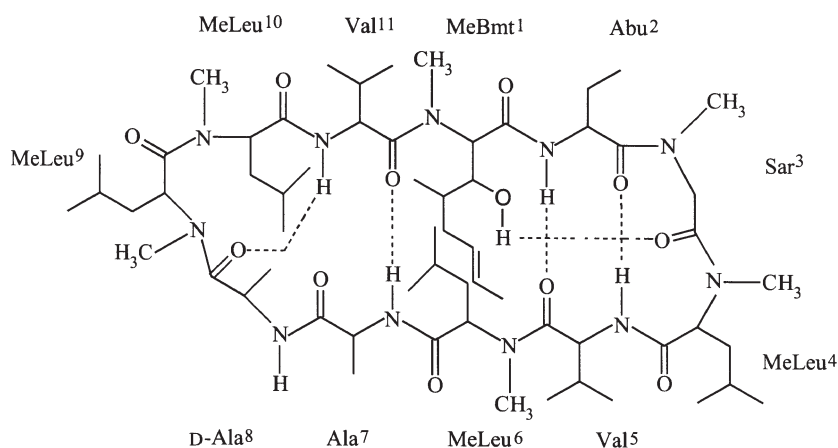


Obr. 4. Tři zásadní konformace cyklosporinového skeletu; a – ve volné formě v krystalech (pro ilustraci nakreslen překryv Cs-skeletů v DEKSAN, JOKMAX, KEPNAU, TECRIC, SUQNUM, ZAJDUJ – viz tab. II), b – v komplexech s cyklofilinem A (překryv Cs-skeletů v 2RMA, 2RMB – viz tab. III), c – s FAB fragmentem

- Konformace ve volné formě v roztoku a v krystalech
- Konformace v komplexech s cyklofilinem
- Konformace při navázání na FAB fragment monoklonální protilátky



Obr. 5. Systém intramolekulárních H-vazeb ve struktuře CsA dimethylisorbid klatrátu



Obr. 6. Systém intramolekulárních H-vazeb ve struktuře CsE

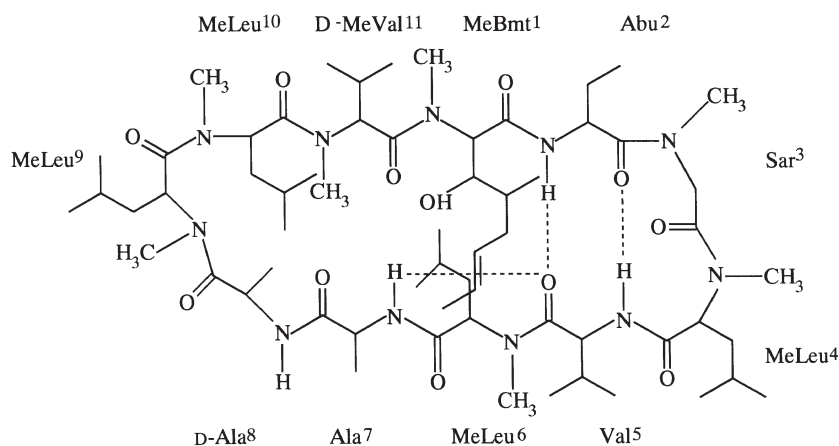
3.1. Konformace cyklosporinů ve volné formě v roztoku a v krystalech

Konformace CsA v nepolárních rozpouštědlech (benzen, chloroform) je velmi podobná jeho konformaci v krystalových formách (viz tab. II). V polárních rozpouštědlech však existuje několik konformací. Podobně se chová i většina ostatních přírodních cyklosporinů. Tři různé konformace CsA byly nalezeny i v pevném stavu a ačkoli jsou velmi podobné, lze i zde nalézt zajímavé rozdíly. Např. struktura CsA dihydrátu² (viz typ CsA dihydrát, tab. II) obsahuje čtyři intramolekulární vodíkové vazby (viz obr. 1), přičemž atom kyslíku a methylová skupina peptidové vazby mezi MeLeu⁹ a MeLeu¹⁰ jsou vůči sobě v uspořádání *cis*. Struktura CsA dimethylisorbid klatrátu⁸ (viz typ CsA DMI, tab. II) obsahuje rovněž čtyři intramolekulární vazby, ale ve srovnání s CsA dihydrátem tři stejné a jednu odlišnou (obr. 5): MeBmt¹OH...CO Sar³, Ala⁷NH...COMeVal¹¹, Abu²NH...COVal⁵, Val⁵NH...CO Abu². Stejnou síť intramolekulárních H-vazeb má i CsV (Ala⁷ je zde substituováno za Abu⁷) a dihydro-CsA (oba viz¹⁵).

V cyklosporinu E, obsahujícím Val¹¹ (místo MeVal¹¹ v CsA) je k dispozici skupina NH valinu, což dává vzniknout

nové intramolekulární vodíkové vazbě Val¹¹NH...D-Ala⁸CO. Struktura CsE aceton solvátu monohydrátu¹⁶ (viz typ CsE, tab. II) obsahuje celkem pět intramolekulárních H-vazeb (obr. 6). Srovnání tvarů molekul CsA, CsE ukazuje, že smyčka reziduí 8–11 je u CsE vlivem přítomnosti nové H-vazby (Val¹¹NH...D-Ala⁸CO) podstatně více „zaškrncena“ (zhruba ze 4 Å u CsA na 3 Å u CsE). Pátá vodíková vazba podstatně přispívá ke stabilitě konformace a CsE má pouze jednu identickou konformaci v nepolárních i polárních rozpouštědlech.

CsH poskytuje v roztoku celou řadu konformerů, jejichž strukturu se dosud nepodařilo úspěšně rozšifrovat¹⁷. U CsH v pevném stavu H-vazby D-Ala⁸NH...COMeLeu⁶ a Ala⁷NH...COMeVal¹¹ zanikají a místo nich se vytváří nová Ala⁷NH...COVal⁵ (obr. 7). Diference mezi torzními úhly v CsA dihydrátu a v CsH (tab. IV) jsou výsledkem opačných prostorových orientací smyčky D-Ala⁸-MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-MeVal¹¹ (D-MeVal¹¹) v cyklosporinovém skeletu a jemných rozdílů mezi reziduí MeBmt¹Val⁵ a MeLeu⁶ (obr. 8). Z tohoto důvodu může CsH být považován za samostatný konformační typ (tab. II). Přesto, že je molekula CsH velmi flexibilní nevykazuje žádnou imunosupresivní aktivitu, neboť není schopna vytvořit konformaci umožňující vazbu na cyklofilin. CsH však vyka-



Obr. 7. Systém intramolekulárních H-vazeb ve struktuře krystalického CsH

Tabulka IV

Srovnání torzních úhlů peptidových vazeb aminokyselinových zbytků u vybraných cyklosporinů

Torzní úhel [°]	CsA dihydrát		CsH.DEM ^a		CsA.DMI ^b		CsE.AM ^c		CsA/CypA						
$\phi_1 \psi_1 \omega_1$	-84	122	-175	-103	105	-177	-93	156	167	-103	159	167	-109	171	-178
$\phi_2 \psi_2 \omega_2$	-120	90	-177	-105	107	-173	-118	99	-167	-118	97	-167	-116	93	-179
$\phi_3 \psi_3 \omega_3$	71	-128	173	61	-132	176	68	-133	172	68	-130	170	128	-72	173
$\phi_4 \psi_4 \omega_4$	-99	22	-180	-105	23	-176	-98	9	-177	-100	9	-179	-108	103	-177
$\phi_5 \psi_5 \omega_5$	-113	125	167	-121	155	174	-85	134	176	-78	134	174	-76	122	-176
$\phi_6 \psi_6 \omega_6$	-90	100	-165	-99	85	-173	-79	128	-174	-74	122	-175	-96	168	179
$\phi_7 \psi_7 \omega_7$	-83	52	178	-157	142	164	-98	-5	180	-104	-13	179	-63	156	173
$\phi_8 \psi_8 \omega_8$	88	-125	-167	67	-128	-175	150	-133	-173	163	-162	-166	100	-141	178
$\phi_9 \psi_9 \omega_9$	-119	100	-6	-102	120	-7	-120	99	-1	-109	110	-8	-123	72	-178
$\phi_{10} \psi_{10} \omega_{10}$	-139	65	-167	-146	70	178	-139	64	-178	-119	87	-167	-108	170	174
$\phi_{11} \psi_{11} \omega_{11}$	-103	125	173	127	-86	170	-95	142	166	-123	137	171	-123	83	-179

^a Diethylether hemisolvát monohydrát, ^b dimethylisosorbid, ^c aceton solvát monohydrát

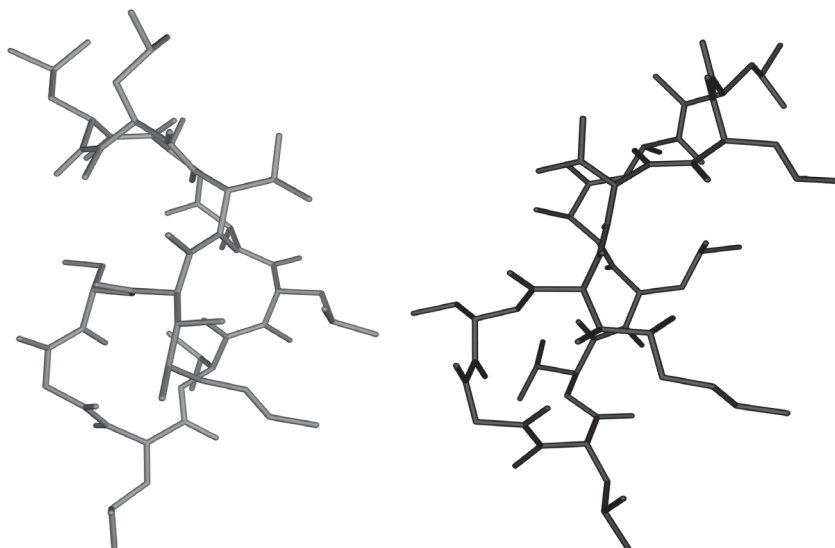
zuje některé zajímavé biologické aktivity¹⁷, které však neprobíhají přes jeho vazbu na cyklofilin, ale pravděpodobně na jiné, nám dosud neznámé, vazebné struktury.

3.2. Cyklosporinové klatráty

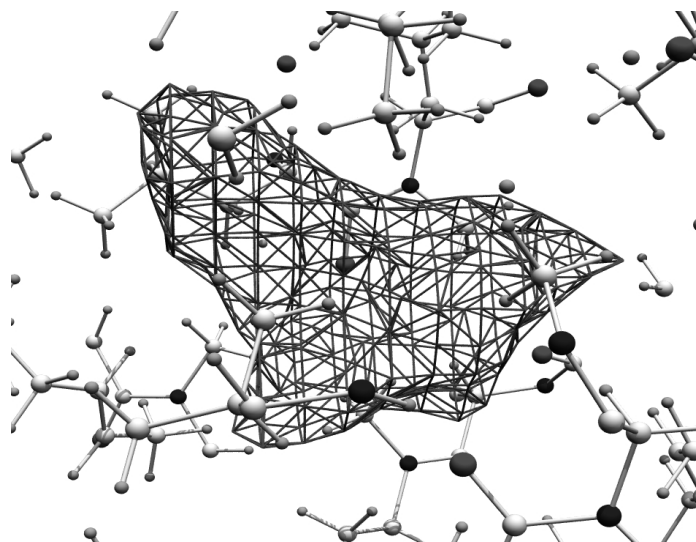
Pojem *cyklosporinové klatráty* byl poprvé použit Jegorovem a spol.⁹ a pravděpodobně se jedná o první popis klatrátů tvořených peptidy. Molekuly cyklosporinů jsou v krystalech uspořádány tak, že se mezi nimi vytváří různé velké a různé orientované dutiny neboli kavity. Zatím však nebyl pozorován případ, že by molekula solventu vstoupila dovnitř cyklosporinového skeletu, jako např. u cyklodextrinů při separaci enantiomerů¹⁸. Tvar a objem kavit lze vypočítat a graficky modelovat, obr. 9 (např. programem PLATON¹⁹ nebo programem MarchingCubeELD²⁰). Tak lze pro různé cyklosporinové klatráty stanovit maximální počet nevodíkových atomů, které lze do kavity sméstnat. Cyklosporinový klatrát však zdárně krystaluje i molekulou rozpouštědla, která obsahuje i polovinu maximálního počtu nevodíkových atomů teoreticky umístitelných do kavity.

Chiralita samotného cyklosporinového skeletu, disymetrie kavit a možnost vytváření vodíkových vazeb s hostující molekulou solventu nabízí i možnost využití preferenční krystalizace k separaci různých enantiomerů. Hušák a spol.²¹ testovali inkorporaci celkem tří typů chirálních molekul. Byly syntetizovány nesymetrické chirální ethery, avšak nepodařilo se nalézt vhodný analytický systém pro separaci enantiomerů. Inkorporace (*R,S*)-2-butanolu do CsE prokázala, že tato molekula je příliš malá a v kavitě byly nalezeny oba enantiomery. Každý z těchto enantiomerů však zaujímá specifickou pozici, což podporuje potenciální možnost diskriminace větších chirálních molekul. Jako další byl testován (*R,S*)-butyl-laktát, avšak i zde bylo u klatrátu CsE nalezeno zastoupení obou enantiomerů v poměru 1:1. I tato molekula s 10 nevodíkovými atomy je zjevně příliš malá vzhledem k velikosti kavity. Bylo prokázáno, že diverzita cyklosporinů potenciálně umožňuje modifikaci nejen velikost kavity, ale i symetrii inkorporace hostující molekuly. Např. v klatrátech dihydro-CsA a CsV s *tert*-butylmethyletherem má jedna z molekul *tert*-butylmethyletheru zcela odlišnou orientaci v kavitě.

Dále bylo zjištěno, že relativně velká konformační stabilita



Obr. 8. CsH (vlevo), CsA dihydrát (vpravo)



Obr. 9. Modelování kavity v CsA dimethylisorbid klatrátu pro lokalizaci dimethylisorbidu

cyklosporinových molekul v krystalickém stavu způsobuje preferenci určitého symetrického uspořádání. Z tohoto hlediska byla identifikována dvě výrazně preferovaná uspořádání a sice symetrie monoklinické prostorové grupy $P2_1$ a symetrie orthorombické prostorové grupy $P2_12_12_1$. Pro typ $P2_1$ a počet vzorcových jednotek v elementární buňce $Z = 2$ je charakteristická právě přítomnost velkých kavit (až 562 \AA^3), pro typ $P2_12_12_1$ přítomnost malých kavit (okolo 20 \AA^3), které nejsou obsazeny buď žádným solventem (např. acetyl-CsA nebo acetylbro-CsA (oba viz ²²) nebo pouze molekulou vody (např. CsA dihydrát).

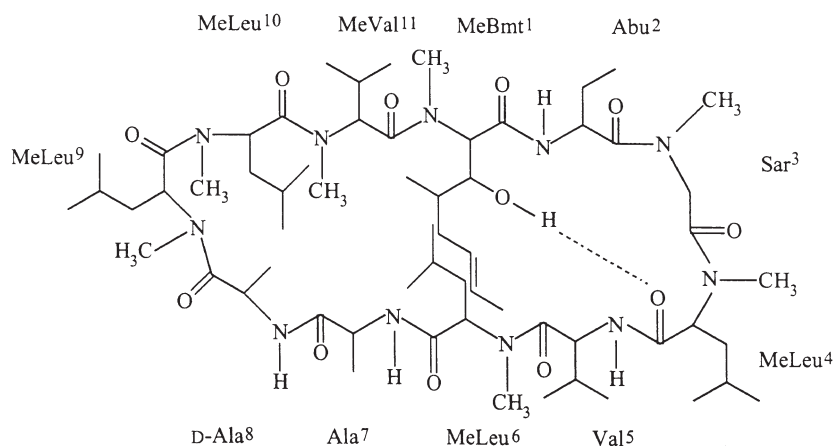
Konformace cyklosporinů v klatrátech se liší od konformace cyklosporinu A v dihydrátu v zásadě pouze orientací postranního řetězce rezidua MeBmt¹, přičemž samotná rezidua 1–5 jsou, podobně jako u CsA dihydrátu, v uspořádání nesouhlasně orientovaného β -skládaného listu a rezidua 7–11 tvoří

otevřenou smyčku s peptidovou *cis*-vazbou mezi rezidui 9–10.

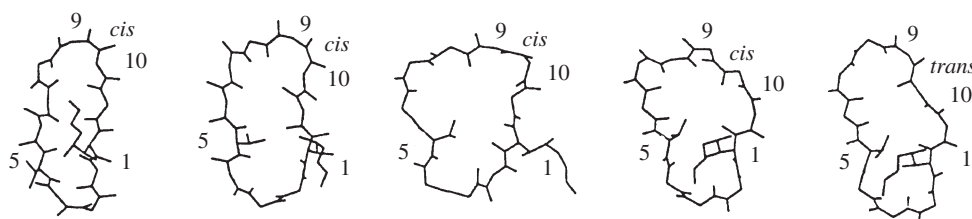
Vzhledem ke snadné tvorbě, tvaru i kvalitě krystalů představuje postup krystalizace cyklosporinů ve formě izostrukturálních klatrátů i výbornou metodu jak přimět ke krystalizaci neznámé cyklosporiny. Tato metoda byla např. úspěšně použita pro primární identifikaci CsV. Postup byl testován i pro různé metabolity cyklosporinu a podařilo se takto vyřešit strukturu dihydro-CsA (dihydro-metabolity vznikají pravděpodobně zpětnou resorpcí ze střeva v důsledku působení střevní mikroflory).

3.3. Konformace cyklosporinů v komplexech s cyklofilinem

Vazba cyklosporinů na cyklofilin přímo koreluje s jejich immunosupresní aktivitou²³. Při interakci volného cyklo-



Obr. 10. Systém intramolekulárních H-vazeb CsA v komplexu CsA/CypA

Obr. 11. Trajektorie konformační změny: volný CsA (vlevo) → receptorově-vázaný CsA (vpravo) (převzato a upraveno z cit.²⁴)

sporinu A s cyklofilinem A se razantně mění konformace cyklosporinového skeletu. Původní čtyři intramolekulární H-vazby ve volném CsA (viz obr. 1) se redukují na jednu (MeBmt¹OH...COMeLeu⁴) v CsA vázaném v komplexu s CypA (obr. 10). Dále je podstatné, že při této interakci se mění i vzájemné postavení atomu kyslíku a methylové skupiny peptidové vazby mezi MeLeu⁹ a MeLeu¹⁰ z konfigurace *cis* (volný CsA) na *trans* (vázaný CsA). Kóck a spol.²⁴ modelovali molekulární mechanikou konformační přechod: volný CsA (v chloroformu, resp. v tetrahydrofuranu) → vázaný CsA (v komplexu s receptorem). Zjistili, že ke konverzi dojde během několika desítek ps. Trajektorie této konverze zahrnuje protočení postranních řetězců MeBmt¹ a Val⁵ a již zmíněnou změnu izomerie *cis/trans* (obr. 11).

Kallen a spol.³ porovnali RTG-struktury desíti komplexů různých cyklosporinů s cyklofilinem A. Zjistili, že všechny komplexy jsou izomorfní, krystalizující v prostorové grupě $P2_12_12_1$ s velmi blízkými mřížkovými parametry, s jedinou výjimkou CypA/[D-MeSer³] CsA, který krystaluje v grupě $P2_12_12$. Měření imunosupresivní aktivity těchto analogů (produkce interleukinu-2) potvrdilo, že žádný nevykazuje větší aktivitu než CypA/CsA. Vazebnou doménu CsA pro interakci s cyklofilinem tvoří vždy řetězec MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-MeVal¹¹-MeBmt¹-Abu²-Sar³.

3.4. Konformace cyklosporinu A vázaného na FAB fragment monoklonální protilátky

Zatímco mechanismus imunosupresivního účinku cyklosporinů je zprostředkován jejich vazbou na cyklofilin, není to

zdaleka jediný protein, který je schopen cyklosporiny vázat. Kromě struktur s cyklofilinem byla RTG difrakcí studována konformace CsA navázaného na FAB fragment monoklonální protilátky, zejména pro lepší pochopení mechanismu rozpoznání antigenu (cyklosporinu) protilátkou. Nalezená konformace CsA je velmi otevřená a neobsahuje ani jednu intramolekulární H-vazbu, čímž se výrazně liší od struktur volného CsA i jeho komplexu s cyklofilinem. Představuje tudíž třetí, výrazně odlišný typ konformace CsA (viz obr. 4c). Dalším proteinem schopným vázat cyklosporiny je např. P-glykoprotein podílející se na transmembránovém transportu cyklosporinu (a mnoha dalších látek) a vzniku MDR, kdy molekuly léčiv jsou exportovány ven z buněk a tak není možné dosáhnout jejich účinné koncentrace. Vazba cyklosporinů nijak nekorreluje s jejich imunosupresivní aktivitou a P-glykoprotein se váže na doménu CsA tvořenou řetězcem aminokyselin MeLeu⁴-Val⁵-MeLeu⁶-Ala⁷-D-Ala⁸, tj. část rozpoznávanou rovněž kalcineurinem²⁵. Nejúčinnějšími modulátory jsou např. [3, O-didehydro-MeBmt¹, Val²] CsA a acetylcyklosporin A, jejichž struktura byla rovněž vyřešena RTG difrakcí^{22,26}.

4. Závěr

Cyklosporiny jsou překvapivě rigidní molekuly preferující ve volné formě v krystalech symetrické uspořádání prostorové grupy $P 2_1$ a ve vazbě na cyklofilinový receptor prostorovou symetrii $P2_12_12_1$. Konformace cyklosporinů v kapalinách odpovídají konformacím nalezeným v krystalech. Předpokladem biologické aktivity cyklosporinů je konformační flexibilita jejich cyklického skeletu. Ve volné formě v krystalech cyklo-

sporiny zaujímají těsnou konformaci antiparalelního β -listu, při vazbě na proteinový receptor se cyklosporinový skelet otvírá. Tato konformační změna je charakterizována snížením počtu intramolekulárních vodíkových vazeb ze čtyř na jednu a změnou konfigurace peptidové vazby mezi MeLeu⁹ a MeLeu¹⁰ z *cis* (volný CsA) na *trans* (vázaný CsA). Tím jsou splněny sterické nároky při vazbě CsA (přes jeho rezidua 1, 2, 3, 9, 10 a 11) na proteinový receptor cyklofilin A. Energetické nároky konformační změny CsA (volný) \rightarrow CsA (vázaný) jsou uhrazeny z konformačních změn receptoru.

Seznam nekódovaných aminokyselin

MeBmt	(4 <i>R</i>)-4-((<i>E</i>)-but-2-en-1-yl)-4, <i>N</i> -dimethyl-L-threonin
Bmt	(4 <i>R</i>)-4-((<i>E</i>)-but-2-en-1-yl)-4-methyl-L-threonin
Abu	2-aminobutanová kyselina
Sar	sarkosin, <i>N</i> -methylglycin
MeLeu	<i>N</i> -methylleucin
MeVal	<i>N</i> -methylvalin
Nva	norvalin

Tato práce byla podpořena Ministerstvem mládeže, školství a tělovýchovy (výzkumný záměr č. CEZ: MSM 223100002). Vyhledávání v databázi CSD bylo umožněno na základě grantu GA ČR 203/99/0067.

LITERATURA

- Mařha V.: *Cyklosporin A*. Grada Publishing, Praha 1994.
- Loosli H.-R., Kessler H., Oschkinat H., Weber H.-P., Petcher T. J. Widmer A.: *Helv. Chim. Acta* 68, 682 (1985).
- Kallen J., Mikol V., Taylor P., Walkinshaw D.: *J. Mol. Biol.* 283, 435 (1998).
- Twentyman P. R.: *Biochem. Pharmacol.* 43, 109 (1992).
- a) Köck M., Kessler H., Seebach D., Thaler A.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 2676 (1992). b) Carver J. A., Rees N. H., Turner D. L., Senior S. J., Chowdhry B. Z.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992, 1682. c) Bürger M. H., Seebach D.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 442 (1994). d) Dancer R. J., Jones A., Fairlie D. P.: *Aust. J. Chem.* 48, 1835 (1995).
- Knott R. B., Schefer L., Schoenborn B. P.: *Acta Crystallogr.* C46, 1528 (1990).
- Giron D., List M., Richter F., Uike Y., Weber H.-P.: *CS* 279, 654 (1995).
- Hušák M., Kratochvíl B., Jegorov A., Mařha V., Stuchlík M., Andryšek T.: *Z. Kristallogr.* 211, 313 (1996).
- Jegorov A., Pakhomova S., Hušák M., Kratochvíl B., Žák Z., Cvak L., Buchta M.: *J. Inclusion Phenom.* 37, 137 (2000).
- Mikol V., Kallen J., Pflügl G., Walkinshaw M. D.: *J. Mol. Biol.* 234, 1119 (1993).
- Pflügl G., Kallen J., Schirmer T., Jansonius J. N., Zurini M. G. M., Walkinshaw M. D.: *Nature* 361, 91 (1993).
- Vix O., Rees B., Thierry J. C., Altschuh D.: *Proteins* 15, 339 (1993).
- Allen F. H., Kennard O.: *3D Search and Research Using the Cambridge Structural Database*. *Chem. Design Automation News* 8 (1), 1, 31 (1993).
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E.: *Nucleic Acids Res.* 28, 235 (2000).
- Hušák M., Kratochvíl B., Jegorov A., Císařová I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, přijato do tisku.
- Hušák M., Kratochvíl B., Buchta M., Cvak L., Jegorov A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 115 (1998).
- Jegorov A., Cvak L., Husek A., Šimek P., Heydová A., Ondráček J., Pakhomova S., Hušák M., Kratochvíl B., Sedmera P., Havlíček V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65, 1317 (2000).
- Špánek I., Krupčík J.: *Chem. Listy* 94, 10 (2000).
- Spek A. L.: *PLATON, A Multipurpose Crystallographic Tool*. Utrecht University, Utrecht 2000.
- Hušák M., Čejka J., ve sborníku: *European Crystallographic Meeting, ECM-19, Nancy, 25.–31. srpen 2000* (Mulliert G., Torlay L., ed.), poster s3.m1.p1.
- Hušák M., Pakhomova S., Kratochvíl B., Císařová I., Jegorov M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, připravováno do tisku.
- Kratochvíl B., Jegorov A., Pakhomova S., Hušák M., Bulej P., Cvak L., Sedmera P., Havlíček V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 89 (1999).
- Braun W., Kallen J., Mikol V., Walkinshaw M. D., Wüthrich K.: *FASEB J.* 9, 63 (1995).
- Köck M., Müller G., Kessler H.: *Helv. Chim. Acta* 77, 171 (1994).
- Demeule M., Wenger R., Béliveau R.: *J. Biol. Chem.* 272, 6647 (1997).
- Pohl E., Herbst-Irmer R., Sheldrick G. M., Dauter Z., Wilson K. S., Bölsterli J. J., Bollinger P., Kallen J., Walkinshaw M. D.: *Helv. Chim. Acta* 78, 355 (1995).
- Traber R., Hofman H., Loosli H.-R., Ponelle M., von Wartburg A.: *Helv. Chim. Acta.* 70, 13, 1987.
- Havlíček V., Jegorov A., Sedmera P., v knize: *Mass Spectrometry of Cyclosporins* (Atta-ur-Rahman ed.), str. 339. Gordon and Breach Publishers, Amsterdam 2000.

B. Kratochvíl^a, M. Hušák^a, and A. Jegorov^b (^a*Department of Solid State Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*Galena Co., Research Unit, České Budějovice*): **Conformational Flexibility of Cyclosporins**

This review summarizes the present knowledge of conformations of cyclosporins mainly in the solid state. A very small chemical change of the cyclosporin backbone causes a significant change in biological properties. The mechanism of immunosuppressive activity of cyclosporin A is explained on the basis of conformational flexibility of the cyclosporin skeleton. Cyclosporin A adopts three main conformations: the tightly folded one of free cyclosporin in crystals and solution, the open one in the receptor-bound state in cyclosporin complexes with cyclophilin A and the very open one in the cyclosporinFAB (fragment of antibody) complex. A conformational comparison of variously solvated cyclosporin A with its non-immunosuppressive derivatives (cyclosporins E and H) shows some small differences in the system of intramolecular H-bonds of cyclosporin skeletons. The inclusion effect of packed cyclosporin molecules in crystalline cyclosporin clathrates enables preferential crystallization of cyclosporins with various chiral molecules of organic solvents.

SÚBORY MIKROELEKTRÓD S INTERAGUJÚCIMI DIFÚZNYMI VRSTVAMI: ŠPECIÁLNE APLIKÁCIE

PETER TOMČÍK^a, DUŠAN BUSTIN^a
a IVAN NOVOTNÝ^b

^aKatedra analytickej chémie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^bKatedra mikroelektroniky, Elektrotechnická fakulta, Slovenská technická univerzita, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: tomcik@cvt.stuba.sk

Došlo dňa 17.I.2000

Kľúčové slová: interdigitovaný súbor mikroelektrod, titrácia v difúznej vrstve

Obsah

1. Úvod
2. Stanovenie látok titráciou v difúznej vrstve IDA mikroelektrody elektrochemicky generovaným titrantom
 - 2.1. Stanovenie As(III) a tiosíranu elektrochemicky generovaným jódom
 - 2.2. Stanovenie alylalkoholu elektrochemicky generovaným brómom
 - 2.3. Stanovenie amoniaku a jodidov elektrochemicky generovaným brómnanom
3. Záver

1. Úvod

Výhodné vlastnosti súborov mikroelektrod s interagujúcimi difúznymi vrstvami¹ ich robia populárnymi v elektroanalytickej chémii. Je to najmä kvôli veľmi redukovanej kapacitnej zložke prúdovej odozvy kolektorového segmentu, ktorá je navyše pri vhodnej polarizácii amplifikovaná redox cyklováním. Tento jav predurčuje tieto mikroelektrody na selektívne detegovanie elektrochemicky reverzibilných látok po ich separácii v prietokových systémoch HPLC² a na iné voltampérometrické aplikácie^{3,4}.

V poslednom období sa začínajú objavovať práce, v ktorých sa opisuje analytické využitie efektov interdigitovaných súborov (IDA) vyplývajúcich z tesného usporiadania samostatne polarizovateľných mikroelektrodových segmentov.

Na jednom segmente IDA možno galvanostaticky generovať látku, ktorá sa ampérometricky deteguje na druhom segmente po transporte cez medzeru výlučne difúznym spôsobom. Vysoká zberná účinnosť tohto procesu určitým spôsobom zvädza k analógii s rotačnou diskovou elektrodou s prstencom⁵⁻⁸ (RRDE). Prúdová odozva RRDE je síce zosilnená konvekciou analytu za hydrodynamicky stabilných podmienok⁹⁻¹², avšak zberná účinnosť^{13,14} na prstenci pre produkty elektrodovej reakcie, prebiehajúcej na disku je podstatne menšia oproti IDA mikroelektrodám. Navyše šum, ktorý prislúcha mechanickým vibrá-

ciám¹⁵⁻¹⁸ je vysoký. Iný podstatný rozdiel IDA mikroelektrod v porovnaní s RRDE je vzájomné ovplyvnenie difúzných vrstiev. V prípade IDA mikroelektrody možno zameniť detektor s generátorom, kým pri RRDE je ovplyvnená len difúzna vrstva prstenca, a to elektrodovými reakciami na disku.

2. Stanovenie látok titráciou v difúznej vrstve IDA mikroelektrody elektrochemicky generovaným titrantom

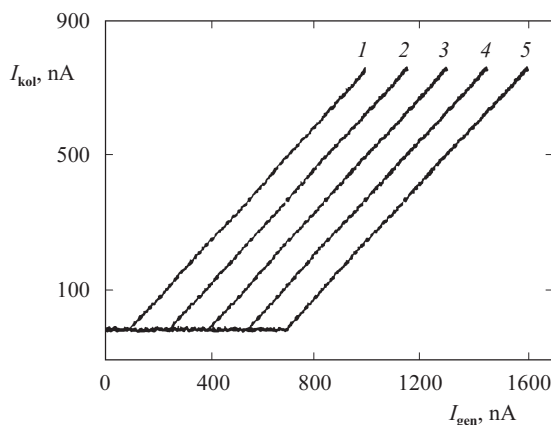
Ako sa v úvode spomenulo, možno urobiť analógiu medzi IDA mikroelektrodami a rotačnou diskovou elektrodou s prstencom (RRDE), ktorá sa často využíva v analytickej chémii na stanovenie elektroinaktívnych látok titráciou v difúznej vrstve^{19,20}. Pri tejto metóde sa využíva rýchla a kvantitatívna reakcia produktu elektrolýzy s titrovanou látkou, ktorá je na povrch kolektora (prstenca) transportovaná vynútenou konvekciou. Ak sa z roztoku generuje na disku konštantným prúdom titrant²¹, prúd na prstenci sa zväčšuje priamoúmerne diskovému prúdu, pričom potenciál prstenca musí byť nastavený na hodnotu, ktorá zodpovedá limitnému difúznemu prúdu opačnej elektrodovej reakcie k reakcii prebiehajúcej na disku. Ak sa do roztoku pridá látka (titrand), ktorá bude rýchlo a kvantitatívne reagovať s generovaným titrantom, titrant sa nedostane k prstencu a nespôsobí na ňom prúd. Prúd začne vzrastať až vtedy, keď rýchlosť generácie titrantu (daná prúdom na disku) bude väčšia ako rýchlosť transportu titrandu k rotujúcemu povrchu (miestu titračnej reakcie). Toto posunutie začiatku vzrastu prstencového prúdu („titračná“ zberná účinnosť) sa využíva na stanovenie koncentrácie prídávanej látky (titrandu).

Pri IDA mikroelektrodách možno teda jeden segment stožňiť s diskom a druhý s prstencom. Pri RRDE látka môže byť generovaná len na disku, hoci principiálne je možná generácia titračného činidla aj na prstenci, ale konvektívny transport ho nikdy netransportuje na disk, čo znemožní jeho detekciu. Podstatný rozdiel je však v zberných účinnostiach. Pokiaľ na RRDE možno dosiahnuť zbernú účinnosť cca 40 %, na IDA mikroelektrodách je táto hodnota omnoho vyššia a závisí od geometrie IDA mikroelektrody. Tento fakt výrazne ovplyvňuje citlivosť merania. Ďalej možno konštatovať, že čím je šírka medzery medzi segmentmi IDA mikroelektrody väčšia, tým sú požiadavky na rýchlosť reakcie menšie. Je to určitá analógia s uhlovou rýchlosťou otáčania RRDE.

2.1. Stanovenie As(III) a tiosíranu elektrochemicky generovaným jódom

Zberná účinnosť sa študovala pomocou pomocou elektrochemického redox systému I_3^-/I^- , pretože na platinovej elektrode sa správa reverzibilne. Elektrochemická oxidácia prebieha prakticky so 100 % účinnosťou v širokom rozsahu prúdových hustôt.

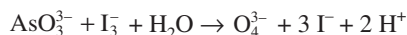
Zberná účinnosť je smernica závislosti kolektorového prú-



Obr. 1. Titračné krivky titrácie As(III) v difúznej vrstve IDA mikroelektrody elektrochemicky generovaným jódom²²; objemová koncentrácia As(III): 1 – $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol.dm⁻³, 2 – $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³, 3 – $2,25 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³, 4 – $3,0 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³, 5 – $3,75 \cdot 10^{-4}$ mol.dm⁻³, zloženie roztoku: 0,01 M-KI a 1 M-NaHCO₃, objem roztoku 10 ml

du (I_{coll}) pri potenciáli limitného difúzneho prúdu redukcie jódu od prúdu generátora (I_{gen}), ktorý sa vnucuje galvanostaticky pri meraní „bod po bode“ alebo veľmi pomalým prúdovým scanom 1 nA.s⁻¹.

Prenos jódu na kolektor sa ovplyvní, ak sa do roztoku pridá As (III) (cit.²²). Toto ovplyvnenie sa prejaví zmenou závislosti I_{gen} od I_{coll} . As (III) je elektrochemicky inaktívny pri potenciáli generácie jódu. Keďže reakcia arzénu s jódom je rýchla a kvantitatívna, povrchová koncentrácia jódu na generátore bude nulová dovtedy, kým je tok odchádzajúceho jódu väčší ako tok prichádzajúceho arzénu. Tvar závislosti I_{gen} od I_{coll} je funkciou koncentrácie arzénu a táto zmena sa môže použiť na jeho stanovenie, ktoré je založené na rovnici:



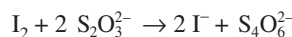
Rovnováha tejto vratnej reakcie môže byť posunutá doprava viazaním vodíkových protónov s HCO₃⁻. Preto sa ako základný elektrolyt používa 1 M-NaHCO₃.

Závislosť I_{coll} od I_{gen} je vlastne titračná coulometrická krivka titrácie v difúznej vrstve, keď generátor produkuje titrant a kolektor sa správa ako ampérometrický detektor ekvivalentného bodu. Titračné krivky pre rôzne koncentrácie arzénu sú na obr. 1. Extrapoláciou lineárnej časti titračnej krivky s hodnotou zvyškového prúdu na kolektore sa získa hodnota prúdu generátora v ekvivalentnom bode I_{genE} , ktorý je lineárnou funkciou koncentrácie As(III). Ak v objemovej fáze roztoku neprebíha žiadna iná chemická reakcia, „titrácia“ sa môže opakovať mnohokrát s veľmi dobrou reprodukovateľnosťou tvaru titračnej krivky. Štatistickou analýzou závislosti I_{genE} od koncentrácie, ktorá je vlastne kalibračnou krivkou, metódy vychádza podľa trojsigmového kritéria odhad detekčného limitu $2 \cdot 10^{-6}$ mol. dm⁻³. Pri daných experimentálnych podmienkach (objem vzorky 10 ml) to predstavuje 5 µg As.

Medza stanovenia absolútneho množstva arzénu sa môže ešte znížiť zmenšením analyzovaného objemu. Ak sa podarí znížiť množstvo analyzovaného roztoku na 10 µl, čo je v súčasnosti ľahko dosiahnuteľné, potom možno očakávať medzu stanovenia na úrovni nanogramov.

Na stopovú analýzu vzoriek arzénu sa používajú aj iné analytické metódy. Medza stanovenia atómovej spektrometrie závisí od použitej techniky. Medza stanovenia IDA metódy je porovnateľná s hydridovou metódou ICP (cit.²³) a s klasickou AAS (cit.²⁴). Je dokonca citlivejšia ako plameňová AAS, titrácia v difúznej vrstve RRDE alebo ako metóda rádioaktívácie²⁵. Avšak žiadna z týchto metód nedosahuje takú citlivosť ako elektrochemická rozpúšťacia analýza As na zlatej elektróde²⁶ alebo atómová absorpčná analýza s elektrotermickou atomizáciou²⁷.

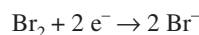
Na podobnom princípe je založené aj stanovenie tiosíranu. Chemická reakcia tiosíranu s jódom



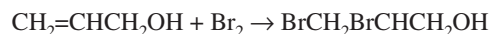
je rýchla a kvantitatívna. Vyhodnotenie výsledkov je obdobné ako pri stanovení arzénu. Odhad detekčného limitu je $2 \cdot 10^{-7}$ mol.dm⁻³ Na₂S₂O₃. Pri objeme vzorky 10 ml to predstavuje 1 µg tiosíranu sodného, čo je asi 350 krát menej v porovnaní s RRDE titráciou nakoľko tok látky je za hydrodynamických podmienok omnoho vyšší než na IDA mikroelektrode. Tomu zodpovedá aj nižšia medza stanovitelnosti RRDE v prípade stanovenia tiosíranu sodného. Avšak 1000 násobné zníženie analyzovaného objemu môže vykompenzovať aj tento handicap IDA titrácie Na₂S₂O₃ v difúznej vrstve. Takto sa môže stanoviť obsah tiosíranu resp. látok reagujúcich s jódom v napr. v čistých chemikáliách jodidu draselného²⁸.

2.2. Stanovenie alylalkoholu elektrochemicky generovaným brómom

Pri použití roztoku 0,18 mol.dm⁻³ KBr v 1,13.10⁻³ mol.dm⁻³ HClO₄ sa namerala hodnota zbernej účinnosti 0,84. Potenciál kolektora bol fixovaný na hodnote 0,1 V vs. SCE, ktorá zodpovedá opačnej elektrochemickej reakcii než na generátore



Dynamický charakter titrácie v difúznej vrstve na RRDE vyžaduje nielen veľkú hodnotu rovnovážnej konštanty, ale aj vysokú rýchlosť chemickej reakcie. Ak bude v roztoku alylalkohol, ktorý spotrebúva vygenerovaný bróm nastane komplikovanejšia situácia ako v prípade titrácie As (III) a Na₂S₂O₃, lebo adícia brómu na dvojité väzby nenasýtených uhľovodíkov je oveľa pomalšia. Na rozdiel od titrácií As (III) a Na₂S₂O₃ koncentrácia brómu a alylalkoholu na hranici ich dominantných oblastí bude rôzna od nuly. Bróm bude zasahovať do dominantnej oblasti alylalkoholu a naopak. Počiatočné stúpanie titračnej krivky je teda pozvoľnejšie ako v prípade kinetiky rýchlych reakcií. U kineticky pomalých reakcií nameriame „kinetickú“ zbernú účinnosť, ktorá je funkciou uhlovej rýchlosti otáčania RRDE (cit.²⁸⁻³¹). Túto závislosť možno využiť na stanovenie rýchlostnej konštanty titračnej reakcie



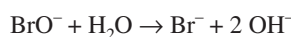
Táto konštant³² je rovná $2 \cdot 10^{-5}$ dm³.mol⁻¹.s⁻¹ a je v dobrej zhode s hodnotou získanou potenciometrickou metódou³³.

Titračné krivky na IDA mikroelektrode namerané pri rôz-

nych koncentráciách alylkoholu majú však rovnaký tvar ako pri titracii arzénu a tiosíranu a nevykazujú žiadne zakrivenie v mieste vzostupu kolektorového prúdu ako je to v prípade RRDE. Absencia zakrivenia titračnej krivky titrácie alylkoholu v difúznej vrstve IDA mikroelektrody elektrochemicky generovaným brómom umožňuje také isté vyhodnotenie výsledkov ako tomu bolo v prípade As(III) a $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a predstavuje istú výhodu oproti technike na RRDE. Odhad detekčného limitu je $4,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ alylkoholu, čo predstavuje 3 μg stanovovanej látky v objeme 10 ml (cit.³⁴).

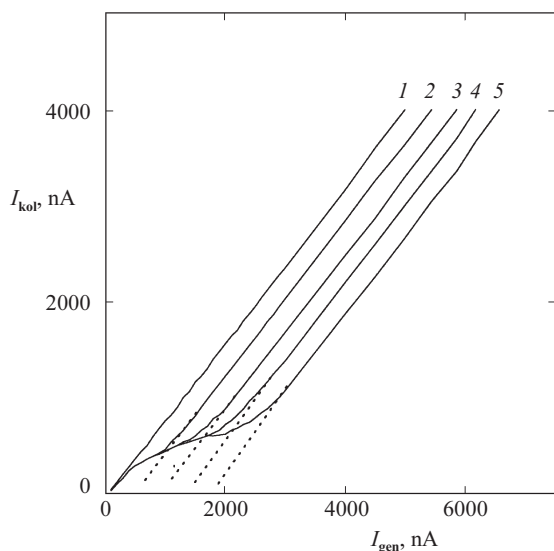
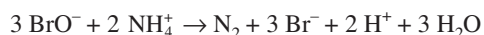
2.3. Stanovenie amoniaku a jodidov elektrochemicky generovaným brómnanom

Brómnan sa generoval tak ako aj ostatné titračné činidlá galvanostatickou polarizáciou generátorového segmentu IDA mikroelektrody. Kolektorový segment sa polarizoval konštantným potenciálom 0,0 V vs. SCE, zodpovedajúcim limitnému difúznemu prúdu brómnanu. Jeho detekcia je založená na reakcii



Aj v tomto prípade je hodnota zbernej účinnosti (0,849) omnoho vyššia než zberná účinnosť nameraná na RRDE.

Katión NH_4^+ je elektroinaktívny a prenos brómnanu z generátora na kolektor bude ovplyvnený tak ako v prípade As(III), lebo jeho titračná reakcia je kvantitatívna a veľmi rýchla. Potom závislosti I_{coll} vs. I_{gen} (titračné krivky) budú dobre reprodukovateľné a budú mať rovnaký tvar ako v predchádzajúcich prípadoch. Možno ich teda použiť na stanovenie amónnych solí založené na chemickej reakcii

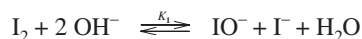


Obr. 2. Titrčné krivky titrácie jodidu v difúznej vrstve IDA mikroelektrody elektrochemicky generovaným brómnanom³⁵, objemová koncentrácia jodidu: 1 – 0, 2 – $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 3 – $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 4 – $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 5 – $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, zloženie roztoku: 1 M-KBr s prídavkom tetraboritanu sodného pH 7,9, objem roztoku 10 ml

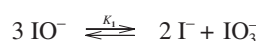
Odhad detekčného limitu podľa trojsigmového pravidla je $2,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, čo zodpovedá pri objeme vzorky 10 ml asi 0,40 μg amónnej soli. Touto metódou sa stanovoval amoniak v riečnej vode³⁵.

Pri stanovení jodidov sa titračné krivky (obr. 2) brómnanu (závislosť I_{coll} od I_{gen}) zmenili po prídavku iónov Γ^- pre nízke hodnoty I_{gen} , zatiaľčo pre stredné hodnoty sa vzrast kolektorového prúdu spomaľuje a závislosť vykazuje inflexný bod. Po tomto bode závislosť je už podobná titračnej krivke bez jodidu.

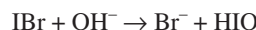
Pomerne komplikovaný tvar titračnej krivky pri titracii jodidu elektrochemicky generovaným brómnanom je dôsledkom elektrochemickej tvorby jódu z jodidu. Jód je katodicky aktívny na kolektorovom segmente IDA mikroelektrody navyše v slabo alkalických roztokoch podlieha disproporcionácii:



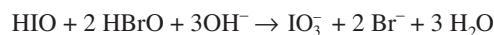
Rovnovážna konštanta³⁶ tejto reakcie je rovná $K_1 = [\text{IO}^-][\Gamma^-]/[\text{I}_2][\text{OH}^-] = 30$. Reakcia je rýchla³⁷ ($k_1 = 1 \cdot 10^{10} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Za normálnej teploty vzniknutý jódnan reaguje ďalej:



Rovnovážna konštanta tejto reakcie $K_2 = 10^{20}$ spôsobuje tvorbu jodidu a jodičnanu. Avšak v roztoku bromidu je stabilita I(I) vyššia, a preto sa môže tvoriť IBr (pri pH 7,9 je prevládajúca forma I(I) HIO s hodnotou pK 11). A preto je rovnováha reakcie

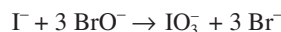


posunutá doprava. Pri vyšších hodnotách I_{gen} brómnan vzniknutý na generátore reaguje s katodicky aktívnym HIO za tvorby elektroinaktívneho IO_3^- .



Až po celom premenení jodidu na jodičnan sa elektrochemicky generovaný brómnan redukuje na kolektore (rastúca časť titračnej krivky pri vyšších hodnotách I_{gen} na obr. 2). Hodnota I_{genE} sa získa ako priesečník lineárnej časti titračnej krivky a zvyškového prúdu kolektora.

V mierne zásaditom prostredí sa jodidy oxidujú elektrochemicky generovaným brómnanom podľa rovnice



Optimálne pH titrácie je podľa coulometrických experimentov v oblasti 8,7 až 9,0. Presné výsledky sa dosiahnu aj pri pH 7,9. Veľký nadbytok chloridov a jodičnanov neruší stanovenie. Odhad detekčného limitu je $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pri objeme vzorky to predstavuje 0,8 μg jodidu draselného. Metóda je preto vhodná na stanovenie jodidov v kuchynskej soli a v čistých chemikáliách jodičnanu^{35,38}.

4. Záver

Vysokú zbernú účinnosť IDA mikroelektrody možno využiť na stanovenie látok titraciou v difúznej vrstve namiesto

RRDE. Na jednom segmente možno galvanostaticky generovať titračné činidlo a na druhom indikovať bod ekvivalencie. Z elektrochemicky generovaných titrantov sa vzhľadom na stabilitu IDA systému osvedčil jód, bróm a brómnan, ktorý vzniká disproporcionáciou brómu generovaného z bromidu v slaboalkalickom prostredí. Takýmto spôsobom možno stanoviť elektroinaktívne látky, rýchlo reagujúce s titrantom (arzen, tiosíran, amoniak) alebo s pomalšou titračnou reakciou (allylalkohol), prípadne elektroaktívne látky (jodidy). Detekčné limity sú v oblasti 10^{-6} – 10^{-7} mol.dm⁻³ a vzhľadom na malý rozmer IDA systému prichádza do úvahy aj mikroanalytické využitie.

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

LITERATÚRA

- Tomčík P., Jursa S., Bustin D., Tvarožek V.: Chem. Listy 92, 626 (1998).
- Tomčík P., Bustin D., Tvarožek V.: Chem. Listy 93, 678 (1999).
- Bustin D., Mesároš Š., Tomčík P., Rievaj M., Tvarožek V.: Anal. Chim. Acta 305, 121 (1995).
- Mesároš Š., Vaňková Ž., Mesárošová A., Tomčík P., Grunfeld S.: Bioelectrochem. Bioenerg. 46, 33 (1998).
- Frumkin A. N., Nekrasov L. N.: Dokl. Akad. Nauk SSSR 126, 115 (1959).
- Frumkin A. N., Nekrasov L. N., Levič V. G., Ivanov J. B.: J. Electroanal. Chem. 1, 84 (1959).
- Ivanov J. B., Levič V. G.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR 126, 1029 (1959).
- Fujishima A., Iketani M., Honda K.: Bull. Chem. Soc. Jpn. 43, 3949 (1970).
- Albery W. J., Ulstrup J.: Electrochim. Acta 13, 281 (1968).
- Albery W. J.: Trans. Faraday Soc. 62, 1915 (1966).
- Daguenet M.: Int. J. Heat Mass Transfer 11, 1581 (1968).
- Daguenet M., Epelboin I., Vanhaecht J.: Compt. Rend. 265, 319 (1967).
- Albery W. J., Bruckenstein S.: Trans. Faraday Soc. 62, 2584 (1966).
- Albery W. J., Hitchman M. L., Ulstrup J.: Trans. Faraday Soc. 64, 2831 (1968).
- Delimarskij J. K., Penkalo I. I.: Ukr. Khim. Zhur. 36, 1279 (1970).
- Bardin M. B., Dikusar A. I.: Electrochim. Acta 6, 1147 (1970).
- Schwarz W. M., Shain I.: Anal. Chem. 35, 1770 (1963).
- Napp D. T., Johnson D. C., Bruckenstein S.: Anal. Chem. 39, 481 (1967).
- Bruckenstein S., Johnson D. C.: Anal. Chem. 36, 2186 (1964).
- Albery W. J., Bruckenstein S., Johnson D. S.: Trans. Faraday Soc. 62, 1938 (1966).
- Pons S., Fleischmann M.: Anal. Chem. 59, 1391A (1987).
- Tomčík P., Jursa S., Mesároš Š., Bustin D.: J. Electroanal. Chem. 423, 115 (1997).
- Nakahara T.: Anal. Chim. Acta 131, 73 (1981).
- Ikeda M., Nishibe J., Nakahara T.: Bunseki Kagaku 30, 368 (1981).
- Rakovski E. E., Krylova T. D., Frolova A. Yu.: Zh. Anal. Khim. 36, 1085 (1981).
- Ievaj M., Mesároš Š., Bustin D.: Ann. Quim. 90, 209 (1994).
- Bodewig F. G., Valenta P., Nürnberg H. W.: Fresenius' J. Anal. Chem. 311, 187 (1982).
- Albery W. J., Bruckenstein S.: Trans. Faraday Soc. 62, 1946 (1966).
- Shurig H., Heusler K. E.: Z. Anal. Chem. 224, 45 (1967).
- Breitenbach M., Heckner K. H.: J. Electroanal. Chem. 33, 45 (1971).
- Albery W. J., Bruckenstein S.: Trans. Faraday Soc. 62, 2596 (1966).
- Bell R. P., Atkinson J. R.: J. Chem. Soc. 1963, 3260.
- Albery W. J., Hitchman M. L., Ulstrup J.: Trans. Faraday Soc. 65, 1101 (1969).
- Bustin D., Jursa S., Tomčík P.: Analyst 121, 1795 (1996).
- Tomčík P., Mesároš Š., Bustin D.: Anal. Chim. Acta 374, 283 (1998).
- Cotton F. A., Wilkinson G.: *Anorganická chemie*, str. 554. Academia, Praha 1973.
- Eigen M., Kustin K.: J. Am. Chem. Soc. 84, 1355 (1962).
- Mocák J., Bustin D. I., Kmeťová J.: Anal. Chim. Acta 76, 433 (1975).

P. Tomčík^a, D. Bustin^a, and I. Novotný^b (^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, ^bDepartment of Microelectronics, Faculty of Chemical Engineering, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic): **Microelectrode Arrays with Interacting Diffusion Layers: Special Applications**

The review deals with special applications of interdigitated array (IDA) microelectrodes. A high collection efficiency in comparison with RRDE (rotatory ring disc electrode) can be used for the determination of species by titration in the diffusion layer of an IDA system. The titrant (iodine, bromine, and hypobromite) is galvanostatically generated on one IDA segment and another segment serves as an amperometric detector with constant potential, which corresponds to the opposite reaction to that of titrant electrochemical generation. The method is simple, sensitive to the species (ammonium, arsenic, thiosulfate, allyl alcohol, iodide) and can also be used in microanalysis.

MORFOLIN-2,5-DIONY – JEJICH PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ

JARMILA VINŠOVÁ

Farmaceutická fakulta, Karlova Univerzita, Heyrovského
1203, 500 05 Hradec Králové

Došlo dne 10.I.2000

Klíčová slova: morfolin-2,5-dion, depsipeptid, hydroxykyselina, aminokyselina

Obsah

1. Úvod
2. Cyklizace tvorbou esterové vazby
 - 2.1. Cyklizace *N*-(α -halogenacyl)- α -aminokyselin
 - 2.2. Cyklizace *N*-(α -hydroxyacyl)- α -aminokyselin
 - 2.3. Vnitřní reesterifikace
 - 2.4. Mitsunobuova metoda
 - 2.5. Použití pevné fáze
 - 2.6. Další přípravy
3. Cyklizace (aminolýza) *O*-aminoacyl- α -hydroxykyselin
4. Farmaceutické využití morfolin-2,5-dionů
 - 4.1. Příprava polymerů
 - 4.2. Transportní systémy léčivých látek
 - 4.3. Jiné

1. Úvod

Morfolin-2,5-diony jsou depsipeptidová analoga cyklodipeptidů, derivátů piperazin-2,5-dionů. Cyklodipeptidy jsou připravovány bez obtíží, tvoří se většinou spontánně, částečnou aktivací karboxylu příslušného lineárního dipeptidu, např. esterifikací. V cyklodipeptidech jsou obě amidové vazby uspořádány *cis*. V tomto případě termodynamická stabilita 6-členných cyklů kompenzuje energii požadovanou pro *cis*→*trans* přesmyk, při němž je třeba překonat bariéru částečně dvojnásobného charakteru amidové vazby¹. Morfolin-2,5-diony se mohou tvořit analogicky k piperazin-2,5-dionům uzavíráním cyklu tvorbou amidové nebo esterové vazby. Z toho vyplývá

dvojitý obecný přístup k cyklizaci a rovněž rozdílná příprava lineárního depsipeptidu, který je buď *O*-aminoacyl- α -hydroxykyselina nebo *N*-(α -hydroxyacyl)- α -aminokyselina.

Uplatňují se především jako stavební jednotky pro přípravu polymerních analogů peptidů a polylaktidů, s cílem nalézt lepší vlastnosti biomateriálů lehce vstřebatelných v organismu. Vzhledem k rozdílnému štěpení amidové a peptidové vazby se studuje jejich použitelnost jako nosičů aktivní látky, prolečiv, jsou rovněž používány jako substráty proteolytických enzymů.

2. Cyklizace tvorbou esterové vazby

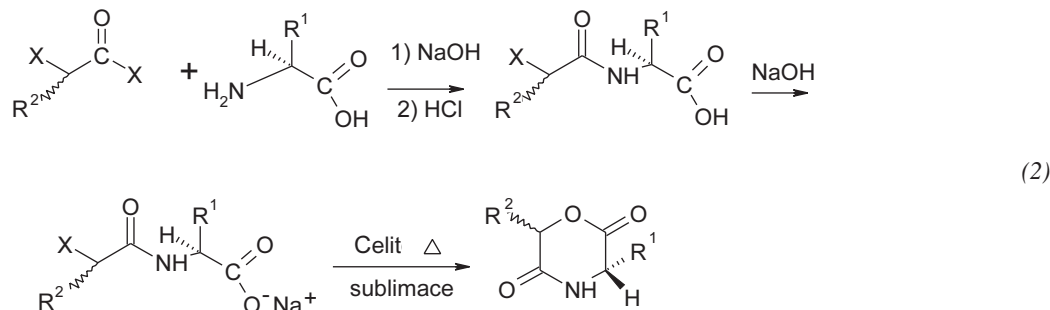
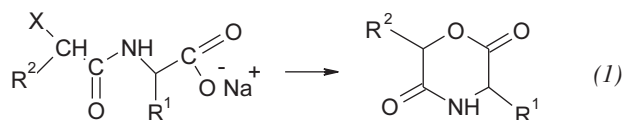
2.1. Cyklizace

N-(α -halogenacyl)- α -aminokyselin

První zmínka týkající se přípravy 6(*R,S*)-methylmorfolin-2,5-dionu je v práci Chadwicka a Pascu². Autoři vycházeli ze sodné soli *N*-(2-bromopropanoyl)glycinu. Vakuovou destilací při tlaku 0,2 kPa a teplotě 150 °C odsublikoval cyklický depsipeptid, který snadno hydrolyzoval ve vodném prostředí na laktylglycin. Podobně Cook, Cox a Farmer³ a někteří další autoři⁴⁻⁶ připravili 3-, 4- nebo 6-alkylsubstituované morfolin-2,5-diony sublimací z odpovídajících solí *N*-(α -halogenacyl)- α -aminokyselin (1).

Fung a Glowaky⁷ popsali syntézu 3-substituovaných morfolin-2,5-dionů cyklizací *N*-(α -chloracyl)- α -aminokyselin v *N,N*-dimethylformamidu a triethylaminu ve velkém zředění. Barrera a spol.⁸ cyklizují α -(halogenacyl)- α -aminokyseliny za refluxu v chloroformu za přítomnosti ethyl(dipropyl)aminu.

In't Veld a spol.⁹ připravili cyklické depsipeptidy s funkčními skupinami v postranním řetězci také touto cestou. Výhodou této metody je snadný přístup k prekursoru acylací α -aminokyseliny α -halogenacylchloridy. Nevýhodou ovšem je, že během cyklizace dochází k racemizaci. Morfolin-2,5-dionové deriváty byly připraveny suchým zahříváním za sníženého



tlaku na matrici celitu, z níž byl cykloderivát odsublimován⁶. Přidáním celitu se zvětší povrch reakční směsi, tím se umožní snazší sublimace (2).

Cyklizace *N*-(2-halogenacyl)-aminokyseliny s triethylaminem nebo uhlíčanem cesným v *N,N'*-dimethylformamidu při 100 °C, nebo oxidu stříbrného v 1,4-dioxanu při 20 °C po dobu 2 dnů vede k nízkým výtěžkům¹⁰.

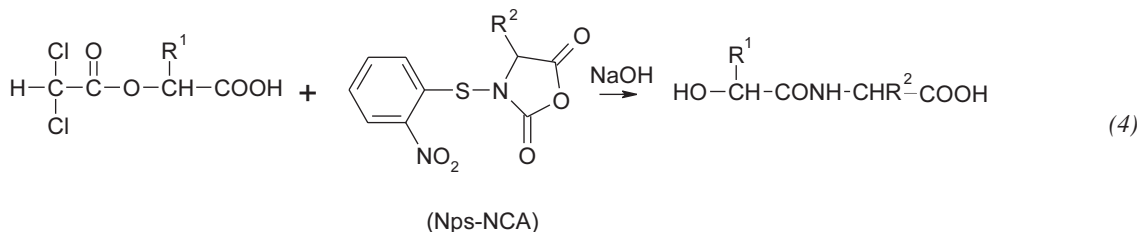
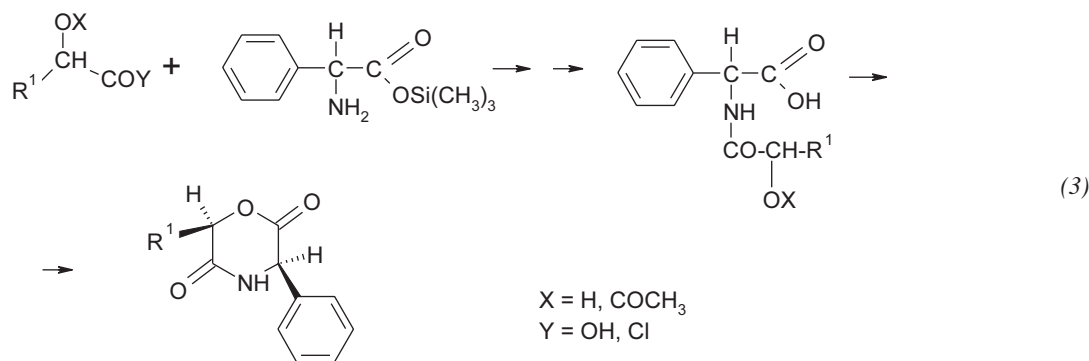
2.2. Cyklizace

N-(α -hydroxyacyl)- α -aminokyselin

Hartwig a Schöllkopf¹¹ jako první popsali kysele katalyzovanou cyklizaci *N*-(α -hydroxyacyl)- α -aminokyselin za bezvodých podmínek a přítomnosti methansulfonové kyseliny. Vzhledem k tomu, že v této intramolekulární cyklizaci jsou zahrnuta stereocentra, bylo očekáváno, že bude získán z opticky čistého prekursoru enantiomerně čistý morfolin-2,5-dionový derivát. Experimentální výsledky ovšem potvrdily nízký stupeň racemizace na C-6. Nebylo zjištěno, zda k racemizaci dochází v cyklizačním kroku nebo při syntéze meziproductů, za použití aktivačních a chránících skupin (3).

Jöres se spol.¹² prezentují nový syntetický přístup u něhož není třeba ani chránících skupin ani aktivace. Patentovaný přístup k opticky aktivním *N*-(α -hydroxyacyl)- α -aminokyselinám vychází z esteru hydroxykyseliny, který je míchán při 80 °C se sodnou solí aminokyseliny po dobu 18 a více hodin za azeotropního odstranění vody na molekulovém sítu¹³. Cyklizace opticky aktivních morfolin-2,5-dionů je prováděna přímo z hydroxykyselin nebo jejich ethylesterů. Ze sodné soli *N*-(α -hydroxyacyl)- α -aminokyseliny byla uvolněna hydroxyaminokyselina na iontoměničce a cyklizována v dichlormethanu za katalýzy methansulfonové kyseliny. Spontánní cyklizace za sníženého tlaku a zvýšené teploty po dobu 6 dnů je popsána rovněž v několika případech^{14,15}.

K cyklizaci jak makrocyclů tak i hydroxyacylaminokyseliny bylo použito s úspěchem též činidlo BOP (benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-fosfonium hexafluorofosfát¹⁶.



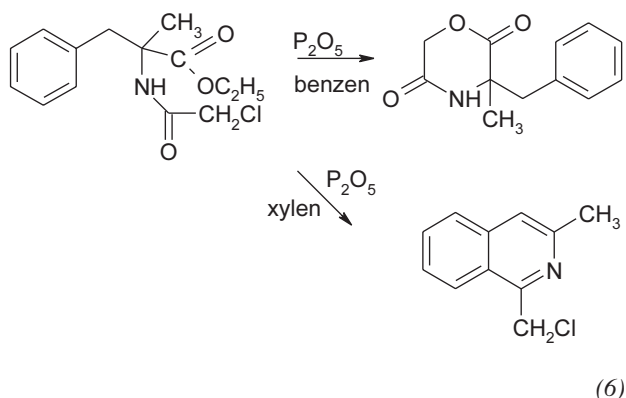
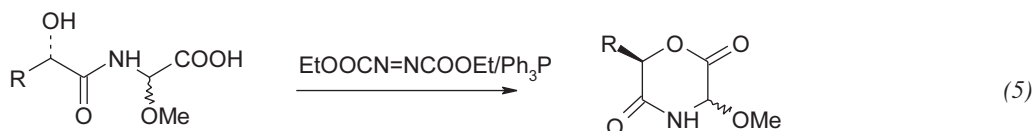
2.3. Vnitřní reesterifikace

Vzhledem k obtížné rozpustnosti hydroxyaminokyseliny v organickém rozpouštědle z něhož lze odnímat vznikající vodu, byla tato převedena (několikahodinovou) esterifikací na příslušný ester a ester cyklizován vnitřní reesterifikací ve směsi toluen-chloroform za katalýzy silně kyselého iontoměniče (Amberlyst) nebo methansulfonové kyseliny v Soxhletově extraktoru naplněném molekulovým sítem 4A po dobu 76 hod.

Japonský autor Katakai¹⁷ používal dichloroacetyl (Dca) skupinu jako vhodnou chránící skupinu pro hydroxykupinu hydroxykyselin a 2-nitrofenylsulfenyl-*N*-karboxy- α -aminoanhydridy (Nps-NCAs)¹⁸ jako vysoce reaktivní aminokyselinové deriváty k acylaci hydroxysloučenin. Deprotekce těchto skupin neovlivňuje esterové ani amidové seskupení (4).

Depsipeptidový monomer byl rovněž připraven za použití (Nps-NCA)- α -aminokyseliny s hydroxykyselinou bez chránění OH-skupiny^{19,20}. Tvorba depsipeptidové vazby mezi aminokyselinami obsahujícími nepolární vedlejší řetězec a kyselinou mléčnou může být provedena *N,N'*-karbodiimidazolem (CDI), který umožňuje spojení karboxylové skupiny *N*-chráněné aminokyseliny s hydroxykupinou benzylesteru kyseliny mléčné. Benzylesterová skupina se odstraní v dalším kroku katalytickou hydrogenací. Kondenzace *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidem (DCC) a chránění karboxylové skupiny převedením na benzylester nelze použít v syntéze depsipeptidů obsahujících glutamovou kyselinu, lysin nebo methionin (a jiné sirmé aminokyseliny). Proto byl navržen alternativní postup syntézy zahrnující kondenzaci bez chránění koncové C-karboxylové skupiny. Aktivní ester používající *N*-hydroxysukcinimid (ONSu) je pro kondenzaci s hydroxykyselinou neúčinný. Hydroxykupina je méně nukleofilní nežli aminoskupina aminokyseliny. Proto bylo s úspěchem využito aktivace pomocí NCAs.

Nakamura²¹ popsal cyklizaci *N*-(α -hydroxyacyl)- α -aminoesterů v roztoku tetrahydrofuranu nebo toluenu na katalý-



zátoru při 150–350 °C. Syntéza meziproduktů vycházela z α -hydroxykyselin a hydrochloridů esterů α -aminokyselin za použití DCC jako aktivačního činidla pro kondenzaci.

Goodman se spolupracovníky²² použili pentachlorofenylestery jako aktivní estery a ty intramolekulární transesterifikací poskytly morfolin-2,5-dionové deriváty. Tato metoda nevedla k racemizaci, obě centra zůstala opticky aktivní. Její nevýhodou je však použití poměrně komplikovaných aktivačních a chránících skupin a hlavně velice nízké výtěžky (4–10 %). Nízké výtěžky, všeobecně pozorované při cyklizacích, jsou dány pravděpodobně vysokou *trans/cis* bariérou pro nealkylovanou amidovou vazbu. Bariéra rotace kolem C–N vazby je přibližně 90 kJ.mol⁻¹ (cit.²³). Ve většině acyklických amidů je predominantní *trans*-konfigurace CONH-skupiny, proto je potřebí drastických podmínek pro tvorbu morfolin-2,5-dionů (vysoká teplota, tlak, dlouhá reakční doba).

2.4. Mitsunobuova metoda

Cyklizace *N*-hydroxyacylaminokyselin za podmínek Mitsunobuovy metody probíhá S_N2 mechanismem za inverze konfigurace. Reakce probíhá za nízké teploty pod argonem. *N*-Hydroxyacylaminokyselina reaguje s trifenyfosfoniou solí vzniklou reakcí trifenyfosfinu s diethylazodikarboxylátem v absolutním tetrahydrofuranu (5) (cit.²⁴). Vzniklý *trans*-izomer je čištěn chromatografií.

2.5. Použití pevné fáze

Pevná fáze se stala rutinní záležitostí pro syntézu biopolymerů jako jsou peptidy²⁵, nukleotidy a oligosacharidy. Pro depsipeptidy je obecná metodika v současné době teprve vyvíjena. Na nosiči byla tvořena pouze peptidová vazba a esterová vazba byla tvořena v roztoku²⁶. Kuisle a spol.²⁷ prezentují novou automatickou syntézu depsipeptidů na pevné fázi na Wangově pryskyřici. K chránění α -hydroxyskupiny použili její převedení na tetrahydropyranylester (THP). Uvolnění depsipeptidu z nosiče bylo provedeno *p*-toluensulfonovou kyselinou. Při této metodě nebyla zjištěna ani racemizace ani deprotektace během syntézy. K cyklizaci byla použita Mitsunobuova reakce²⁸.

2.6. Další přípravy

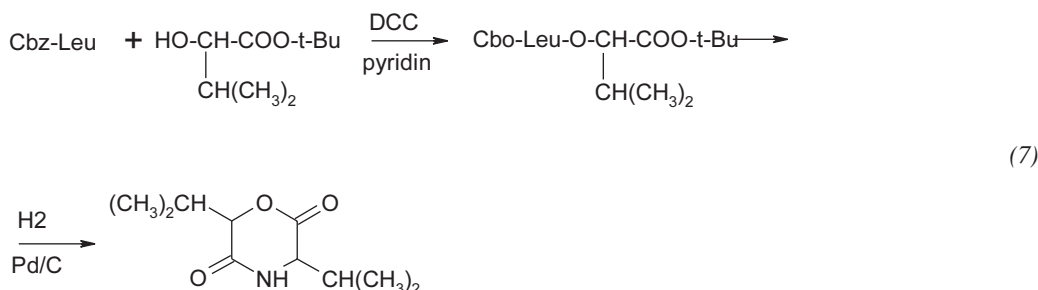
3-Benzyl-3-methylmorfolin-2,5-dion byl připraven v nízkých výtěžcích rovněž Bischlerovou-Napieralského reakcí z ethyl- α -methyl- α -chloracetamido- β -fenypropionátu²⁹. Zahřátí ve vroucím xylenu za přítomnosti oxidu fosforečného vedlo k isochinolinu (6).

3. Cyklizace (aminolýza)

O-aminoacyl- α -hydroxykyselin

Příprava esterů *N*-chráněných aminokyselin kondenzací pomocí DCC je ve srovnání s přípravou peptidové vazby méně snadná. Doporučuje se přítomnost chloridu měďného³⁰ nebo pyridinu³¹. Tak *N*-benzyloxykarbonylleucin (Cbz-Leu) byl přidán ke směsi *tert*-butylesteru hydroxykyseliny, např. α -hydroxyisovalerové kyseliny a DCC v etherickém roztoku pyridinu. Hydrogenolýzou se odstranila Cbz-skupina a ester depsipeptidu se destiloval za pomalé cyklizace na 3,5-diisopropylmorfolin-2,5-dion³² (7).

Jiným způsobem je příprava *N*-chráněného depsipeptidu, který se převede na *N*-hydroxysukcinimidester, ten po odbourání benzyloxykarbonylové skupiny působením bromovodíku v kyselině octové a následnou deprotonizací vzniklého hydrobromidu triethylaminem (TEA) cyklizuje v žádaný produkt. (Alternativní způsob cyklizace je pomocí DCC.)



Glykolátové a laktátové estery aminokyselin byly připraveny esterifikací *N*-chráněných aminokyselin podle následujícího schématu (8).

Bylo zjištěno, že v přítomnosti methanolu a vody, nebo triethylaminu a pyridinu dochází k hydrolyze esterové vazby uvnitř molekuly³³.

Shemiakin a spol.³⁴ připravili morfolin-2,5-diony intramolekulární kondenzací chloridů *O*-(α -aminoacyl)- α -hydroxykyselin jako prekursorů.

Esterová vazba hydroxykyselin byla také vytvořena z příslušných *N*-karboxyanhydridů anebo z pentachlorofenylesteru *Nps*-aminokyselin, deblokace byla provedena za standardních podmínek (HCl/dioxan) (9).

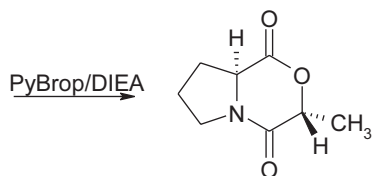
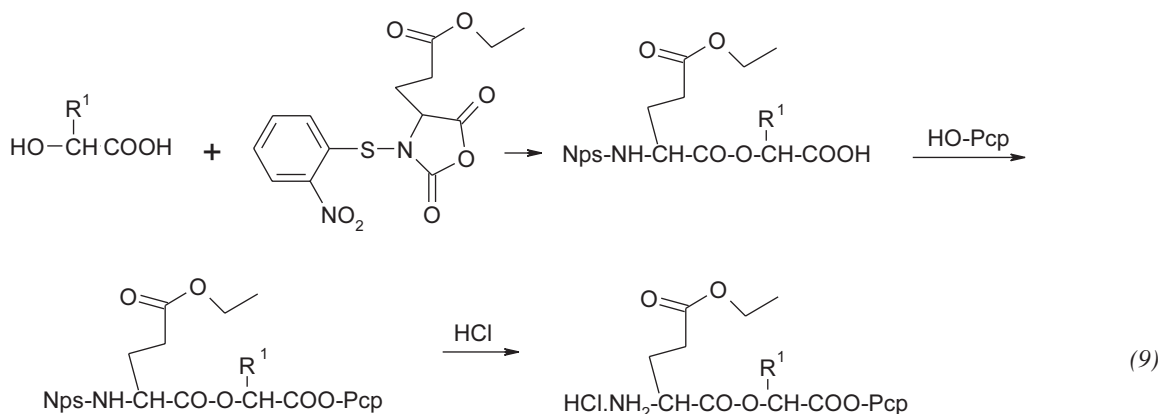
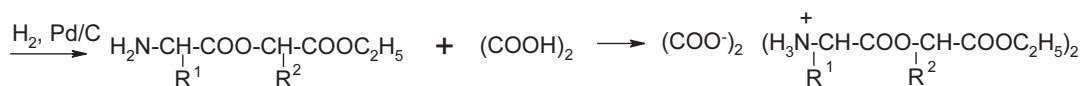
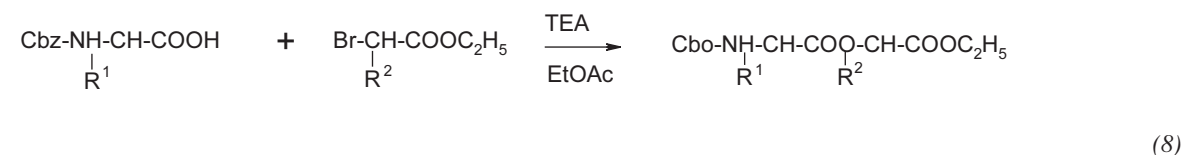
Nissen, Gilon a Goodman²² připravili tyto aktivní pentachlorofenylester hydrochloridy, které převedli na trifluoroacetáty a ty na matici celitu zahřívají na teplotu 90 °C ve vakuu (10³ Pa). Cyklizaci na polystyrenové pryskyřici obsahující oximové funkce³⁵ vyjadřuje následující schéma (10).

K cyklizaci lysyl-(2-hydroxypropionyl)fenylohydrazidu byla použita azidová metoda³⁶. Hydrogenace cyklo(lysyl(Cbz)-2-hydroxypropionylfenylo) v obvyklých alkoholických nebo vodných rozpouštědlech vede k nízkým výtěžkům vzhledem k nestabilitě šestičlenného laktonového kruhu.

4. Farmaceutické využití morfolin-2,5-dionů

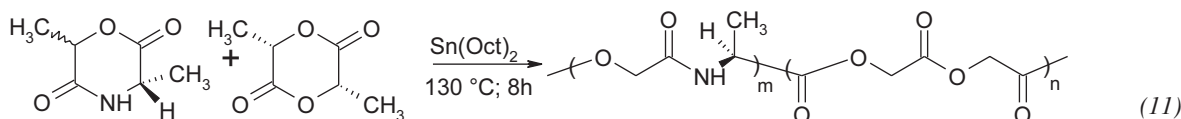
4.1. Příprava polymerů

Morfolin-2,5-diony jsou používány především jako monomery pro syntézu opticky aktivních poly(depsipectidů). Dochází k otevírání cyklu a k následné polymeraci^{37,38}. Biodegradabilní polymery používané jako biomateriály jsou převážně složeny z látek, které jsou běžně přítomné v lidském těle, jako je kyselina mléčná, aminokyseliny apod. Nevýhodou používaných polyaktidů, které se používají jako šicí materiál,



Boc - *tert*-butyloxykarbonyl
 TPP - trifenylfosfin
 DEAD - diethylazodicarboxylát
 TFA - trifluoroctová kyselina
 PyBrop - bromotripyrrolidinofosfonium hexafluorofosfát
 DIC - diisopropylkarbodiimid
 DMAP - *N,N*-dimethylaminopyridin
 DIEA - diisopropyl(ethyl)amin
 Lac-OBn - benzylester kyseliny mléčné

(10)



Sn(Oct)₂ - oktanolát cínatý

při fixaci fraktur a jako tzv. transportní systémy léčiv (drug delivery system – DDS), je jejich křehkost a nízká biodegradabilita. Proto byly syntetizovány polymery z 3,6-dimethyl-2,5-morfolindionu a studovány jejich termické a mechanické vlastnosti^{39,40}. Bylo zjištěno, že se snadno štěpí působením cholesterolesterasy (z *Pseudomonas species*) a proteinasy K (z *Tritirachium album*). Proteinasa K rovněž vykazuje vyšší specifitu vůči opticky aktivním kopolymerům, obsahujícím L-alanin. Rovněž kopolymery 3,6-dimethyl-2,5-morfolindionu s 3,6-dimethyl-2,5-dioxanonem připravené dle následujícího schématu (11) vykazují vyšší biodegradabilitu nežli samotný homopolymer získaný z 3,6-dimethyl-2,5-dioxanonu⁴¹.

4.2. Transportní systémy léčivých látek

Jedna z důležitých aplikací polydepsipectidů jako biomateriálů je transportní systém léčivých látek pro řízené uvolňování léčivé látky⁴². V tomto systému je biodegradací proces soutěží mezi působením esterasy a proteasy^{43,44}. Z obecného hlediska jsou esterasy méně selektivní než proteasy, peptidická vazba je v důsledku vedlejších vazeb (C^α-zbytků) rozmanitější (sterické zábrany, elektrostatické interakce). Tato hlediska lze stručně charakterizovat v základním rozdělení proteas na *a*) serinové, *b*) aspartátové, *c*) SH-dependentní, *d*) metaloenzymy. Proto je biodegradace polymerů a zvláště kopolymerů striktně podřízena typu enzymu, ale i vestavěným příslušným zbytkům hydroxykyselin a aminokyselin, takže biodegradace kopolymerů v závislosti na typu enzymů závisí na kvalitě monomerů. Je pochopitelné, že se zde uplatňují rovněž konformační vlivy na štěpení kopolymeru.

Např. pokusy degradace *in vitro* působením proteas a esterasy ukazují pozoruhodně odlišné chování podle druhu a původu enzymu. Snižující se aktivita v řadě papain>trypsin>elastasa>thermolysin>pepsin>karboxypeptidasa A ukazuje na menší aktivitu esterasy v závislosti na složení depsipectidu⁴⁵. Yoshida a spol.⁴⁶ připravili polydepsipectidy typu poly[(Ala)_n-Glu(OEt)-Lac], které použili jako nosiče agonisty releasing faktoru luteinizačního hormonu (LH-RF) tzv. Luliberinu.

Snaha o účinný design DDS je velmi sledovanou oblastí nových léčiv a toto úsilí se promítá prakticky do všech klinických systémů (gastroenterologický, kardiovaskulární, respirační a nervový).

4.3. Jiné

Depsipectidy s postranními funkčními skupinami mohou sloužit též jako kyselá prekursora hydrolyzy³³. Dále byly sledovány jako modelové sloučeniny pro studie vztahů mezi strukturou a rychlostí hydrolyzy⁴⁷, substráty proteolytických enzymů – β-laktamas^{48,49} trypsinové a chymotrypsinové substráty^{11,37,50} a jako trypanocida⁵¹.

Práce byla podpořena grantem UK 24/1998BCH/FaF a MSM 111600001.

LITERATURA

1. Bodanszky M.: *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag, New York 1993.
2. Chadwick A. F., Pascu E.: *J. Am. Chem. Soc.* 65, 392 (1943).
3. Cook A. H., Cox S. F., Farmer T. H.: *J. Chem. Soc.* 1949, 1022.
4. Helder J., Kohn F. E., Sato S., van den Berg J. W., Feijen J.: *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 6, 9 (1985).
5. Yonezawa N., Toda F., Hasegawa M.: *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 6, 607 (1985).
6. In't Veld P. J. A., Dijkstra P. J., van Lochem J. H., Feijen J.: *Makromol. Chem.* 191, 1813 (1990).
7. Fung F. N., Glowaky R. C.: EP 322154 (1989); *Chem. Abstr.* 113, 103447 (1989).
8. Barrera D. A., Zylstra E., Lansbury P. T., Langer R.: *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11010 (1993).
9. In't Veld P. J. A., Dijkstra P. J., Feijen J.: *Makromol. Chem.* 193, 2713 (1992).
10. Rumsh L. D., Volkova L. I., Antonov V. K.: *FEBS Lett.* 9, 64 (1970).
11. Hartwig W., Schöllkopf U.: *Liebigs Ann. Chem.* 1982, 1952.
12. Jörres V., Keul H., Höcker H.: *Macromol. Chem. Phys.* 199, 825 (1998).
13. Jörres V., Keul H., Höcker H.: DE 19,513,398 (1996); *Chem. Abstr.* 125, 329469 (1996).
14. Brungs P., Danielmeier K., Jakobi J., Nothhelfer C., Stahl A., Zietlow A., Steckhan E.: *J. Chem. Phys.* 93, 575 (1996).
15. Cabaret D., Adediran S. A., Gonzales M. J. G., Pratt R. F., Wakselman M.: *J. Org. Chem.* 64, 713 (1999).
16. Maryanoff B. E., Greco M. N., Zhang H. Ch., Gordon P. A., Kauffman J. A., Nicolaou K. C., Liu A., Brungs P. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 117, 1225 (1995).
17. Katakai R.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1988, 1229.
18. Katakai R., Iizuka Y.: *J. Org. Chem.* 50, 715 (1985).
19. Katakai R.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1987, 2249.
20. Katakai R., Goodman M.: *Macromolecules* 15, 25 (1982).
21. Nakamura C. E.: WO 6826 930723 (1994); *Chem. Abstr.* 120, 245131 (1994).
22. Nissen D., Gilon C., Goodman M.: *Makromol. Chem., Suppl.* 1, 23 (1975).
23. Ueyama N., Nakata M., Nakamura A.: *J. Mol. Catal.* 14, 341 (1982).
24. Kardassis G., Brungs P., Nothhelfer Ch., Steckhan E.: *Tetrahedron* 54, 3479 (1998).

25. Stewart J. M., Young J.: *Solid Phase Peptide Synthesis*. Pierce Chemical Company, Rockford 1984.
26. Byung H. L.: *Tetrahedron Lett.* **38**, 757 (1997).
27. Kuisle O., Quinoa E., Riguera R.: *Tetrahedron Lett.* **40**, 1203 (1999).
28. Mitsunobu O.: *Synthesis* **1981**, 1.
29. Gilton Ch., Klausner Y.: *Tetrahedron Lett.* **20**, 3811 (1979).
30. Vowinkel E.: *Chem. Ber.* **99**, 1479 (1966).
31. Hassall C. H., Martin J. G., Schofield J. A., Thomas J. O.: *J. Chem. Soc. C* **1967**, 997.
32. Ridge B., Rydon H. N., Snell C. R.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1972**, 2041.
33. Crommen J. H. L., Schacht E. H.: *Bull. Soc. Chim. Belg.* **100**, 747 (1991).
34. Shemiakin M. M., Ovchinnikov Y., Ivanov V. T., Evstratov A. V., Mikkakva A., Rayabova I. D.: *J. Gen. Chem. USSR* **42**, 2316 (1972).
35. Byung H. L.: *Tetrahedron Lett.* **38**, 757 (1997).
36. Yasutake A., Miyazaki K., Aoyagi H., Kato T., Izumiya N.: *Int. J. Pept. Protein Res.* **16**, 61 (1980).
37. Schakenraad J. M., Nieuwenhuis P., Molenaar I., Helder J., Dijkstra P. J., Feijen J.: *J. Biomed. Mater. Res.* **23**, 1271 (1989).
38. Ouchi T., Nozaki T., Ishikawa A., Fujimoto I., Ohya A.: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **35**, 377 (1997).
39. Shirahama H., Umemoto K., Yasuda H.: *Kobunshi Ronbunshu* **55** (2), 57 (1998); *Chem. Abstr.* **128**, 16775 (1998).
40. Jörres V., Keul H., Höcker H.: *Macromol. Chem. Phys.* **199**, 835 (1998).
41. Shirahama H., Umemoto K., Yasuda H.: *J. Biomater. Sci. Polym. Ed. Vol.* **10**, 621 (1999).
42. Holland S. J., Tighe B. J., Gould P. L.: *J. Contr. Release* **4**, 155 (1986).
43. Helder J., Feijen J., Lee S. J., Kim S. W.: *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **7**, 193 (1986).
44. Asano M., Yoshida M., Kaetsu R., Katakai R., Mashimo T., Yuasa H., Imai K., Yamanaka H.: *Polym. J. (Tokyo)* **20**, 281 (1988).
45. Yoshida M., Asano M., Kumakura M., Katakai R., Mashimo T., Yuasa H., Yamanaka H.: *Eur. Polym. J.* **27**, 325 (1991).
46. Yoshida M., Asano M., Kumakura M., Katakai R., Mashimo T., Yuasa H., Imai K., Yamanaka H.: *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 1173 (1990).
47. Ingwall R. T., Gilon C., Becktel W. J., Goodman M.: *Macromolecules* **11**, 540 (1978).
48. Yasutake A., Miyazaki K., Hayashi K., Aoyagi H., Kato T., Izumiya N.: *Pept. Chem.* **16**, 161 (1978).
49. Cabaret D., Adediran S. A., Gonzales M. J. G., Pratt R. F., Wakselman M.: *J. Org. Chem.* **64**, 713 (1999).
50. Yasutake A., Miyazaki K., Aoyagi H., Kato T., Izumiya N.: *FEBS Lett.* **100**, 241 (1979).
51. Das M., Chauldhuri S, Chakravorti S. S.: *B: Org. Chem. Ind. Med. Chem.* **24B**, 1302 (1985).

J. Vinšová (*Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Morpholine-2,5-diones – Their Preparation and Exploitation**

Morpholine-2,5-diones are depsipeptide analogues of cyclic dipeptides, derivatives of piperazine-2,5-diones. In contrast to cyclodipeptides, which are formed by spontaneous cyclization, preparation of cyclodidepsipeptides is not easy. Two main ways are used for cyclization of depsipeptides. Cyclization by the formation of ester bond seems more efficient than cyclization via the amide bond formation. The review deals briefly with all known methods of syntheses of morpholine-2,5-diones but attention is also paid to their biological activity. They are of great interest for biomedical applications. Optically active morpholine-2,5-diones are used as monomers for synthesis of biodegradable polymers, as prodrugs of bioactive amino acids and, most recently, in drug delivery systems.

VÝROBA TECHNICKY DÔLEŽITÝCH DIKARBOXYLOVÝCH KYSELÍN

HELENA MIKOVÁ, MICHAL ROSENBERG
a LUDMILA KRÍŠTOFIKOVÁ

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: miko@chelin.chtf.stuba.sk

Došlo dňa 6.I.2000

Kľúčové slová: dikarboxylové kyseliny, výroba

Obsah

1. Úvod
2. Kyselina epoxyjantárová
3. Kyselina fumarová
4. Kyselina jablčná
5. Kyselina vínna
6. Záver

1. Úvod

Maleínanhydrid a kyselina maleínová sú polyfunkčné chemikálie, ktoré sú svojim komerčným využitím v centre pozornosti už mnoho rokov. Doposiaľ sú dôležitými surovinami najmä v nepotravinárskych segmentoch priemyslu a to vo výrobe alkydových a polyesterových živíc, povrchových náterov, prísad do mazív, zmäkčovadiel, kopolymérov a rozličných poľnohospodárskych chemikálií. S rozvojom biotechnológií sa zvyšuje snaha využívať netradičné, ľahko dostupné suroviny na biosyntézu potravinársky a farmaceuticky významných látok. V poslednom období sa uvažuje o anhydride kyseliny maleínovej ako o dobrom štartovacom materiáli pre chemickú a biotechnologickú prípravu viacerých organických kyselín s rozširujúcim sa uplatnením najmä v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. Súčasná možnosť využitia maleínanhydridu na syntézu, resp. biosyntézu týchto látok sú schematicky znázornené na obr. 1. Niektoré kyseliny je možné pripraviť mikrobiálne priamo z kyseliny maleínovej (kyselina D-jablčná, kyselina L-jablčná, kyselina fumarová), iné sa dajú pripraviť zatiaľ len kombináciou chemickej a mikrobiálnej syntézy (všetky izoméry kyseliny vínnej), prípadne iba chemickou syntézou (kyselina *cis*- a *trans*-epoxyjantárová). Neustále však silnie snaha nahrádzať chemické postupy mikrobiálnymi fermentáciami.

2. Kyselina epoxyjantárová

Táto kyselina bola doposiaľ veľmi málo používanou surovinou v priemyselných odvetviach. V 80. a 90. rokoch bola

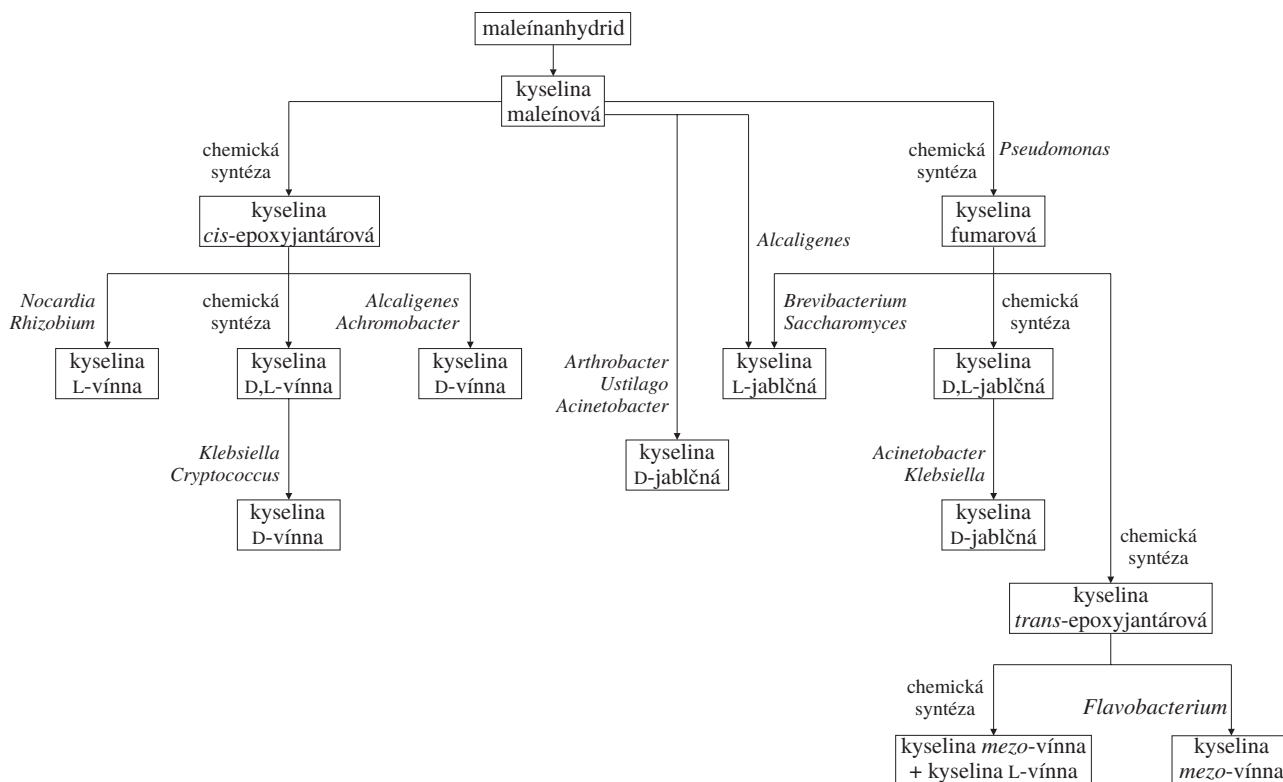
popísaná príprava rôznych derivátov tejto kyseliny a ich využitie vo farmaceutickom priemysle. Výhodou týchto zlúčenín je ich extrémne nízka toxicita. V roku 1983 bolo syntetizovaných niekoľkých derivátov kyseliny *trans*-epoxyjantárovej, ktoré sa ukázali byť dobrými inhibítormi tiolproteázovej aktivity¹. Priaznivý účinok bol potvrdený aj pri liečbe svalových chorôb². Kyselina *trans*-epoxyjantárová sa ľahko transformuje na kyselinu β -hydroxy-L-asparágovú, ktorá má vynikajúce antibakteriálne účinky a používa sa na prípravu β -laktámových antibiotík³.

Kyselina epoxyjantárová sa vyskytuje v dvoch konfiguráciách, a to ako *cis*- a *trans*-forma. Obidve je možné pripraviť z maleínanhydridu, resp. kyseliny maleínovej. Kyselina *cis*-epoxyjantárová sa pripravuje zatiaľ iba chemickou syntézou – oxidáciou kyseliny maleínovej za prítomnosti katalyzátora. Ako katalyzátor boli spočiatku používané rozpustné soli paládia alebo vanádu. Oxidujúcim činidlom bol kyslík, mednaté soli, kyselina dusičná, prípadne dusičnany alkalických kovov. Takouto oxidáciou sa v minulosti pripravovala kyselina D,L-vínna, pričom ako medziprodukt vznikala kyselina *cis*-epoxyjantárová. Vhodnou úpravou reakčných podmienok je však možné získať veľmi čistú kyselinu *cis*-epoxyjantárovú⁴. Maleínanhydrid sa zmieša v destilovanej vode s CaCO₃, peroxidom vodíka a katalyzátorom – wolfrámanom, resp. molybdénanom sodným. Maleínan vápenatý následne konvertuje na *cis*-epoxyjantaran vápenatý pri teplote 60–70 °C a hodnote pH 4–6 v priebehu 4 hodín. Výťažok reakcie je 96 %. Takto pripravený *cis*-epoxyjantaran sa ďalej používa na výrobu kyseliny vínnej. Neskôr bol popísaný postup prípravy vysokočistých solí kyseliny *cis*-epoxyjantárovej z maleínanhydridu, keď epoxidácia prebiehala vo vodno-alkoholickom roztoku (30–90 % vodný roztok alkoholu – metanolu, etanolu, propanolu a pod.)⁵.

Kyselina *cis*-epoxyjantárová sa pripravuje iba chemickou syntézou, doteraz nie je známy mikroorganizmus, ktorý by dokázal syntetizovať túto kyselinu, príp. jej soli.

Kyselinu *trans*-epoxyjantárovú je možné pripraviť dvoma spôsobmi, buď epoxidáciou kyseliny fumarovej (D,L-forma) alebo mikrobiálnou cestou (L-forma). Priebeh epoxidácie je podobný ako pri príprave *cis*-formy tejto kyseliny, zásadný rozdiel je iba v množstve pridaného katalyzátora. Na dosiahnutie 80–86 % konverzie je potrebná 5-násobne vyššia koncentrácia wolfrámanu, resp. molybdénu⁶. Teplota je udržiavaná v rozmedzí 65–75 °C.

Mikrobiálne sa kyselina *trans*-epoxyjantárová pripravuje z glukózy alebo etanolu pomocou vláknitých húb *Paecilomyces varioti*, *Penicillium vineferum*, *Aspergillus fumigatus*⁷. Štúdiá mechanizmu biosyntézy ukázali, že kyselina *trans*-epoxyjantárová je syntetizovaná z dvojhlíkatých zlúčenín cez cyklus glyoxálovej kyseliny a uhlíková kostra fumaranu je transformovaná na *trans*-epoxyjantaran. Epoxidový kyslík *trans*-epoxyjantaranu sodného pochádza priamo z molekulového kyslíka⁸. Fermentačnou prípravou kyseliny *trans*-L-epoxyjantárovej sa zaoberala aj japonská pracovná skupina Yamaguchi a kol. V práci boli použité nové kmene vláknitých húb *Aspergillus clavatus*, *A. fumigatus*, *Neosartorya fischeri*,



Obr. 1. Možnosti prípravy kyseliny epoxyjantárovej, fumarovej, vínnej a jablčnej z anhydridu kyseliny maleínovej

Paecilomyces elegans, *Talaromyces wortmannii* a *Byssosclamyces nivea*⁹.

Obe formy kyseliny *trans*-epoxyjantárovej (D,L- aj L-forma) je v súčasnosti možné použiť na chemickú alebo mikrobiálnu prípravu kyseliny *mezo*-vínnej.

3. Kyselina fumarová

Kyselina fumarová je prirodzenou látkou, prítomnou v mnohých mikroorganizmoch, rastlinách i živočíchoch. Je pomenovaná podľa rodu *Fumaria*. Spolu s kyselinou jablčnou je súčasťou Krebsovho cyklu a cyklu kyseliny glyoxálovej. Používa sa v potravinárstve ako prísada do práškových nápojových zmesí, do želatínových dezertov, pudíngov a náplní do koláčov. V mäsovom priemysle sa pridáva do konzervovaného mäsa a do hydínových produktov na urýchlenie stabilizácie farby. V nepotravinárskych odvetviach sa používa kyselina fumarová pri výrobe polyesterových živíc, náterov na nábytok a rýchloschnúcich farieb. Okrem toho je východiskovým materiálom pre priemernú produkciu kyseliny L-jablčnej a kyseliny L-asparágovej. Komerčne sa kyselina fumarová pripravuje chemicky-katalytickou izomerizáciou kyseliny maleínovej od roku 1932. Mikrobiálne môže byť produkovaná z glukózy použitím vláknitých húb z rodu *Rhizopus*. Za potenciálnych producentov možno považovať hlavne dva druhy *Rhizopus arrhizus* a *R. nigricans*. Mikrobiálne bola kyselina fumarová vyrábaná v 40. rokoch firmou Pfizer (4000 ton/rok), ale ekonomicky výhodnejšia chemická syntéza postupne donútila túto firmu zastaviť fermentačnú výrobu¹⁰. Okrem sacharidických substrátov pre priamu konverziu na fumaran sú

ridických substrátov pre priamu konverziu na fumaran sú v literatúre zmienky o možnom využití odpadových sulfitových výluhov¹¹, resp. etanolu¹². V roku 1986 vyšlo doposiaľ najucelenejšie vysvetlenie biochemizmu syntézy kyseliny fumarovej¹².

Kyselina fumarová môže byť pripravovaná z kyseliny maleínovej nielen chemicky ale aj mikrobiálne prostredníctvom baktérií rodov *Arthrobacter*, *Pseudomonas* a *Alcaligenes*. Z kmeňa *Arthrobacter* sp. TPU 5446 bola izolovaná a charakterizovaná maleát *cis-trans*-izomeráza. Tento enzým bol veľmi nestabilný a pri jeho purifikácii došlo k vysokej strate aktivity¹³.

V roku 1997 bol uskutočnený screening baktérií využívajúcich kyselinu maleínovú zo 600 pôdných vzoriek odobratých na rôznych miestach Japonska¹⁴. 20 z nich bolo schopných premieňať kyselinu maleínovú na iné organické kyseliny. 4 z nich mali zvýšenú aktivitu maleát *cis-trans*-izomerázy, teda enzýmu, ktorý katalyzuje izomerizáciu maleinanu na fumaran. Najvyššiu aktivitu vykazoval kmeň *Pseudomonas alcaligenes* XD-1, u ktorého bol molárny výťažok kyseliny fumarovej približne 70 % po šiestich hodinách inkubácie. Na druhej strane, za tento čas vzniklo asi 18,4 % kyseliny L-jablčnej ako vedľajšieho produktu. Koncentrácia kyseliny maleínovej musí byť však nižšia ako 100 g.l⁻¹, pri vyšších koncentráciách dochádza k inhibícii produkcie kyseliny fumarovej. Autori uvádzajú, že produktivita kyseliny fumarovej bola až 27× vyššia v porovnaní s výsledkami produkcie kyseliny fumarovej fermentáciou s vláknitými hubami rodu *Rhizopus*¹⁵. Výskumy v tejto oblasti stále pokračujú a v budúcnosti môže byť tento spôsob prípravy kyseliny fumarovej veľmi atraktívnym.

4. Kyselina jablčná

Kyselina jablčná je dikarboxylová kyselina vyskytujúca sa v troch modifikáciách – D(+)-, L(-)-formy sú opticky aktívne a D,L-forma je opticky inaktívna. V prírode sa nachádza iba L-forma a to hlavne v jablkách, melónoch, čerešniach, grapefruitoch, slivkách, brokolici, mrkve a v ďalších druhoch ovocia a zeleniny. Kyselina jablčná (D,L-forma) sa používa v potravinárskom priemysle ako okysľovadlo nealko-nápojov a prírodných štiav. Na dosiahnutie požadovanej kyslosti sa pridáva aj do rôznych potravín ako napr. kandizované ovocie, želatína, jogurty, pudinky a šalátové nálevy. Vo farmácii sa používa do prostriedkov proti kašlu a na liečbu hyperanémie. Kyselina jablčná sa pridáva aj do umelých sladidiel, čím sa potláča ich horká chuť. V kozmetike sa mieša spolu s AHA-kyselinami do krémov na vyhladzovanie vrások a tiež sa používa vo výrobe ťažkých sladkých parfémov. V nepotravinárskych odvetviach sa používa kyselina jablčná pri výrobe zmäčkovadiel; jej chelatačné vlastnosti sa využívajú pri odstraňovaní hrdze a nežiadúcich kovových iónov.

Kyselina jablčná sa pripravuje chemickou syntézou (raccemická zmes) alebo mikrobiálnou cestou (buď D- alebo L-forma v závislosti od použitého mikroorganizmu). Chemicky sa kyselina jablčná syntetizuje hydratáciou kyseliny maleínovej alebo fumarovej za vysokého tlaku a teploty. Cena kyseliny D,L-jablčnej je porovnateľná s cenou kyseliny citrónovej. Preto nové technológie počítajú s možnosťou použitia kyseliny D,L-jablčnej ako náhrady kyseliny citrónovej v nápojov a potravínach. Na druhej strane, rastúci trend používania prírodných potravinárskych zložiek by mohol zvýšiť dopyt po prírodnej L-forme kyseliny jablčnej, pripravovanej biotechnologickými postupmi. Kyselinu jablčnú je možné pripraviť fermentačne alebo biokonverziou kyseliny fumarovej¹⁶.

Fermentačným spôsobom je možné pripraviť kyselinu L-jablčnú zo sacharidických substrátov (glukóza, sacharóza a pod.) hlavne pomocou vláknitých húb rodov *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *A. oryzae* a *A. parasiticus*)¹⁷. S kmeňom *A. flavus* boli dosiahnuté výťažky okolo 50 % (z teor. výťažku). V roku 1991 Batat a kol. uskutočnili doplnujúcu optimalizáciu niektorých zložiek fermentačného média a podarilo sa im zvýšiť produktivitu z 0,3 g.l⁻¹.hod⁻¹ na 0,59 g.l⁻¹.hod⁻¹ a aj výťažok na 60 % (cit.¹⁸). Ako autori porovnávajú z 1 mol glukózy vzniká teoreticky 268 g kyseliny L-jablčnej, pričom kyseliny citrónovej iba 192 g (cit.¹⁹). Okrem sacharidických substrátov bola popísaná u vláknitých húb aj tvorba kyseliny L-jablčnej fermentáciou etanolu (*Schizophyllum commune*)²⁰, n-parafínov, acetát (*Paecilomyces varioti*)²¹. Nevýhodou postupov prípravy kyseliny jablčnej je však dlhý čas fermentácie, vznik vedľajších produktov (napr. polyolov), ktoré sťažujú samotnú izoláciu produktu. Okrem toho je známe, že skupina vláknitých húb *Aspergillus flavus* je známa tvorbou mykotoxínov.

Podstatne výhodnejším spôsobom prípravy tejto kyseliny je konverziou kyseliny fumarovej.

Svedčí o tom aj fakt, že v súčasnosti sa 13 % s celkovej svetovej produkcie kyseliny jablčnej pripravuje enzýmovou konverziou kyseliny fumarovej prostredníctvom baktérií *Brevibacterium flavum* imobilizovaných do κ-karagénanu¹⁶. Jednou z nevýhod tejto konverzie je tvorba vedľajšieho produktu – kyseliny jantárovej. Tú je však možné úspešne zastaviť inkubovaním buniek pred imobilizáciou v roztoku fumaranu

s prídavkom žľožového extraktu²². Tým dôjde nielen k inhibícii jantarandehydrogenázy ale aj k niekoľkonásobnému zvýšeniu aktivity fumarázy. Dobré výsledky v potláčaní tvorby kyseliny jantárovej sa dosiahli aj pri použití kyseliny cholovej, deoxycholovej a iných detergentov. Biokonverzia prebieha na 80–86 % a nezreagovaný fumaran je naspäť recyklovaný. Okrem rodu *Brevibacterium* je produkcia kyseliny jablčnej popísaná aj u druhov *Lactobacillus*^{23,24}, *Corynebacterium*²⁵ a *Escherichia*²⁶. Avšak posledné práce v tejto oblasti sa venujú rodu *Brevibacterium*, zvyšovaniu aktivity fumarázy u týchto kmeňov a imobilizácii do vhodných nosičov^{27,28}. Konverzia kyseliny fumarovej na kyselinu L-jablčnú bola popísaná aj u niektorých rodov kvasiniek. Najviac preštudované sú kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*^{29,30} a kvasinky rodu *Candida*^{21,22}. U kvasiniek je tvorba kyseliny jantárovej účinne potláčaná prídavkom kyseliny malónovej³³. Podobne ako u baktérií aj u kvasiniek je možné zvýšiť aktivitu fumarázy prídavkom detergentov. Na zvýšenie permeability membrány kvasiniek *S. cerevisiae* bol úspešne použitý dodecylsírnan sodný a aktivita fumarázy imobilizovaných buniek sa zvýšila až 60× (cit.³⁰) oproti pôvodnej aktivite 0,94 mmol.hod⁻¹.g⁻¹ imobilizovaných buniek²⁹. Zvýšená aktivita fumarázy bola pozorovaná aj u kvasiniek rodu *Dipodascus*, pričom v priebehu konverzie fumaranu na jablčnan nedochádza k tvorbe kyseliny jantárovej. Aktivita fumarázy intaktných aj dezintegrovaných buniek bola 8–10× vyššia v porovnaní s kvasinkami *S. cerevisiae*³⁴.

Okrem konverzie kyseliny fumarovej na kyselinu L-jablčnú sú známe mikroorganizmy, ktoré konvertujú priamo kyselinu maleínovú na kyselinu L-jablčnú (rod *Alcaligenes*) alebo na kyselinu D-jablčnú (rody *Pseudomonas*, *Ustilago*, *Arthrobacter*), prípadne dokážu selektívne utilizovať L-formu z racemickej zmesi kyseliny jablčnej (*Acinetobacter*, *Serratia*, *Corynebacterium*).

Konverzia kyseliny maleínovej na kyselinu L-jablčnú bola podrobne študovaná u baktérií *Alcaligenes* sp. T501 (cit.³⁵). Molárny výťažok konverzie 20 % roztoku maleínanu vápenatého na jablčnan vápenatý bol 98,4 % a po prečistení bol molárny výťažok čistej kyseliny L-jablčnej 83,1 %. Zistilo sa, že táto transformácia si vyžaduje u mikroorganizmov prítomnosť dvoch enzýmov a to maleátizomerázy a fumarázy. V prvom stupni je kyselina maleínová konvertovaná na kyselinu fumarovú a tá je následne účinkom fumarázy transformovaná na kyselinu L-jablčnú. Enzým, ktorý by bol schopný katalyzovať priamu konverziu maleátu na L-jablčnan bez tvorby fumaranu ako intermediátu, nebol nájdený. Doteraz bol tento enzým (maleáthydratáza) detegovaný iba u *Pseudomonas* sp. a v cicavčích obličkách³⁶. Hydratačným produktom bola však kyselina D-jablčná.

O príprave kyseliny D-jablčnej z kyseliny maleínovej prostredníctvom baktérií bolo publikovaných niekoľko prác. Túto schopnosť majú baktérie rodov *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*. V roku 1993 bola urobená štúdia, v ktorej boli nájdené prvýkrát aj eukaryotické mikroorganizmy schopné konvertovať kyselinu maleínovú na kyselinu D-jablčnú³⁷. Vysokú aktivitu maleáthydratázy vykazovali kmene rodov *Ustilago*, *Saccharomycopsis* a *Rhodotorula*. Najlepší z nich, kmeň *Ustilago sphaerogena* S402, bol schopný konvertovať roztok maleínanu disodného na 50 %, po prídavku 1 % Tritonu X-100. Okrem toho sa zistilo, že tento kmeň dokáže konvertovať kyselinu fumarovú na kyselinu L-jablčnú, avšak nie je schopný premieňať maleínan na fumaran. Nevýhodou tohto

spôsobu prípravy D-formy kyseliny jablčnej nie je len nízky stupeň konverzie ale aj veľmi nízka optická čistota produktu a potreba prídavku drahého induktora do kultivačného média.

Schopnosť konvertovať maleínan na jablčan s 50–70 % molárnym výťažkom majú aj kmene *Sporosarcina ureae*, *Mycoplasma dimorpha*, *Vibrio tyrogenes*³⁸.

Kyselinu D-jablčnú je možné pripraviť aj z racemickej zmesi kyseliny jablčnej a to pomocou mikroorganizmov, ktoré využívajú L-formu tejto kyseliny. Do tejto skupiny radíme baktérie rodov *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*³⁹. Avšak ani touto metódou nedosiahneme uspokojivé výťažky a čistotu produktu.

Doteraz najefektívnejší spôsob mikrobiálnej prípravy kyseliny D-jablčnej konverziou kyseliny maleínovej bol popísaný v roku 1993, keď boli na konverziu použité bunky *Arthrobacter* sp.⁴⁰. Výťažky boli 70–72 % kyseliny D-jablčnej a optická čistota bola 100 %.

5. Kyselina vínna

Táto dikarboxylová organická kyselina sa radí do skupiny dôležitých látok s rozširujúcim sa použitím najmä v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. Vyskytuje sa v štyroch rôznych modifikáciách, ako L-, D-forma, mezo-forma a D,L-forma. V prírode sa prirodzene vyskytuje iba L-forma tejto kyseliny a to najmä v ovoci.

Najviac sa kyselina vínna využíva v potravinárstve, kde slúži ako acidifikačné činidlo do džúsov, práškových nápojov a iných potravinárskych produktov (želatína, cukrovinky, pudinky, ...). V pekárstve sa používa vo forme tzv. datem esterov (diacetyl ester monoglyceridov mastných kyselín), ktoré zlepšujú kvalitu múky a tým aj celkovú chuť pečiva. Vo farmaceutickom priemysle sú soli kyseliny vínnej dôležitými intermediátmi pri príprave antacid, antibiotík a chirálnych zlúčenín. Technická kyselina vínna sa používa hlavne vo fotografickom, metalurgickom a keramickom priemysle.

Prírodná L-forma kyseliny vínnej sa získava izoláciou z vínneho kameňa a kalu ako vedľajší produkt pri výrobe vína. Preto aj najväčší výrobcovia sa nachádzajú v krajinách s najväčším vinárskym priemyslom (Taliano, Francúzsko, Portugalsko). Z vínneho kameňa sa pripravuje vínan vápenatý, z ktorého sa izoluje kyselina vínna. Nevýhodou tejto zatiaľ jedinej komerčnej výroby kyseliny vínnej je sezónnosť základného materiálu, čím je množstvo vyrobenej kyseliny limitované. Preto bola snaha vyvinúť iné či už chemické alebo mikrobiálne spôsoby produkcie tejto kyseliny. Jedným z chemických spôsobov je aj epoxidácia kyseliny maleínovej resp. kyseliny fumarovej pričom vzniká kyselina D,L-, resp. mezo-vínna. Do reakcie vstupuje peroxid vodíka, CaCO₃ (alebo NaOH v závislosti od pripravovanej soli) a katalyzátor, ktorým sú najčastejšie wolfrámany alebo molybdénany⁴¹. Reakcia prebieha pri teplote 60–75 °C a pH 4,5–5,5. Výťažok kyseliny D,L-vínnej je 95–97 %.

Doposiaľ ešte nie komerčne použitým spôsobom prípravy kyseliny vínnej je fermentačná výroba. V nej majú z mikroorganizmov význam iba niektoré druhy baktérií. Všeobecne ich možno rozdeliť do štyroch skupín v závislosti od formy kyseliny vínnej, ktorú chceme pripraviť (obr. 2).

Jednou z možností prípravy kyseliny L-vínnej je fermentácia zo sacharidických substrátov, najčastejšie z glukózy,

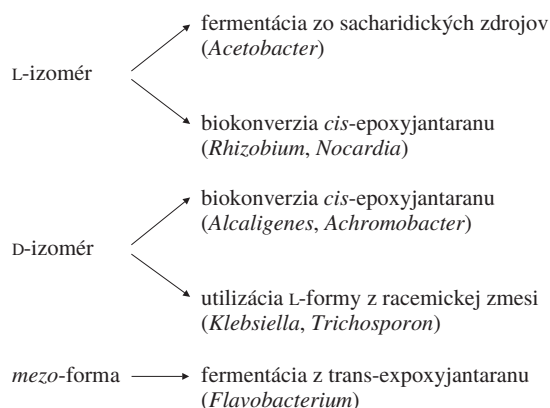
prostredníctvom baktérií z rodu *Acetobacter*. V roku 1972 bol ukázaný pravdepodobný biochemizmus tvorby kyseliny vínnej u týchto baktérií. Glukóza je oxidovaná na kyselinu 5-keto-D-glukónovú, ktorá sa premieňa ďalej na kyselinu 1,2-dihydroxyetylhydrogénvinnu⁴². Z nej vzniká kyselina L-vínna. Reakcia môže byť urýchlená prídavkom katalyzátora – vanadičných solí. Nevýhodou tohto postupu sú však malé výťažky kyseliny vínnej a tvorba vedľajších produktov (hlavne kyselina glykolová). V 80. rokoch boli pripravené mutantné kmene *Acetobacter suboxydans*, ktoré produkovali dvojnásobné množstvo kyseliny vínnej v porovnaní s pôvodným kmeňom⁴³.

Klasen a kol. poukázal vo svojej práci na neschopnosť kmeňa *Gluconobacter oxydans* produkovať kyselinu vinnu⁴⁴. Tento kmeň oxiduje glukózu na kyselinu D-glukónovú a z nej ďalej tvorí kyselinu 5-keto-D-glukónovú a kyselinu 2-keto-D-glukónovú, ktoré sú vylučované do média. Kyselina 2-keto-D-glukónová je ďalej konvertovaná na kyselinu 2,5-diketo-D-glukónovú. Predchádzajúce štúdie ukázali, že kyselina 5-keto-D-glukónová je vhodným prekurzorom pre tvorbu kyseliny L(+)-vínnej. Výsledky tejto práce však ukázali, že kmeň *G. oxydans*, hoci produkuje kyselinu 5-keto-D-glukónovú, nie je schopný produkovať samotnú kyselinu L(+)-vinnu.

Ďalšie experimenty s kmeňom *G. oxydans* boli zamerané na sledovanie vplyvu koncentrácie sorbitolu a kvasničného extraktu v kultivačnom médiu na produkciu kyseliny vínnej⁴⁵. Zistilo sa, že pre rast baktérií a produkciu kyseliny vínnej je optimálny obsah sorbitolu v médiu 20 g.l⁻¹ a kvasničného extraktu 2 g.l⁻¹.

Keďže ani výsledky kontinuálnej prípravy kyseliny vínnej zo sacharidických substrátov neprinesli očakávané zlepšenie vo výťažkoch a navyše dochádzalo k tvorbe vedľajších produktov, stal sa tento proces pre priemyselné využitie ekonomicky málo atraktívny.

Atraktívnejším spôsobom prípravy prírodnej, L-formy kyseliny vínnej je biokonverzia kyseliny cis-epoxyjantárovej, resp. jej solí na kyselinu vinnu pomocou niektorých druhov baktérií rodov *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter* a *Nocardia*. Biokonverzie prebiehajú v nesterilných podmienkach, pri teplote 10–50 °C, hodnote pH 6–10, v batch-režime, semikontinuálne alebo kontinuálne. Veľmi dobré výťažky boli dosiahnuté u kmeňov *Rhizobium validum*, ktoré sa pohybovali v rozmedzí 80–85 % s čistotou produktu 98 % (cit.^{46,47}). Ešte lepšie výsledky boli dosiahnuté u kmeňov *Nocardia tartari-*



Obr. 2. Možnosti mikrobiálnej prípravy izomérov kyseliny vínnej

cans ATCC 311 90 a ATCC 311 91, kde boli výťažky 95 až 99,5 % (cit.^{48,49}). Bunky sú po kultivácii separované z kultivačného média, premyté a kontaktované s kvapalným roztokom *cis*-epoxyjantaranu sodného (prípadne inej soli). Reakčná rýchlosť je ovplyvňovaná prídavkom rôznych detergentov (Tween 80, Triton X-100, SDS a pod.), pričom nevzniká žiadny vedľajší produkt⁴⁸. Na biokonverziu je možné použiť intaktné, dezintegrované alebo imobilizované bunky, prípadne čistý enzým *cis*-epoxyjantaranhydrolázu. V posledných rokoch sa pracuje intenzívne s kmeňom *N. tartaricans* SW 13-57, ktorý bol imobilizovaný do želatíny. Dosiahnuté molárne výťažky boli 92–93 % a po 9-tich opakovaných konverziách nebola pozorovaná strata enzymovej aktivity^{50–52}. Bunky *N. tartaricans* ATCC 311 91 imobilizované do pektátového gélu vykazovali po 450 dňoch ešte cca 30 % pôvodnej aktivity *cis*-epoxyjantaranhydrolázy⁵³. Pri použití baktérií z rodov *Alcaligenes* a *Achromobacter* sa výťažky pohybujú v rozmedzí 91–93 % (cit.⁵⁴).

Príprava kyseliny vínnej konverziou kyseliny *cis*-epoxyjantárovej bola odskúšaná aj u kmeňov *Acetobacter* a *Corynebacterium*, ale výťažky kyseliny vínnej boli veľmi nízke a čas konverzie príliš dlhý^{55,56}.

Okrem L-izoméru je možné účinkom enzýmu D-vínan epoxidázy pripraviť biokonverziou kyseliny *cis*-epoxyjantárovej aj D-izomér kyseliny vínnej. Tento reakcie sa zúčastňujú baktérie z rodov *Alcaligenes* a *Achromobacter*. Podmienky konverzie sú podobné ako v prípade L-formy kyseliny vínnej a výťažky D-izoméru sa pohybujú v rozmedzí 91–93 % (cit.⁵⁶). V 80. rokoch bol popísaný spôsob prípravy kyseliny D-vínnej založený na utilizácii L-formy tejto kyseliny z racemickej zmesi účinkom mikroorganizmov z rodov *Klebsiella*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* a *Pseudomonas*⁵⁷. Koncentrácia kyseliny D,L-vínnej v kultivačnom médiu je 30–150 g.l⁻¹. Po skončení fermentácie sú baktérie odseparované z média a do zmesi je pridaný chlorid vápenatý, čím sa vyzráža D(-)-vínan vápenatý. Použitím kmeňa *Trichosporon cutaneum* sa získalo z 36,4 g.l⁻¹ kyseliny D,L-vínnej 19,3 g kyseliny D-vínnej, pri kmeni *Cryptococcus laurentii* sa získalo z 72,2 g.l⁻¹ kyseliny D,L-vínnej 45,1 g kyseliny D-vínnej.

Kyselinu mezo-vínnu je možné pripraviť chemickou syntézou alebo mikrobiálne biotransformáciou kyseliny *trans*-epoxyjantárovej účinkom enzýmu *trans*-epoxyjantaranhydrolázy, ktorej zvýšená aktivita bola nájdená u baktérií *Flavobacterium* sp.⁷ Tieto baktérie dokážu premieňať nízke koncentrácie solí kyseliny *trans*-epoxyjantárovej (6 g.l⁻¹) na mezo-vínan s výťažkom 100 %. Na konverziu sa však používajú iba bezbunkové extrakty enzýmu, pretože pri použití intaktných buniek bola pozorovaná dlhá počiatočná fáza reakcie. Pre priemyselnú výrobu kyseliny mezo-vínnej je však tento spôsob málo perspektívny, pretože pri vyšších koncentráciách substrátu je reakčný čas veľmi dlhý.

6. Záver

Chemické spôsoby prípravy rôznych látok sú postupne nahrádzané novými biotechnologickými postupmi. Maleínanhydrid, resp. kyselina maleínová je perspektívnym zdrojom pre biotechnologickú prípravu niekoľkých organických kyselín, z nich však najväčší význam má príprava prírodných foriem kyseliny vínnej a jablčnej. Oblasť použitia týchto ky-

selín a ich derivátov sa v poslednom čase veľmi rozšírila. Kyselina jablčná je už z časti vyrábaná mikrobiálne a je iba otázkou času kedy bude zavedená mikrobiálna výroba kyseliny vínnej. Výhoda biotechnologického spôsobu prípravy týchto kyselín spočíva v jednoduchej konverzii substrátu na produkt v nerastových, často nesterilných podmienkach pomocou voľných, permeabilizovaných buniek, prípadne enzýmov z nich izolovaných. Tieto jednoduché biotransformačné reakcie sú ideálnym modelom pre imobilizáciu producenta, čo výrazne zlejšuje stabilitu buniek a umožňuje kontinualizáciu procesu. Všeobecne biotransformačné reakcie sa pre svoju jednoduchosť, efektívnosť stávajú v súčasnosti predmetom zvýšeného záujmu výskumnej aj výrobnjej sféry.

Táto práca bola uskutočnená s príspevím grantu VEGA evid. č. 1-6252/99.

LITERATÚRA

1. Sawada J., Hanada K., Tamai M., Morimoto S., Omura S.: DE 2 809 036 (1978); Chem. Abstr. 90, 87233 (1979).
2. Murata M., Yokoo Ch., Hanada K.: EP 407 017 (1991); Chem. Abstr. 115, 92954 (1991).
3. Yamaguchi T., Nogami I.: EP 236 760 (1987); Chem. Abstr. 108, 110877 (1988).
4. Petritsch K., Korl P.: DE 25 55 699 (1976); Chem. Abstr. 85, 143406 (1976).
5. Sato K., Murayama K., Ida K.: WO 94 17 049 (1994); Chem. Abstr. 121, 255626 (1994).
6. Payne G. B., Williams P. H.: J. Org. Chem. 24, 54 (1959).
7. Martin W. R., Foster J. W.: J. Bacteriol. 70, 405 (1955).
8. Wilkoff L. J., Martin W. R.: J. Biol. Chem. 238, 843 (1963).
9. Miall L. M.: *Organic Acids 2.*, str. 108. Academic Press, London 1978.
10. Romano A. H., Bright M. M., Scott W. E.: J. Bacteriol. 93, 600 (1967).
11. Foster J. W., Waksman S. A.: J. Am. Chem. Soc. 61, 127 (1939).
12. Kenealy W., Zaady E., Du Preez J. C., Stieglitz B., Goldberg I.: Appl. Environ. Microbiol. 52, 128 (1986).
13. Kato Y., Yamagishi J., Asano Y.: J. Ferment. Bioeng. 80, 610 (1995).
14. Nakajima-Kambe T., Nozue T., Mukouyama M., Nakahara T.: J. Ferm. Bioeng. 84, 165 (1997).
15. Petruccioli M., Angiani E., Federici F.: Process Biochem. 31, 463 (1996).
16. Chibata I., Takata I.: Trends Biotechnol. 1, 9 (1983).
17. Samson R. A.: *Biology and Industrial Applications* (Bennett J. W., Klich M. A., ed.), str. 355. Butterworth-Heinemann, Stoneham 1992.
18. Batat E., Peleg Y., Bercovitz A., Rokem J. S., Goldberg I.: Biotechnol. Bioeng. 37, 1108 (1991).
19. Goldberg I., Peleg Y., Rokem J. S.: *Biotechnology and Food Ingredients* (Goldberg I., Williams R. A., ed.), str. 349. Van Nostrand Reinhold., New York 1991.
20. Tachibana S., Murakami T.: J. Ferment. Technol. 52, 511 (1974).
21. Cambell S. M., Todd J. R., Anderson J. G.: Biotechnol. Lett. 9, 393 (1987).
22. Yamamoto K.: Eur. J. Appl. Microbiol. 3, 169 (1976).

23. Veryovkin A. N., Yakovleva V. I.: *Prikl. Biokhim. Biotekhnol.* 26, 19 (1990).
24. Avsyuk I. V.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 27, 658 (1991).
25. Kučerová H., Špaček B., Černý J.: *Kvas. Prum.* 36, 101 (1990).
26. Veryovkin A. N., Zueva N. N., Yakovleva V. I., Sokolova E. N.: *Prikl. Biokhim. Biotekhnol.* 24, 35 (1988).
27. Wang X., HU Y., Ouyang P.: CN 1 093 752 (1994); *Chem. Abstr.* 122, 185544 (1995).
28. Wu W., Tang W.: CN 1 081 206 (1994); *Chem. Abstr.* 122, 29890 (1995).
29. Figueiredo Z. M. B., Carvalho L. B.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30, 217 (1991).
30. Oliveira E. A., Costa A. A. R., Figueiredo Z. M. B., Carvalho L. B.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47, 65 (1994).
31. Kalis V. E., Skordelis O. E.: SU 1254004 (1986); *Chem. Abstr.* 107, 5722 (1987).
32. Skordelis O. E., Kalis V. E., Viesture Z. A.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 25, 498 (1989).
33. Godbole S. S., Kaul R.: *Biotechnol. Bioeng.* 25, 217 (1983).
34. Miková H., Rosenberg M., Křištofiková L., Liptaj T.: *Biotechnol. Lett.* 20, 833 (1998).
35. Kimura T., Kawabata Y., Sato E.: *Agric. Biol. Chem.* 50, 89 (1986).
36. Nakayama K., Kobayashi Y.: JP 03 53 888 (1991); *Chem. Abstr.* 115, 90697 (1991).
37. Nakajima T., Manzen S., Shigeno T., Nakahara T.: *Bio-sci. Biotech. Biochem.* 57, 490 (1993).
38. Ohnishi N., Niwa Ch., Yokozeki K.: US 582 44 49 (1997); *Chem. Abstr.* 127, 330444 (1997).
39. Nakayama K., Miyama M.: JP 02 242 699 (1990); *Chem. Abstr.* 114, 80110 (1991).
40. Yamada H., Asano Y., Sashita R.: JP 05 103 680 (1993); *Chem. Abstr.* 119, 47619 (1993).
41. Oludipe J. O., Koiki K. K., Litvintsev I. U., Sapunov V. N.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 55, 103 (1992).
42. Kotera U., Kodama T., Minoda Y.: *Agr. Biol. Chem.* 36, 1315 (1972).
43. Bhat H. K., Qazi G. N.: *Res. Ind.* 31, 148 (1986).
44. Klasen R., Bringer-Meyer S., Sahn H.: *Biotechnol. Bioeng.* 40, 183 (1992).
45. Mantha D., Basha Z. A., Panda T.: *Bioproc. Eng.* 19, 285 (1998).
46. Kamatani Y., Hisayoshi O.: DE 26 19 311 (1976); *Chem. Abstr.* 86, 105953 (1977).
47. Huang T., Qian X.: *Gongye Weishengwu* 20, 14 (1990); *Chem. Abstr.* 115, 6912 (1991).
48. Miura Y., Yutani K., Takesue H.: DE 26 05 921 (1976); *Chem. Abstr.* 86, 70103 (1977).
49. Rosenberg M., Miková H., Křištofiková L.: *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 221 (1999).
50. Zheng P., Sun Z.: *Gongye Weishengwu* 24, 12 (1994); *Chem. Abstr.* 122, 29814 (1995).
51. Sun Z., Zheng P.: *Shengwu Gongcheng Xuebao* 11, 372 (1995); *Chem. Abstr.* 124, 287155 (1996).
52. Sun Z., Zheng P.: *Weishengwu Xuebao* 36, 109 (1996); *Chem. Abstr.* 125, 165755 (1996).
53. Rosenberg M., Miková H., Křištofiková L.: *Biotechnol. Lett.* 6, 491 (1999).
54. Tsurumi Y., Fujioka T., Tsuyuki K., Isshiki T., Miura M.: DE 26 16 673 (1976); *Chem. Abstr.* 86, 105949 (1977).
55. Zhang J., Huang T.: *Gongye Weishengwu* 20, 7 (1990); *Chem. Abstr.* 113, 57368 (1990).
56. Sato E., Yanai A.: US 3 957 579; 1975; *Chem. Abstr.* 84, 89630 (1976).
57. Sato H.: EP 0 311 835; 1989; *Chem. Abstr.* 111, 172503 (1989).

H. Miková, M. Rosenberg, and L. Křištofiková (*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Production of Dicarboxylic Acids Important for Technology**

Maleic anhydride is a suitable and easily available substrate for preparation of organic acids for pharmaceutical and food industries. The paper describes preparation, based on maleic acid, of tartaric, malic, fumaric and epoxysuccinic acids by chemical synthesis or microbial transformation. In biotransformations, pure cultures of microorganisms, immobilized cells, enzyme solutions or immobilized enzymes are used. Production of tartaric and malic acids can be accomplished by typical biotransformations with immobilized cells in high yields.

NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE

DOPORUČENÍ IUPAC

Definitions Relating to Stereochemically Asymmetric Polymerizations

Asymmetric polymerization has been the interest of many academic and industrial polymer scientists, but no reference has been made by IUPAC explicitly to definitions of reactions involving the asymmetric synthesis of polymers. Hence, this document presents definitions concerned with asymmetric and related polymerizations, with examples included to clarify the meaning of the definitions. Asymmetric polymerizations embrace two main categories, “asymmetric chirogenic polymerizations” and “asymmetric enantiomer-differentiating polymerizations”.

Otiskujeme synopsi názvoslovného návrhu z oboru makromolekulární chemie, který připravila komise IUPAC pro makromolekulární nomenklaturu. Návrh je určen k posouzení a kritice che-

mické veřejnosti. Zájemci o bližší informace či o text návrhu se mohou obrátit na adresu Národního střediska IUPAC v České republice:

Ing. Jaroslav Kahovec, CSc.
Ústav makromolekulární chemie AV ČR
Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6
tel. (02) 20403322, fax (02) 35357981, e-mail kah@imc.cas.cz

Připomínky k návrhu je třeba zaslat do 30. dubna 2001 na adresu:

Prof. Maximo Baron
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Belgrano
Villanueva 1324
1426 Buenos Aires
Argentina
e-mail: baron@ub.edu.ar

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

JEDNODUCHÁ METODA PRO STANOVENÍ RELATIVNÍCH RYCHLOSTÍ RŮSTU JEDNOTLIVÝCH PLOCH KRÝSTALU

JAROSLAV NÝVL

Ústav anorganické chemie, Akademie věd České republiky,
250 68 Řež u Prahy

Došlo dne 5.XI.1999

Klíčová slova: krystalizace, rychlost růstu krystalů, tvar krystalů

Úvod

Růst krystalů se uskutečňuje postupným narůstáním jejich individuálních ploch. Tyto plochy obecně rostou různými rychlostmi a relativní rychlost růstu jednotlivých ploch určuje konečný tvar krystalu: pomalu rostoucí plochy v krystalu převládají, zatímco rychle rostoucí plochy postupně z tvaru krystalu vymizí. Nabízí se proto možnost z pozorovaného tvaru krystalu zpětně usuzovat na relativní rychlost růstu jednotlivých ploch.

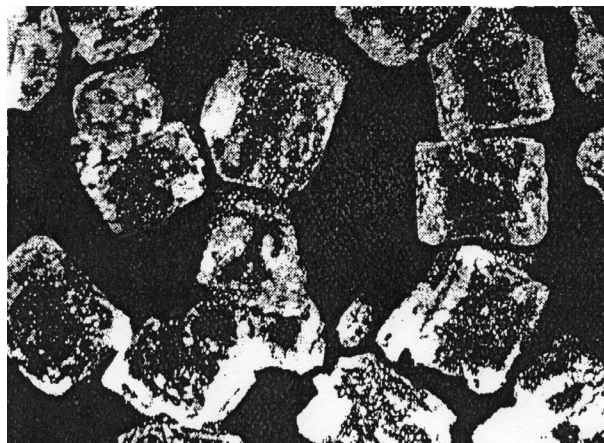
Teoretická část

Krystalizační rychlost lze charakterizovat řadou způsobů¹, z nichž jedině rychlost růstu jednotlivých ploch umožňuje vyjádření pomocí růstových teorií. Způsob měření rychlosti růstu jednotlivých ploch závisí mj. na velikosti měřeného krystalu. Pro krystaly o velikosti nad 5 mm je nevhodnější metoda, při níž je krystal fixován v proudícím přesyceném roztoku a pomocí měřicího mikroskopu se sleduje posun individuální plochy v závislosti na čase^{2,3}. Přesněji lze definovat hydrodynamiku systému za použití rotujícího disku; tento způsob stanovení umožňuje i přesné stanovení rychlosti růstu jednotlivé plochy vázkovou metodou⁴.

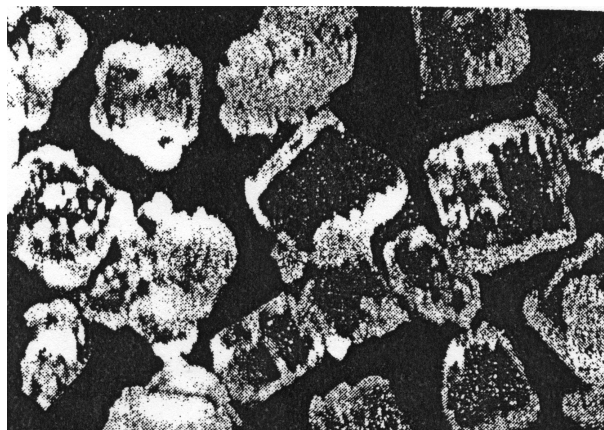
Menší krystaly (v rozmezí 1 až 5 mm) lze proměřovat v různých typech aparatur opět tak, že fixovaný krystal je umístěn v proudu přesyceného roztoku^{5,6}. Konečně růst velmi malých krystalů lze sledovat pod mikroskopem, přičemž lze měřit rychlost růstu ploch kolmých na podložní sklíčko, na kterém krystal volně spočívá. Rychlost růstu krystalů lze jako celkovou rychlost růstu (overall growth rate) stanovit některou z vázkových metod^{1,7}, a z ní lze za jistých předpokladů počítat i rychlost růstu jednotlivých individuálních ploch^{8,9}.

Tvar krystalů je určován relativními rychlostmi růstu jednotlivých ploch. Je tedy možno z pozorovaného tvaru krystalů usuzovat na individuální rychlosti růstu ploch. Již v roce 1901 Wulff¹⁰ poukázal na to, že rovnovážný tvar krystalu je určován povrchovou volnou energií jednotlivých ploch a že jednotlivé plochy rostou rychlostí úměrnou jejich povrchové energii. Ta

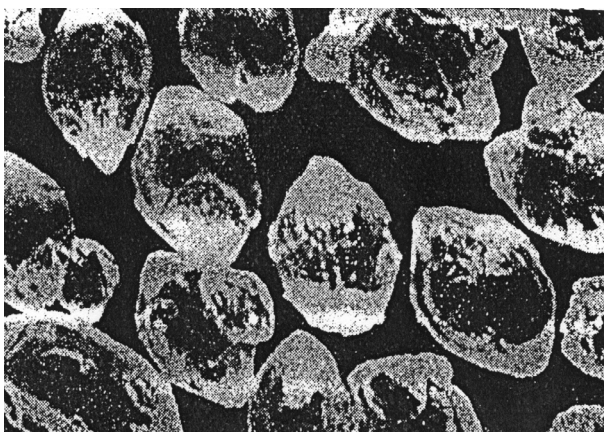
závisí nepřímo na hustotě mřížky odpovídající dané ploše, takže plochy s největší meziovinou vzdáleností rostou nej-



Obr. 1. Mikrofotografie čistého síranu amonného

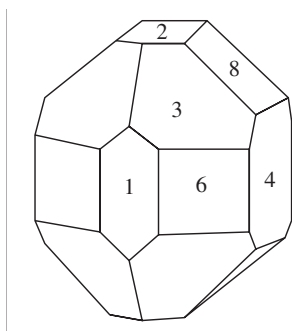


Obr. 2. Mikrofotografie síranu amonného s příměsí Cu^{2+}

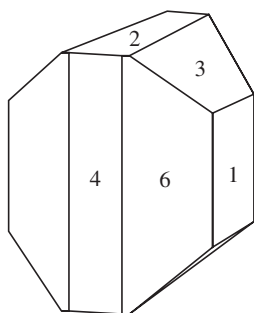


Obr. 3. Mikrofotografie síranu amonného s příměsí Mn^{2+}

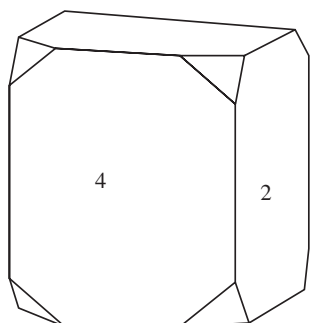
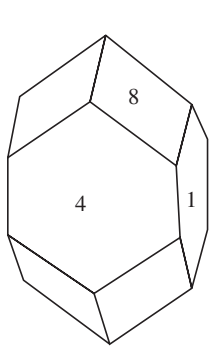
pomaleji a tedy dominují v habitu krystalu. Výpočet mezirovinných vzdáleností a tedy morfologické významnosti jednotlivých ploch krystalu je uváděn v pracích^{11–13}. Vzdálenost



Obr. 4. Simulovaný tvar krystalu – základní tvar



Obr. 5. Simulovaný tvar krystalu – čistý síran amonný

Obr. 6. Simulovaný tvar krystalu – s příměsí Cu^{2+} Obr. 7. Simulovaný tvar krystalu – s příměsí Mn^{2+}

jednotlivých ploch od středu krystalu je pak úměrná relativním rychlostem jejich růstu. Jestliže tedy simulujeme tvar krystalu tak, aby výsledné schéma odpovídalo jeho mikroskopickému zobrazení, a centrální vzdálenosti ploch vztáhneme na centrální vzdálenost morfologicky nejvýznamnější plochy, získáme přímo relativní rychlosti růstu jednotlivých ploch^{14,15}.

Experimentální část a simulace habitu

V diskontinuální vakuové laboratorní odparce byla sledována krystalizace síranu amonného z čistého roztoku, za přítomnosti 0,5 % Cu^{2+} (cit.¹⁶) a 1 % Mn^{2+} (cit.¹⁷) při teplotě 60 °C, intenzivním míchání (1200 ot.min⁻¹) a pomalé rychlosti odpařování (470 g/320 min z 2 dm³ roztoku). Byly získány krystaly znázorněné na obr. 1 (bez příměsí), 2 (příměs Cu^{2+}) a 3 (příměs Mn^{2+}).

Morfologická analýza programem Morang¹² byla provedena pro následující parametry¹⁸:

krystalová soustava orthorhombická, prostorová grupa D_{2h}^{16} (typ mřížky K_2SO_4)

$$a = 5,951 \text{ \AA}, b = 10,53 \text{ \AA}, c = 7,729 \text{ \AA}$$

s výsledkem uvedeným v tabulce I.

Pro simulaci tvaru krystalů jsou kromě údajů morfologické analýzy potřebné individuální vzdálenosti ploch od středu

Tabulka I

Morfologická analýza síranu amonného

Morfologická významnost	Millerovy indexy	Multipllicita	Mezirovinná vzdálenost, Å
1	(0 1 0)	2	10,53
2	(0 0 1)	2	7,73
3	(0 1 -1)	4	6,23
4	(1 0 0)	2	5,95
5	(0 2 0)	2	5,26
6	(1 -1 0)	4	5,18
7	(1 0 -1)	4	4,72
8	(0 2 -1)	4	4,35

Tabulka II

Simulační parametry (vzdálenosti ploch od středu krystalu)

Plocha	Indexy	Základní ^a	Příměs ^b		
			bez	Cu^{2+}	Mn^{2+}
1	(0 1 0)	1	1	0,7	1
2	(0 0 1)	1	1	0,7	
3	(0 1 1)	1	1		
4	(1 0 0)	1	1	0,7	0,5
6	(1 1 0)	1	1		
8	(1 1 1)	1		1	1

^a Obr. 4, ^b bez – obr. 5, Cu^{2+} – obr. 6, Mn^{2+} – obr. 7

krystalu, které jsou úměrné rychlosti růstu odpovídající plochy. Ty je nutno zkusmo volit tak, aby se simulovaný tvar krystalu co nejvíce blížil tvaru pozorovanému pod mikroskopem. Výsledné parametry jsou uvedeny v tabulce II a odpovídající simulované tvary krystalů jsou znázorněny na obr. 4 až 7. Relativní rychlosti růstu jsou vztaženy na jednotkovou rychlost růstu plochy (1 1 1); plochy, jejichž centrální vzdálenosti v tabulce II nejsou uvedeny, se na mikroskopických snímcích buď nevyskytují nebo je nebylo možno vyhodnotit.

Závěr

Popsaná metoda umožňuje orientační odhad relativní rychlosti růstu jednotlivých ploch krystalu z vyhodnocení jeho habitu. Z uvedeného příkladu je možno např. usoudit, že při krystalizaci síranu amonného přísada Cu^{2+} poněkud snižuje rychlost růstu ploch (0 1 0), (0 0 1) a (1 0 0), přísada Mn^{2+} podstatně redukuje rychlost růstu plochy (1 0 0).

Za podporu této práce děkuji Grantové agentuře ČR, číslo grantu 203/99/1222.

LITERATURA

- Garside J., Mersmann A., Nývlt J.: *Measurement of Crystal Growth Rates*. WPC-EFCE, München 1990.
- Clontz N. A., Johnson R. T., McCabe W. L., Rousseau R. W.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 11, 368 (1972).
- Nývlt J., Václavů V.: *Chem. Prum.* 12, 63 (1962).
- Karel M., Nývlt J.: *Chem. Prum.* 39, 75 (1989).
- Mullin J.W., Amatavivadhana A.: *J. Appl. Chem.* 17, 151 (1967).
- Mullin J.W., Garside J.: *Trans. Inst. Chem. Eng.* 45, T285 (1967).
- Nývlt J., Söhnel O., Matuchová M., Broul M.: *The Kinetics of Industrial Crystallization*. Academia, Praha 1985.
- Matuchová M., Nývlt J.: *Krist. Tech.* 11, 149 (1976).
- Nývlt J., Matuchová M.: *Krist. Tech.* 11, 245 (1976).
- Wulff G.: *Z. Kristallogr.* 34, 449 (1901).
- Donnay J. D. H., Harker D.: *Am. Mineral.* 22, 463 (1937).
- Dowty E.: *Am. Mineral.* 61, 448 (1976).
- Docherty R., Roberts K. J., Dowty E.: *Comput. Phys. Commun.* 51, 423 (1988).
- Nývlt J., Žáček S.: *Crystal Res. Technol.* 31, 763 (1996).
- Nývlt J.: *Hung. J. Ind. Chem.* 27, 155 (1999).
- Broul M., Provazník L., Nývlt J.: *Chem. Prum.* 25, 987 (1975).
- Broul M., Provazník L., Nývlt J.: *Chem. Prum.* 23, 605 (1973).
- Broul M., Nývlt J., Söhnel O.: *Tabulky rozpustnosti anorganických látek ve vodě*. Academia, Praha 1979.
- Dowty E.: *Am. Miner.* 65, 465 (1980).

J. Nývlt (*Institute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež near Prague*): **A Simple Method for Determination of Relative Growth Rates of Individual Crystal Faces**

A method for rough estimation of relative growth rates of individual crystal faces by simulation of its habitus is proposed. Application of the method is shown on an example of ammonium sulfate crystals obtained from a pure solution or in the presence of small amounts of admixtures.

STUDIUM VYLUHOVATELNOSTI ANORGANICKÝCH SLOUČENIN SÍRY Z POPÍLKŮ POMOCÍ pH-STATICKEHO VYLUHOVACÍHO TESTU

PAVEL JANOŠ a MICHAELA WILDNEROVÁ

Výzkumný ústav anorganické chemie, a. s., Revoluční 84, 400 01 Ústí nad Labem, e-mail: pavel.janos@vuanch.cz

Došlo dne 10.XI.1999

Klíčová slova: popílký, vyluhovací test, anorganické sloučeniny síry

Úvod

Popílek je pevný odpad vznikající při spalovacích procesech zejména při spalování hnědého uhlí v tepelných elektrárnách, ale i ve spalovnách spalujících různé typy odpadů. Velké množství popílku je dosud ukládáno na skládky, nicméně jeho nezanedbatelná část je využívána např. ve stavebnictví¹, jako přídatek do betonu², a je zkoumána i možnost využití popílku pro stabilizaci čistírenských kalů³. Vzhledem k obrovským produkovaným množstvím vyžaduje veškeré nakládání s popílkem důkladné posouzení s tím spojených environmentálních rizik. K tomu je třeba znát nejen údaje o chemickém složení, ale zejména o schopnosti popílku uvolňovat toxické prvky, případně jiné škodlivé složky, do životního prostředí.

Pro hodnocení pevných odpadů je u nás zaveden vyluhovací test podle Metodického pokynu MŽP ČR⁴, jeho aplikace na popílký byla předmětem předchozích sdělení^{5,6}. Při tomto testu se vzorek louží destilovanou nebo deionizovanou vodou, a proto je vyluhované množství dáno především vlastnostmi zkoumaného materiálu. To však nemusí odrážet dostatečně věrně podmínky, jimž je materiál vystaven v přírodě, např. vliv kyselých dešťů. Pro podrobnější studium vlastností odpadů byla navržena řada různých vyluhovacích testů využívajících různých loužicích činidel. Kvalifikovaný přehled vyluhovacích testů pro odpady, sedimenty a kontaminované zeminy zpracovali Kolčava a Toman⁷. Jedním z testů v poslední době často používaných ke studiu vyluhovatelnosti jak anorganických, tak organických kontaminantů^{8–11} je tzv. pH-statický test, při němž se provádí loužení při konstantní hodnotě pH (upravované obvykle kyselinou dusičnou). Tento typ testu (CEN TC 295 WG6) je připravován k harmonizaci v zemích Evropské unie a nedávno byly zveřejněny předběžné výsledky rozsáhlého projektu zaměřeného na sledování vyluhovatelnosti těžkých kovů z různých typů odpadů¹². Obsah vyluhovatelných forem dalších anorganických polutantů v odpadech byl zkoumán méně často, neboť jde z hlediska vlivů na životní prostředí o složky většinou méně nebezpečné. V případě dalšího využití odpadů je však často třeba znát celkové obsahy a vyluhovatelnost některých makrosložek. Jako příklad je možno uvést již zmíněnou aplikaci popílku jako přísady do betonu, kdy je nutno sledovat obsah a vyluhovatelné formy sloučenin síry, neboť tyto sloučeniny způsobují degradaci betonu².

V této práci byl pH-statický vyluhovací test použit ke

sledování vyluhovatelnosti anorganických sloučenin síry z různých typů popílků.

Experimentální část

Materiál a chemikálie

K vyluhovacím testům byly použity tři typy popílků označené CW-6, CW-10 a CW-11. Popílek CW-6 byl zachycen na odlučovačích ve spalovně komunálního odpadu v Miláně, Itálie, popílký CW-10 a CW-11 byly získány z elektráren spalujících hnědé uhlí ze Slovenska, resp. z Maďarska. Vzorky o hmotnosti několika desítek kilogramů byly vysušeny při pokojové teplotě, rozemlety, přesítovány přes síto s velikostí ok 90 μm a homogenizovány v mísicím bubnu po dobu dvou týdnů. Vzorky byly připravovány v Joint Research Centre, Ispra, Itálie, za použití standardních postupů pro přípravu referenčních materiálů¹³. Hlavní krystalické fáze identifikované v popílcích rentgenovou difrakční analýzou a obsahy hlavních prvků stanovené semikvantitativní rentgenovou spektrální analýzou jsou uvedeny v tabulce I. Z rentgenové analýzy dále vyplývá, že síra je v popílcích vázána převážně ve formě oxidických sloučenin, nikoliv ve formě sulfidů.

K vyluhům a přípravě roztoků byla použita deionizovaná voda. K úpravě pH byla použita kyselina dusičná čistoty p. p. nebo hydroxid sodný, p. a. (Lachema, Brno).

Tabulka I

Chemické a fázové složení popílků CW-6, CW-10 a CW-11

Prvek [%]	CW-6	CW-10	CW-11
Na	10,6	0,64	0,34
K	7,6	1,71	0,49
Ca	13,5	3,85	35,2
Mg	0,67	1,19	2,26
Al	3,56	9,70	3,98
Si	4,76	28,2	6,31
Fe	0,80	5,67	2,82
Cl	20,0	<DL ^a	<DL ^a
S	4,26	0,60	8,01
<i>Hlavní identifikované fáze</i>			
	NaCl	SiO ₂	CaSO ₄
	KCl	Fe ₂ O ₃	CaO
	Ca ₂ Al ₂ SiO ₇		Fe ₂ O ₃
	CaSO ₄		

^a Detekční limit

Vyluhovací test

Byl použit postup vycházející z testu připravovaného k harmonizaci technickou komisí CEN TC 292, modifikovaný a ověřený v Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente (ENEA), Řím, Itálie¹⁴. Základní charakteristiky testu jsou: poměr kapalné a pevné fáze 10 : 1, celková doba loužení 24 hod. loužení se provádí vodou při konstantní hodnotě pH udržované přidávkem kyseliny dusičné nebo hydroxidu sodného.

Tabulka II

Opakovatelnost a reprodukovatelnost pH-statického testu vyluhovatelnosti síry z popílku CW-6

Hodnota pH	Vyluhované množství [mg.kg ⁻¹]	Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r [mg.kg ⁻¹]	Variační koeficient opakovatelnosti, V_r [%]	Směrodatná odchylka, reprodukovatelnosti, s_R [mg.kg ⁻¹]	Variační koeficient reprodukovatelnosti, V_R [%]	s_w^a [mg.kg ⁻¹]
3	6050	525	8,68	665	10,99	378
5	5850	222	3,79	233	3,98	190
11	12847	858	6,68	910	7,08	329
N ^b	12648	591	4,67	591	4,67	116

^a Vnitrolaboratorní opakovatelnost dosažená na pracovišti autorů této práce, ^b loužení vodou bez úpravy pH („přirozená“ hodnota pH, pro popílek CW-6 asi 10,5)

Postup zkoušky: K 5 g popílku se přidá 40 ml deionizované vody, směs se míchá pomocí magnetického míchadla po dobu 10 min. a potom se upraví pH na požadovanou hodnotu přidáním 5 mol.l⁻¹ HNO₃ nebo 1 mol.l⁻¹ NaOH. Objem směsi se doplní vodou na 49 ml a pokračuje se v míchání po dobu 21 hod., přičemž se udržuje požadovaná hodnota pH. Po 21 hod. se ukončí regulace pH a pokračuje se v míchání další 3 hod. Potom se filtrací oddělí pevná fáze a filtrát se analyzuje. Během testu se zaznamenává množství přidané kyseliny, případně hydroxidu.

Výluhy popílků byly prováděny v polypropylénových kádinkách uzavřených folií. pH bylo měřeno kombinovanou skleněnou elektrodou OP-0808P (Radelkis, Budapest, Maďarsko), jako pH-stat byl použit laboratorní reaktor LF 3 (Vývojové dílny ČSAV, Praha). pH bylo udržováno s přesností ±0,2 jednotky. K filtraci byly použity membránové filtry 0,45 μm (Millipore, Bedford, USA). Vyluhovací testy byly prováděny při laboratorní teplotě 22±2 °C.

Opakovatelnost a reprodukovatelnost vyluhovacího testu byla ověřena pomocí mezilaboratorní studie v rámci projektu ANALEACH¹⁴ za účasti šesti laboratoří z různých zemí. Výsledky dosažené při měření vyluhovatelnosti síry z popílku CW-6 jsou uvedeny v tabulce II. Výsledky mezilaboratorní studie byly vyhodnoceny podle normy ČSN ISO 5725-2, i když počet zúčastněných laboratoří byl poněkud nižší než doporučuje uvedená norma¹⁵. Je vidět, že vyluhovací test se vyznačuje velmi dobrou opakovatelností i reprodukovatelností i přesto, že v různých laboratořích byly pro stanovení síry použity různé metody (gravimetrie, iontová chromatografie, ICP-OES).

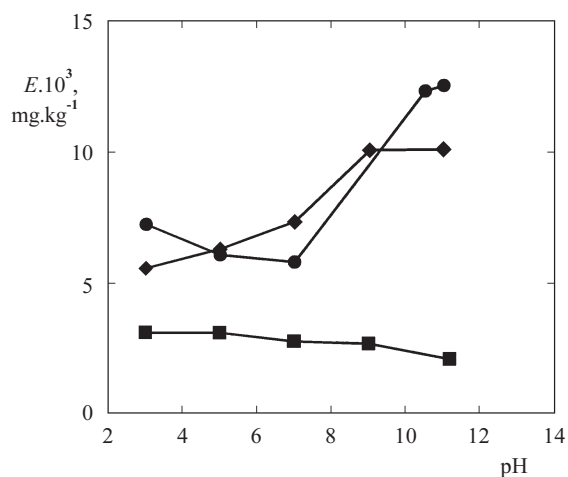
Analýzy výluhů

Metodou iontové chromatografie¹⁶ a klasickými fotometrickými postupy bylo prokázáno, že síra je ve výluzech přítomna ve formě síranů. Jiné anorganické sloučeniny síry, např. sulfidy či siřičitany, nebyly zjištěny. Metodou plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí byly ve výluzech identifikovány některé organické sloučeniny obsahující síru a molekulární síra¹⁴, ovšem jejich koncentrace byly mnohonásobně nižší, než koncentrace anorganických sloučenin síry. V této práci bylo celkové množství síry ve výluzech stanovováno metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) spektrome-

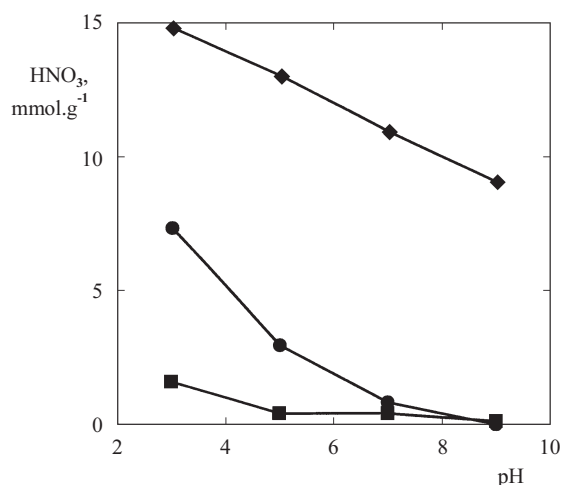
trelem Optima 3000 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) při vlnové délce 180,669 nm.

Výsledky a diskuse

Vyluhovatelnost síry z popílků CW-6, CW-10 a CW-11 byla měřena při několika hodnotách pH v rozmezí asi 3–11. Výsledky přepočtené na navážku vzorku jsou uvedeny na obr. 1. Je vidět, že vyluhovatelnost síry ze vzorku CW-10 je nižší, než z ostatních popílků, a prakticky nezávisí na pH. Je to dáno na jedné straně nízkým celkovým obsahem síry v popílku (viz tabulku I) a na druhé straně odolnou maticí tvořenou z velké části krystalickým oxidem křemičitým. Vyluhovatelnost síry z popílku CW-11 se zvyšuje s rostoucí hodnotou pH. Síra v tomto popílku je přítomna převážně ve formě síranu vápenatého. V případě popílku CW-6 vyluhovatelnost síry v kyselém prostředí mírně klesá s rostoucím pH, v alkalické oblasti naopak vyluhovatelnost stoupá. Tento tvar závislosti lze považovat za charakteristický pro vyluhovatelnost některých kovů (Zn, Cr) z určitých typů materiálů (sedimenty, kontaminované zeminy, popel)¹². Vysvětlit průběh této závislosti není snadné vzhledem ke složitosti dějů probíhajících během loužení. Lze předpokládat, že hodnota pH jednak ovliv-



Obr. 1. Závislost vyluhovaného množství síry na pH loužení při pH-statickém testu, ● CW-6, ◆ CW-11, ■ CW-10



Obr. 2. Množství kyseliny dusičné potřebné na udržení příslušné hodnoty pH při pH-statickém testu, ● CW-6, ◆ CW-11, ■ CW-10

ňuje rozklad matrice zkoumaného materiálu, a dále ovlivňuje složitý soubor následných (vedlejších) reakcí probíhajících ve vyluhu (např. tvorbu komplexů, nebo oxidačně-redukční rovnováhy).

Z množství kyseliny dusičné spotřebované na udržení požadované hodnoty pH během testu lze vypočítat kyselinovou neutralizační kapacitu (KNK) zkoumaného materiálu. Tato veličina významným způsobem ovlivňuje vyluhovatelnost těžkých kovů a dalších kontaminantů z odpadů, jak je diskutováno v práci¹⁷, kde lze také najít standardizovaný postup měření KNK pevných odpadů. Hodnoty KNK zkoumaných popílků měřené pro různé hodnoty pH pomocí pH-statického testu jsou uvedeny na obr. 2.

Závěr

Z analýz a vyluhovacích testů plyne, že některé typy popílků obsahují značné množství síry, která je v závislosti na podmínkách loužení více či méně snadno uvolňována ve formě síranových iontů v takových množstvích, že může dojít k překročení limitních hodnot stanovených Metodickým pokynem MŽP ČR⁴. Například pro popílek CW-6 byly koncentrace síranů ve vyluzích v rozmezí asi 1700–3700 mg.l⁻¹, a tedy ve všech případech (i při loužení vodou) překračovaly limitní hodnotu třídy vyluhovatelnosti I/II, která je 250 mg.l⁻¹. Schopnost popílků uvolňovat sloučeniny síry je však třeba vzít v úvahu především v případech, kdy popílků slouží jako suroviny pro další průmyslové využití.

Tato práce vznikla v rámci projektu ANALEACH – Development and harmonisation of analytical procedures to quantitative leaching of inorganic and organic contaminants from fly ash (projekt INCO-Copernicus ERB-IC15-CT96-0811), účast v projektu je podporována též z grantu MŠMT (OK 296). Mezilaboratorní studie pro určení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti testu se zúčastnila následující pracoviště: Insti-

tute for Environmental Studies, Amsterdam, Entre per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente, Řím, Environmental Institute, Koš (Slovensko), University of Vesprém, University for Horticulture and Food Industry, Budapest.

LITERATURA

1. Bolt N., Snel A.: Kema Sci. Techn. Rep. 4, 125 (1986).
2. Chinchón J. S., López-Soler A., Travería A., Vaquer R.: Mater. Struct. 24, 13 (1991).
3. Wang S., Viraraghavan T.: Waste Manage. 17, 443 (1997).
4. Metodický pokyn pro stanovení vyluhovatelnosti odpadů. Příloha zpravodaje MŽP ČR, č. 9, str. I (1998).
5. Janoš P., Hodslavská J., Ditz J.: Chem. Listy 93, 639 (1999).
6. Janoš P., Hamalová M.: Chem. Listy, 93, 806 (1999).
7. Kolčava D., Toman J.: Příprava vzorků pro chemickou analýzu III, Radějov u Strážnice, květen 1998. Sborník, str. 44.
8. Sommerfeld F., Schwedt G.: Acta Hydrochim. Hydrobiol. 24, 255 (1996).
9. Sommerfeld F., Schwedt G.: Z. Umweltchem. Ökotox. 8, 303 (1996).
10. Blum U., Schwedt G.: Z. Umweltchem. Ökotox. 10, 295 (1998).
11. Hirner A. V., Pestke F. M., Busche U.: Acta Hydrochim. Hydrobiol. 26, 226 (1998).
12. Network on Harmonization of Leaching/Extraction Tests. Newsletter, No. 5, March 1999.
13. Kramer G. N., Muntau H., Maier E., Pauwels J.: Fresenius' J. Anal. Chem. 360, 299 (1998).
14. Ariese F. (ed.): ANALEACH: Development and harmonisation of analytical procedures to quantitative leaching of inorganic and organic contaminants from fly ash. 2nd progress report. Institute for Environmental Studies, Vrije Universiteit, Amsterdam, Report No. W-99/24, June 1999.
15. ČSN ISO 5725-2: Přesnost (správnost a shodnost) metod a výsledků měření – Část 2: Základní metody pro stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované metody měření (leden 1997).
16. Janoš P., Poslední M.: Scr. Fac. Sci. Natur. Univ. Masaryk. Brun, Chemistry 27–28, 101 (1998).
17. Poon C. S., Lio K. W.: Waste Manage. 17, 15 (1997).

P. Janoš and M. Wildnerová (Research Institute for Inorganic Chemistry, Ústí nad Labem): **Study of Extractability of Inorganic Sulfur Compounds Using a pH-stat Leaching Test**

A pH-stat test was used to assess extractability of inorganic sulfur compounds from fly ashes. The tests were performed in the pH range 3–11. Constant pH values were maintained by addition of dilute nitric acid or sodium hydroxide solutions. The only inorganic sulfur-containing species identified in the extracts was sulfate. The method showed excellent precision: relative standard deviations of repeatability and reproducibility were in the ranges 4.67–8.68 % and 4.67–10.99 %, respectively.

RECENZE

M. Meloun, J. Militký:
Statistické zpracování experimentálních dat
 East Publishing, Praha 1998. Stran 839.

Kniha *Statistické zpracování experimentálních dat* je pokračováním předchozí přibližně desetileté publikační řady dvojice M. Meloun a J. Militký. Poslední vydání navazuje na knihu Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*, Plus, Praha 1994 a obsahuje řadu úprav a hlavně rozšíření o úlohy k samostatnému procvičování.

Obsah a zaměření knihy vyjadřuje nejvýstižněji podtitul knihy – statistické zpracování experimentálních dat v chemometrii, biometrii, ekonometrii a v dalších oborech přírodních, technických a společenských věd. Hlavní kapitoly knihy jsou věnovány identifikaci chyb instrumentálních měření, průzkumové a statistické analýze dat, analýze rozptylu, lineární a nelineární regresní analýze, korelační analýze, interpolaci a aproximaci funkcí a experimentálních dat. Součástí knihy jsou také dodatky o derivaci a integraci naměřených dat nebo odvozených modelů a základní informace o počítačovém programu pro statistické zpracování dat ADSTAT. Závěr každé kapitoly tvoří stručný, avšak velmi praktický přehled literatury.

K procvičování, k snadnějšímu pochopení vysvětlované látky i k určité vzorové předloze pro řešení vlastních úloh nabízí kniha velké množství řešených příkladů teoretického charakteru i z běžné laboratorní praxe.

Kniha je bezesporu vhodnou pomůckou pro vysokoškolské studenty, pracovníky vysokých škol, výzkumných ústavů, kontrolních laboratoří a zkušeben. Pro studenty je však obtížné v některých pasážích knihy encyklopedického charakteru rozzeznat, co je více nebo méně důležité, co má pouze okrajový význam pro praktickou, optimální formu prezentace výsledků zpracování experimentálních dat.

Zdeněk Bělohlav

T. D. W. Claridge:
High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Tetrahedron Organic Chemistry Series, Volume 19
 Pergamon, Elsevier Science, Amsterdam 1999, ISBN 0-08-042798-7. Stran 384; cena 49,50 USD.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) dnes nepochybně představuje nejuniverzálnější spektroskopickou metodu poskytující detailní informace o struktuře a dynamických vlastnostech organických i anorganických látek a biomakromolekul v kapalném a pevném stavu. Využívání NMR spektroskopie je součástí každodenní práce v moderní výzkumné chemické laboratoři. Metoda se stále rychle vyvíjí, zejména v oblasti experimentálních technik. V odborné literatuře jsou uvedeny stovky technik, popisovaných odborným žargonem a často označovaných akronymy. Pro nespécialistu v oboru tak může být obtížné se v záplavě technik orientovat a rozhodnout jaký typ experimentu volit pro efektivní řešení daného chemického problému. Kniha T. D. W. Claridge si klade za cíl podat přehled o nejdůležitějších moderních technikách NMR spek-

troscopie v kapalném stavu, vysvětlit jaké informace jednotlivé techniky poskytují, popsat jak fungují a také poradit s jejich praktickým prováděním.

Kniha je rozdělena do devíti kapitol. Úvodní kapitola krátce popisuje vývoj NMR spektroskopie, nomenklaturu pulsních sekvencí a podává stručný přehled moderních NMR technik a jejich použití.

Druhá kapitola zavádí vektorový model popisu NMR technik a popisuje chování chemických posunů a interakčních konstant během pulsních experimentů. Pomocí tohoto modelu pak popisuje relaxaci jader, jednotlivé relaxační mechanismy a metody měření relaxačních rychlostí.

Třetí kapitola je věnována praktickým aspektům NMR experimentů. Stručně a srozumitelně popisuje základní části a funkce NMR spektrometru, akvizici a zpracování dat (excitaci jader a detekci signálu, fázování, použití vážících funkcí, lineární predikci), správnou přípravu vzorku (volbu rozpouštědla a standardu, objemu vzorku a velikosti kvety, filtraci a odplynění) a přípravu NMR spektrometru před měřením (ladění sondy, lokování, optimalizaci homogenity pole, kalibraci rf pulsů a dekapleru, použití gradientů a provedení testů). Popis přitom není závislý na typu NMR spektrometru.

Čtvrtá kapitola popisuje základní „jednorozměrné“ NMR experimenty a homo- i heteronukleární dekaplink. Diskutuje metody pro zvýšení citlivosti založené na přenosu polarizace, techniky editace ^{13}C spekter podle počtu přímo vázaných vodíků a speciální požadavky a postupy pro pozorování širokých signálů jader s kvadrupólovým momentem.

Princip 2D NMR spektroskopie je uveden v páté kapitole, která se dále zaměřuje především na homonukleární korelační 2D techniky, založené na detekci homonukleárních spin-spinových interakcí. Dále je vysvětlen princip a použití gradientů magnetického pole.

Heteronukleární korelační techniky, principy koherence, jejího přenosu a vícekvantových filtrací jsou obsahem šesté kapitoly. Její těžiště představují tzv. inverzní metody, využívající výrazně vyšší citlivosti vodíků k nepřímé detekci heterojader a použití pulsních gradientů magnetického pole k potlačení nežádoucích signálů.

Sedmá kapitola je zaměřena na hetero- a homonukleární techniky, umožňující separovat ve spektrech chemické posuny od interakčních konstant (2D-spektra rozlišená podle J) a jejich aplikace.

Interakce jader přes prostor v podobě nukleárního Overhauserova efektu (NOE) a chemická výměna jader jsou předmětem osmé kapitoly. Po vysvětlení principu jeví následuje popis 1D a 2D NMR technik používaných k detekci NOE v laboratorním nebo rotujícím souřadném systému a pozorování výměnných procesů. Na řadě konkrétních příkladů je demonstrováno použití uvedených technik při řešení konformačních problémů.

Poslední devátá kapitola popisuje speciální prostředky, které se objevují jako elementy řady moderních pulsních sekvencí. Jedná se o složené pulsy, spinlock, selektivní excitaci a tvarované pulsy, potlačení signálu rozpouštědla, měření spekter vzorků rotujících pod magickým úhlem (analýza pro-

duktů vázaných na polymerní nosič v pevné fázi) a techniky separace spekter složek směsi podle rychlosti jejich difuze v roztoku. Každá kapitola obsahuje vlastní soubor odkazů na původní práce a specializované monografie. Kniha je doplněna slovníčkem akronymů nejčastěji používaných v odborné NMR literatuře.

Autor pracuje v laboratořích Dyson-Perrins v Oxfordu, stejně jako A. E. Derome, jehož kniha *Modern NMR Techniques for Chemistry Research* z roku 1987 si získala velkou popularitu a oblibu mezi zájemci o NMR z řad chemiků. Kniha T. D. W. Claridge se jí svým obsahem, formou i srozumitelností výkladu podobá a navíc reflektuje prudký rozvoj NMR metodologie, ke kterému došlo během zhruba deseti let od vydání knihy A. E. Deroma. Vynikající je grafická úroveň knihy s velkým množstvím názorných obrázků a NMR spekter.

Knihu mohu doporučit nejen všem chemikům, kteří aktivně nebo pasivně využívají NMR spektroskopii ve své práci a vysokoškolským studentům chemických oborů, ale i NMR specialistům např. pro přípravu kursů. Při popisu NMR jeví a technik autor používá důsledně nematematický přístup, což jistě přivítá řada čtenářů. Z široké plejády technik jsou – podle zkušeností recenzenta – velmi citlivě vybrány pouze ty, které nacházejí obecnější uplatnění při řešení struktur, zejména organických sloučenin. Jak vyplývá z výše uvedeného obsahu jednotlivých kapitol, kniha neobsahuje detailní popis základních NMR parametrů – chemických posunů a interakčních konstant – ani podrobnou diskusi jejich vztahu k chemické struktuře. Tento typ informací stejně jako soubory NMR dat různých typů látek může čtenář najít v mnoha jiných NMR monografiích.

Miloš Buděšinský

R. Panico, W. H. Powell, J.-C. Richer
(hlavní redaktor):

**Průvodce názvoslovím organické chemie podle IUPAC.
Doporučení 1993**

Do českého názvosloví převedli Jaroslav Kahovec, František Liška a Oldřich Paleta
Academia, Praha 2000, ISBN 80-200-0724-5. Stran 220; cena 179,- Kč.

Nejdokonalejším znázorněním struktury organické sloučeniny je samozřejmě trojrozměrný model. Nemůže bohužel sloužit jako jediný sdělovací prostředek pro písemná sdělení, která vyžadují vyjádření struktury slovy, názvem a toto názvosloví má nutně řadu konvencí, kterých s prohlubujícím se poznáváním a rostoucím počtem organických sloučenin stále přibývá.

Od pověstného ženevského kongresu v r. 1892, na kterém první pravidla formulovala Mezinárodní komise pro nomenklaturu, přešla tato práce v r. 1919 na nově vytvořenou Mezinárodní unii pro čistou a užitou chemii, kde se z našich odborníků podílel nejprve E. Votoček a později K. Bláha. Po několika postupných krocích byla výsledkem Nomenklatura organické chemie Pravidla IUPAC 1979. Zatím posledním krokem je Průvodce názvoslovím organických sloučenin podle IUPAC Doporučení 1993, který zahrnuje i změny od roku 1979.

Diskuse českého převodu nomenklatury IUPAC začala již v roce 1965, pokračovala na stránkách Chemických listů a vyústila posléze v postupně trojí vydání Nomenklatury organické

chemie v letech 1965–1985. Recenzovaná kniha je českým převodem zmíněného posledního elaborátu IUPAC, a byla zpracována opět velmi pečlivě a zodpovědně v tradici předcházejících českých názvoslovných převodů.

Náš „aktivní i pasivní“ uživatel organické nomenklatury si tedy na nedostatek literatury nemůže stěžovat. V recenzované příručce najde i poslední změny a tedy vlastně i poslední stav vývoje. Změny nejsou zásadní, většinou jen pravopisné a není jich mnoho. Uvedu jen stručně jejich podstatu, neopíšu text Průvodce.

První vycházejí již z anglického originálu. Je to změna přípony -in pro vyjádření trojné vazby na -yn, bude tedy obecně alkyn místo dosavadního alkin. Dále je to přesun lokantů násobných vazeb, volných valencí a hlavních skupin. Tedy ne již 2-buten a 2-propanol, ale but-2-en a propan-2-ol. V souvislosti s podrobněji popsáním zavedením názvů dalších jednojaderných hydridů (např. azan NH₃, sulfan SH₂ aj.) není nadále vhodný název merkapto- a methylthio-, ale sulfanyl- a methylsulfanyl-.

Další změny vyplývají až v převodu z pravopisných rozdílů mezi češtinou a angličtinou. Tak názvy esterů a ketonů jsou v angličtině víceslovné (phenyl acetate, ethyl methyl ketone), což je pro češtinu nepřijatelné. Dosavadní převod používal proto jednoho slova a jen při nesrozumitelnosti závozek. Recenzovaný Průvodce zavádí nyní u esterů spojovník (propyl-acetát) u ketonů závočky (ethyl(methyl)keton). Nejčastěji se uživatel jistě setká s další změnou v pravopisu esterů. Připomeňme, že dosavadní převody nepokládaly nomenklaturní výrazy za součást českého jazyka a důsledně v nich proto neoznačovaly délku diakritickými znaménky. Byl tedy butan, ale i acetat. To první zůstává, ale ty zřejmě nejvíce česky znějící estery dostávají nyní svoji výjimku. Nadále bude tedy zcela legální acetát. Všechny změny schválila již Česká komise pro nomenklaturu organické chemie.

Změny v pravopisu názvosloví přijímá nepochybně mnohý jeho uživatel s nelibostí. Ale co dělat, jen s jejich respektováním může jeho rukopis být skutečně na vyšší doby. Proto nekončím recenzii zprofanovanou frází „... kniha je cenným přírůstkem našich knihoven“. Naopak: jako příručka by měla být skutečně při ruce každého organického chemika, který s nomenklaturou aktivně pracuje.

Jiří Gut

W. Steglich, B. Fugmann,
S. Lang-Fugmann (Eds):

Römp Encyclopedia, Natural Products

G. Thieme Verlag, Stuttgart 2000, ISBN 3-13-117711-X.
Stran 750; cena 498,- DEM.

V roce 2000 vydalo nakladatelství Georg Thieme Verlag, Stuttgart přepracované vydání německé verze encyklopedie z roku 1997. Kniha vznikla kompilací předních německých chemiků zabývajících se přírodními látkami. Tato encyklopedie přináší názorný pohled na krásy a strukturální různorodost přírodních látek. Zabývá se informacemi o chemické struktuře, stereochemii, biologických a fyzikálních vlastnostech, biologické dostupnosti popsaných látek a jejich možným lékařským využitím. Téměř 6 000 látek je popsáno (i přes to, že kniha má 39 autorů) koncizně a koherentně, tak, že i člověk, který nemá velkou zkušenost v oboru načerpá potřebné infor-

mace. Kniha je moderní jak zpracováním, tak tématy a hesly, které popisuje.

Pro zachování rozumného objemu knihu byly pojednány marginálně makromolekulární sloučeniny, peptidy a bílkoviny. Při výběru hesel zařazených do encyklopedie byl kladen důraz na biologickou aktivitu a zaměřuje se na sekundární metabolity. Mezi nimi vybírá z 170 tisíc známých sekundárních metabolitů ty, které splňují výše uvedené kritérium. Encyklopedie ilustruje svět antibiotik, aklaloidů, feromonů, flavonoidů, ionoforů ale i drog, návykových látek a mnoha dalších skupin. Primární metabolity jsou zařazeny pouze ty nejdůležitější a ty, které mají vztah k zvoleným tématům.

Literatura je pokryta do roku 1999 a je uváděna u každého hesla zvlášť. Některé časté citace jsou uváděny zkratkovitě, seznam zkratk je uveden na začátku. V rámci literatury jsou citována registrační čísla CAS. Encyklopedii doplňuje rejstřík sumárních vzorců a rejstřík latinských jmen pojednaných specií.

Sazba je provedena velmi přehledně, informace jsou velmi účelně odlišeny a v knize se hledá velmi jednoduše. U důležitých hesel se encyklopedie zabývá výskytem, složením, detekcí, použitím, synonymy, metabolismem, chemickou ekologií, fyziologií, toxicitou, biosyntézou, historií, aktivitou i průmyslovou výrobou a využitím. U druhových pojmů (skupinových hesel) se zabývá i zobecňujícími poznámkami, které však nejsou do zbytečných detailů. Použité vzorce jsou strukturního typu s vyznačenou stereochemií, takže poskytují kvalitní informaci „na první pohled“. Zdá se, že je správně, že všechny vzorce nakreslily dvě ilustrátorky a ne 39 autorů.

Dnešnímu čtenáři asi přijde líto, že takové dílo není zároveň v elektronické podobě, prohledávatelné pomocí parciálních vzorců anebo všeobecných dotazů. Snad se toho dočkáme brzy.

Velmi kvalitní příručku lze doporučit do knihovničky všech organických chemiků, biochemiků, učitelů i dalším zájemcům. Asi by neměla chybět v žádné chemické knihovně.

Pavel Drašar

P. J. Kocięński:

Protecting Groups, Corrected Edition

G. Thieme Verlag, Stuttgart 2000, ISBN 3-13-137002-5. Stran 260; cena 99,- DEM.

V roce 2000 vydalo nakladatelství Georg Thieme Verlag, Stuttgart nové vydání knihy, která poprvé vyšla v roce 1994. Jde o přepracovanou a doplněnou příručku s doplněnou literaturou, která je uvedena na konci každé kapitoly. Ve skutečnosti nejde o „druhé vydání“, ale o reinkarnaci prvního. Jak uvádí celá řada chemiků, poněkud odlišný přístup této knihy ji činí velmi vhodným komplementárním materiálem k jiným příručkám o chránicích skupinách.

To co je na knize poněkud odlišné, že její výklad se otevírá objasněním koncepce ortogonalit chránicích skupin. Celá první kapitola pojednává o chránicích skupinách z pohledu chemika, který je před problémem tyto skupiny odštěpit. Kapitola se zabývá i otázkou dočasného chránění a problémem účasti chránicích skupin na probíhajících reakcích. Další kapitoly uvádí systematiku chránění hydroxylové skupiny, diolů, karboxylu, karbonylu a aminů. Knížka se, vzhledem k svému rozsahu, příliš nezabývá obširným vyjmenováváním okrajových možností ani excesivnímu vyjmenovávání možných

chránicích skupin. Poslouží velmi dobře tam, kde jde o přímočarou chemii s „vyzkoušenými“ parametry.

Kde je třeba, tam je syntetická informace doplněna i o další chemické informace a případně i fyzikálně-chemický komentář. Většinou je diskutována změna protonového NMR po zdařilém připojení chránic skupiny.

Epilog se zabývá praktickou syntézou (9S)-dihydroerythrolidu A, na které autor předvádí prakticky „krásu a velikost“ chemie chránicích skupin.

Knížka je vybavena kvalitním rejstříkem a na předsádce zjednodušeným přehledem chránicích skupin se stránkovými odkazy. Text provází na 500 strukturních vzorců.

Pavel Drašar

T. W. Greene, P. G. M. Wuts:

Protective Groups in Organic Synthesis

Wiley Interscience, New York 1999, ISBN 0-471-16019-9. Stran 780; cena 58,50 GBP.

Hovoříme-li o srovnání čehokoliv s knihou o chránicích skupinách nemůžeme pominout klasický bestseller o polovinu rozšířený od vydání minulého, který „téměř“ vyčerpávajícím způsobem přináší informace o 1050 nejužívanějších chránicích skupinách s 5350 odkazy na literaturu. Deset přehledných tabulí s 28 tisíci informačními vstupy srovnává reaktivitu hlavních 270 chránicích skupin s 108 reagenciemi.

Knih přináší systematickou informaci o chránicích skupinách rozdělených do šesti skupin, hydroxyl, amin, karboxyl, karbonyl, sulfhydryl a fosfát, plus chránění alkynového CH. Přináší informace i o moderních trendech jako jsou enzymatické metody a podobně.

„Theodora“ nemůže chybět v žádné laboratoři, která to s organickou chemií myslí vážně.

Pavel Drašar

G. van Look, G. Simchen, J. Heberle:

Silylating Agents, Derivatization Reagents, Protecting-Group Reagents, Organosilicon Compounds, Analytical Application, Synthetic Applications

Fluka Chemie AG, Buchs 1995, ISBN 3-905617-07-2. Stran 200, zdarma.

Doplnění knihovničky o cennou příručku aniž to jejího majitele bude stát „korunu“ je vždy a všude oceňováno. Dovolím si proto doplnit recenze knih o chránicích skupinách doporučením této, i když nevyšla „letos“.

Kvalitní příručka, vybavená – jak náleží – citacemi a schémata přináší „téměř vše“ o chránicích skupinách obsahujících křemík, včetně kapitoly o silanizaci povrchů (např. skla). Přináší i tabulky srovnávající činidla i některé teoretické podklady pro různou stabilitu odlišných trialkylsilylových chránicích skupin.

Knížka je, a proto je distribuována zdarma, na svých závěrečných 70 stranách vybavena informací o tom, co všechno pro nás může na poli odpovídajícím názvu příručky udělat společnost Fluka.

Velmi kvalitní příručku lze doporučit do knihovničky všech organických chemiků i dalším zájemcům.

Pavel Drašar

DISKUSE

Zavedeme názvoslovnou policii?

Nemohu nereagovat na článek kolegy Kahovce¹, v němž kritizuje používání „nesprávných“ chemických názvů v učebnicích, populárních i vědeckých publikacích, v časopisech všeho druhu, v encyklopediích, tabulkách, patentových spisech, legislativních dokumentech a atd. Reaguji ani ne tak kvůli názvosloví samotnému, které je velmi vděčným tématem pro nekonečné diskuse. Tuto skutečnost si uvědomoval už V. Šafařík², když si postěžoval: *Nerad zmiňuji se o názvosloví chemickém, poněvadž vím, že v té věci nejméně vyhověti požadavkům všem, namnoze přímo si odporujícím.* Reaguji proto, že při hledání příčin používání nesprávného názvosloví dochází autor článku¹ k závěrům, s nimiž nemohu souhlasit.

Především si nemyslím, že je situace v používání „správného“ názvosloví tak „tristní“. Není o nic smutnější, nežli tomu bylo před léty. A už vůbec není pravda, že „správnému“ názvosloví se nezdáříka neučí ani na chemických vysokých školách ... a neznají ho ani vyučující...“.

Co však kolega Kahovec považuje za „správné“ chemické názvosloví? Z obsahu článku vyplývá, že to jsou pravidla pro tvorbu názvů zpracovaná Komisí pro názvosloví organické chemie Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii, která pro knižní vydání z roku 1993 zpracovali Panico, Powell a Richer³. Tato příručka novelizuje dosavadní pravidla a upozorňuje na případné změny oproti původnímu kompendiu⁴ z roku 1979. Český překlad⁵ (převod) této příručky provedli Kahovec, Liška a Paleta a se schválením české komise pro nomenklaturu organické chemie (předseda O. Červinka) vyšel s finanční podporou AV ČR v nakladatelství Academia začátkem roku 2000.

To však znamená, že až do této doby byla česká chemická veřejnost odkázána na pravidla shrnutá v knize *Nomenklatura organické chemie*⁶ z roku 1985. Nelze se proto divit, že změny, ke kterým došlo, nejsou už obsaženy v knihách, tabulkách apod.

S chystanými změnami oproti poslednímu vydání Nomenklatury⁶ byli však seznamováni učitelé i studenti nejen na našem Ústavu, ale i na katedrách organické chemie ostatních fakult už v době překladu Průvodce⁵ do češtiny. Základní informace dostávali průběžně i učitelé chemie na nižších stupních škol^{7,8}.

Všeobecnou toleranci chemiků k „nesprávným názvům“, pokud vůbec existuje, nevidím v tom, že by se ve škole neučili pravidlům platným v dané době, ale v tom, že výkonné chemiky vždy zajímá hlavně způsob přípravy daných látek a jejich struktura, z níž vyčtou víc informací nežli z často dlouhého názvu. Bylo by smutné, kdyby přestali „vařit“ z obavy, že vzniklý produkt nepojmenují správně.

Na rozdíl od kolegy Kahovce nepovažuji přípony vyjadřující formální oxidační stupeň centrálního atomu v anorganických sloučeninách (-ný, -natý, ...-ičelý) jenom za „český folklor s nepatrným významem...“. Myslím, že je to názor příliš příkrý. Zmíněné přípony nepotřebují advokáta. Svoji roli a svůj význam při výuce i v komunikaci mezi českými chemiky prokazují po několik generací. To však neznamená, aby se

i v českém názvosloví nepřipustily také alternativní počestlé názvy anglické.

Jak se vypořádat s fonetickými tvary názvů organických sloučenin, které jsou obsaženy v Akademickém slovníku? Je několik možností. Smířit se s nimi, bojovat proti nim, nebo přejít na fonetický přepis názvů i ostatních organických sloučenin podobně jako to učinili kolegové⁹ na Slovensku, nebo vycházet z toho, že chemické názvosloví je jazykem pro vědeckou komunikaci a psát je v „IUPAC tvaru“ i v učebnicích na nižších stupních škol. Přimlouval bych se za tu poslední variantu už proto, že studenti navštěvují sice české přednášky, ale už začínají studovat z doporučených a dostupných anglicky psaných učebnic. Je škoda, že si věda neponechala latinu aspoň pro odbornou terminologii a tak se musíme podřítit angličtině – „latině současnosti“.

Přiznám se, že mne fonetické tvary názvů typu glukóza, fruktóza a pod. v člancích novinových i populárně vědeckých, neurážejí, jsou-li používány v rámci článku, časopisu důsledně. K jejich míšení s „tvary podle IUPAC“ by však docházet nemělo. Tvůrčí činnosti redaktora takového časopisu však nezabrání žádná názvoslovná cenzura ani instituce typu názvoslovné policie. Ostatně, ani názvoslovná komise IUPAC neprezentuje zmíněná pravidla jako zákonnou normu, ale jenom jako „Recommendations“³ a jako „Doporučení“⁴ je uvádí i český překlad.

Ten, kdo touží po názvech jedinečných, se musí obrátit na názvosloví, které používá Chemical Abstracts Service¹⁰ (CAS) a které je rovněž správné; vyvíjelo se paralelně v obecném souladu s pravidly IUPAC a upravuje je pro specifické potřeby vysoce organizovaného abecedního rejstříku. Zatímco pravidla IUPAC umožňují vytvářet jeden i více správných alternativních názvů ke sloučenině dané struktury, což nečiní komplikace při komunikaci mezi chemiky, pro rejstříky Chemical Abstracts se musí vytvářet názvy jednoznačné, jedinečné a zcela reprodukovatelné. Proto považuji násilné převádění „abstraktových“ názvů sloučenin, opatřených navíc tzv. „CAS Registry Numbers“, na názvy „správné“ za zbytečnou a kontraproduktivní činnost, zejména u seznamů přebíraných různými institucemi v rámci globalizačních aktivit. Postačí převést je z anglického pravopisu na pravopis český.

Bude asi užitečnější seznámit čtenáře s obsahem vydaného „Průvodce“⁵ a upozornit ho na změny, k nimž došlo oproti Nomenklatuře⁶ z roku 1985. Ve srovnání s Nomenklaturou organických sloučenin⁶, která je stále dostupná v prodejnách Academia, je uvedený Průvodce⁵ spíše návodem na to, jak tvořit názvy organických sloučenin, nežli vyčerpávajícím popisem tvorby názvů jednotlivých tříd sloučenin.

Kniha je rozdělena do deseti kapitol a zahrnuje definice základních pojmů, obecné principy organického názvosloví, přehled základních hydridů a od nich odvozených substituentů, přehled charakteristických (funkčních) skupin a tvorbu názvů jednotlivých tříd sloučenin. Jsou rovněž uvedeny kapitoly věnované stereochemickému označení, izotopově modifikovaným sloučeninám a přehledu triviálních a semisystematických názvů, které se zachovávají. Překladatelé zařadili přehled článků o českém chemickém názvosloví a chemické

terminologii, jakož i přehled názvoslovných norem ze všech oblastí chemie, které převzali z časopisu *Helv. Chim. Acta*¹¹.

Překlad je kompromisem mezi nutným respektem k doporučeným pravidlům IUPAC a snahou o maximální formální i terminologickou podobu české a anglické formy názvu organické sloučeniny, jakož i snahou o minimální počet změn vůči předcházejícímu vydání Nomenklatury⁶.

S největšími rozpaky bude asi přijímána zásada umísťovat lokanty před přípony, které vyjadřují přítomnost dvojných vazeb a funkčních skupin resp. volných valencí, jako např. but-1-en místo dřívějšího 1-buten, podobně cyklohexa-1,4-dien, butan-2-ol, benzen-1,2,4-triol, butan-2-on, pentyl lze vyjádřit také jako pentan-1-yl, 1-methylbutyl jako pentan-2-yl. Vznikají tak „koktavé“ názvy, jejichž nevýhoda se bude projevovat spíše v projevu mluveném nežli v psaném. V názvosloví CA však zůstává 1-buten, 2-propanol atd.

Patrně nejvýraznější gramatickou změnou je vyjádření trojných vazeb příponou -yn místo dosavadní přípony -in, např. alkyn, ethyn, but-1-yn.

V názvech polycyklických a spirocyklických sloučenin se čísla označující velikost jednotlivých kruhů neoddělují čárkou, ale tečkou, např. bicyklo[2.2.2]oktan, spiro[3.4]oktan.

Zvláštní upozornění si zaslouží názvosloví esterů a solí kyselin. Na rozdíl od předcházející normy⁶ se místo krátké přípony -at vracíme k příponě -át a kation, alkyl, případně proton oddělujeme v názvu spojovníkem, např. ethyl-acetát, natrium-acetát, natrium-hydrogen-ftalát, ethyl-hydrogen-ftalát. Lze akceptovat i názvy octan ethylnatý a octan sodný, nelze však akceptovat názvy jako např. acetát ethylnatý nebo acetát sodný. Návrat k dlouhým příponám -át, používaným dříve¹², je dán tím, že se nevzily a i proto, že dlouhé přípony -át se používají v biochemii v názvech solí a esterů a také připravovaný překlad *Nomenclature of Inorganic Chemistry, Recommendations 1990*, ed. G. J. Leigh (Blackwell Science) bude stejnou zásadu akceptovat v alternativních názvech solí¹³.

Spojovník se zavádí také v názvech oniových solí k oddělení kationtu a aniontu, např. tetramethylamonium-bromid, a k oddělení morfémů *terc-* a *sek-* místo dosavadních *terc.* a *sek.*

Z formálních změn si zaslouží zmínku zavedení kulatých závorek k odlišení alkylů v českých funkčních skupinových názvech etherů, aminů, ketonů, sulfidů, peroxidů, sulfoxidů, atd., např. ethyl(methyl)propylamin, ethyl(methyl)ether, butyl(ethyl)sulfoxid.

Pro pojmenování jednoduchých hydridů se zavádějí také alternativní názvy, jako např. azan (NH₃), diazan (NH₂-NH₂), diazen (NH=NH), oxidan (OH₂), sulfan (SH₂), ale i fluoran (FH), chloran (ClH) atd.

Jako deriváty azanu lze pojmenovat alkyl- resp. arylaminy, např. ethylazan vedle tradičního názvu ethylamin nebo ethanamin, ale i imidy jako diacylazany (RCO-NH-COR) a *N*-acylimidy ((RCO)₃N) jako triacylazany.

Dochází rovněž ke změně předpon názvů některých funkčních skupin jako například sulfanyl (-SH) místo merkopto,

alkylsulfanyl (-SR) místo alkylthio (CA alkylthio ponechávají), halogenkarbonyl (-COCl) místo halogenformyl.

Hydroperoxydy lze alternativně pojmenovávat jako deriváty dioxidanu (např. fenylidioxidan C₆H₅-OOH) a sloučeniny s disulfidickou vazbou jako deriváty disulfanu (např. ethyl-disulfan C₂H₅-SSH a ethyl(fenyl)disulfan C₂H₅-SS-C₆H₅).

Uvedené a další změny, které přináší Průvodce⁵, by měly být respektovány redaktory odborných časopisů a autory nově vydávaných učebnic, skript a knih. To však neznamená, že by se měla voda nahrazovat hned oxidanem. Přejít od sirovoxdíku k sulfanu byl by však zcela bezbolestný. Při tvorbě názvů asymetricky substituovaných azolátek a azoxylátek určitě oceníme, můžeme-li je nazvat jako deriváty diazenu, např. (Z)-1-fenyl-2-(4-methylfenyl)diazen-1-oxid.

Změny nepochybně proniknou i do výuky na všech stupních škol nejprve tak, že na ně budou učitelé upozorňovat. Nemohou a nesmí být důvodem k tomu, aby se ihned přepisovaly stávající učebnice a už vůbec ne k tomu, aby studenti byli klasifikací postihováni za to, že jimi vytvořený název neodpovídá „up to date“ pravidlům, zvláště když vede k jednoznačně správné struktuře.

Nakonec odpovím na otázku v nadpise tohoto příspěvku: „To snad ne.“

František Liška

LITERATURA

1. Kahovec J.: *Chem. Listy* 94, 953 (2000).
2. Šafařík V.: *Počátkové chemie*. Vlastním nákladem. Praha 1884.
3. Powell W. H., Panico R., Richer J.-C.: *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds 1993*. Blackwell, Oxford 1993.
4. *Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC*. Pergamon Press, Oxford 1979.
5. Powell W. H., Panico R., Richer J.-C.: *Průvodce názvoslovím organických sloučenin podle IUPAC, Doporučení 1993*. Academia Praha 2000.
6. Bláha K., Ferles M., Staněk J.: *Nomenklatura organické chemie. Pravidla IUPAC 1979, oddíl A, B, C, D a F*. Academia, Praha 1985.
7. Liška F.: *Biologie, Chemie, Zeměpis* 8, 25 (1999).
8. Liška F.: *Biologie, Chemie, Zeměpis* 9, 246 (2000).
9. Heger J., Devínský F.: *Názvoslovie organických zlúčenín*. Univerzita Komenského, Bratislava 1997.
10. *IUPAC Recommendation on Nomenclature, Symbols, and Terminology*, *Helv. Chim. Acta*. 83, 12 (2000).
11. *Naming and Indexing of Chemical Substances for Chemical Abstracts*, Appendix IV, 1992 Index Guide.
12. Bláha K., Ferles M., Staněk J.: *Nomenklatura organické chemie. Pravidla IUPAC 1969, oddíl A, B a C*. Academia, Praha 1974.
13. Pavlík I.: soukromé sdělení.

Redakce Chemických listů vyhověla žádosti představitelů ČSBMB a zveřejňuje příspěvky, které měly být zařazeny do Sborníku XVII. biochemického sjezdu v čísle 8/2000 Chemických listů.

STRUCTURE AND INTERACTIONS OF AN ANTIBODY INHIBITING HIV PROTEASE

PAVLÍNA ŘEZÁČOVÁ^a, JIŘÍ BRYNDA^a, JULIEN LESCAR^b, MILAN FÁBRY^a, MAGDA HOŘEJŠÍ^a, RENATA ŠTOURAČOVÁ^a, GRAHAM BENTLEY^a, and JURAJ SEDLÁČEK^a

^aDepartment of Gene Manipulation, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, 166 37 Prague, Czech Republic, ^bESRF, BP220, F-38043 Grenoble, France, ^cUnité d'Immunologie Structurale, Department d'Immunologie, Institut Pasteur, 75724 Paris, France

The HIV protease (HIV PR) is a homodimeric enzyme belonging to the family of aspartic proteases. This enzyme plays an essential role in the life cycle of HIV, namely in proper virion assembly and maturation. Thus, HIV PR is one of the most attractive targets for design of specific inhibitors. Some substrate-based inhibitors of HIV PR are currently in use as therapeutic agents against AIDS but problem in development of drug resistance caused by point mutations in HIV PR is usually encountered after several months of treatment. Novel and alternative, non-active-site, inhibitors of HIV PR are thus necessary.

With the aim to design potent inhibitors directed to functionally important parts of the enzyme other than the active site, we have raised monoclonal antibodies (mAbs) against HIV-1 PR and selected those with inhibitory effect on the catalytic activity.

We have previously described mAb F11.2.32 with inhibition capacity towards HIV-1 PR. The crystal structure analysis of the Fab fragment in complex with epitope peptide (residues 36–46) allowed to propose a plausible inhibition mechanism¹.

Another mAb, designated 1696, although raised against HIV-1 PR, inhibits the catalytic activity of both the HIV-1 and HIV-2 PRs; the epitope recognised is the N-terminus of each subunit (residues 1–8). Functional characterisation, including three-dimensional structure of its derived Fab fragment has recently been described². The antibody seems to

inhibit activity of HIV PR by destabilising the dimeric form required for the enzymatic activity.

In the present work we report a 3D structure of a complex of recombinant single-chain fragment (scFv) of 1696 antibody with its epitope peptide PQITLWKRR (corresponding to the N-terminus of HIV-1 PR). The construction of scFv, its expression in *E. coli*, isolation and purification were reported elsewhere³.

Diffraction data from a needle-shaped crystal of the complex grown by hanging drop method were obtained on the ID14 EH1 Beamline at the ESRF (Grenoble, France). The space group is $P2_1$ (monoclinic) with unit cell dimensions $a = 45.5 \text{ \AA}$, $b = 57.1 \text{ \AA}$, $c = 91.0 \text{ \AA}$, $\beta = 97.1^\circ$ with two molecules per asymmetric unit. Overall completeness of processed data was 96.7 % between 30.0 to 2.7 Å resolution, overall R_{merge} 10.5 % (40.4 % within the last resolution shell).

The initial model for scFv1696 was obtained by molecular replacement using variable domain of Fab1696 (PDB code 1CL7, Ref.²) as the search model. Initial rigid body refinement of the two molecules in asymmetric unit yielded a model with $R = 33.9 \%$ for 11,202 reflections in the measured resolution range. The refined model gave an $R = 22.9 \%$ ($R_{\text{free}} = 27.6 \%$); the structure refinement is still in progress. Seven N-terminal residues of the bound epitope peptide have been built into a well-defined electron density in both molecules in asymmetric unit, weak electron density for residues Arg-P8 and Arg-P9 is observed probably due to their high mobility in the structure.

Comparison of this partly refined model with the structure of unliganded Fab1696 shows that hypervariable loop CDR H3 undergoes significant structural changes upon binding of the peptide into the antibody binding site (Fig. 1). At this stage of refinement peptide residues Pro-P1, Gln-P2 and Trp-P6 can be traced as bound most deeply within the cavity of binding site and are recognised as probably being essential for the antibody recognition and binding.

To confirm this and to determine the structural basis of inhibitory effects and observed cross-reactivity of mAb1696 to HIV-1 and HIV-2 PRs, refinement of the present structure is to be continued. Further structural work, aimed at determining structures of complexes of scFv1696 with the HIV-2 PR N-terminal peptide as well as with the whole molecule of both types of HIV protease is also planned in connection with antibody-structure-based design of a new HIV PR non-active-site inhibitors.

This work was supported by grant 203/98/K023 of the Grant Agency of the Czech Republic.

REFERENCES

1. Lescar J., Štouračová R., Riottot M. M., Chitarra V., Brynda J., Fábry M., Hořejší M., Sedláček J., Bentley G. A.: *J. Mol. Biol.* 267,1207 (1997).
2. Lescar J., Brynda J., Řezáčová P., Štouračová R., Riottot M. M., Chitarra V., Fábry M., Hořejší M., Sedláček J., Bentley G. A.: *Protein Sci.* 8, 2686 (1999).
3. Řezáčová P., Brynda J., Fábry M., Hořejší M., Štouračová R., Sedláček J.: *Mater. Struct.* 6, 77 (1999).

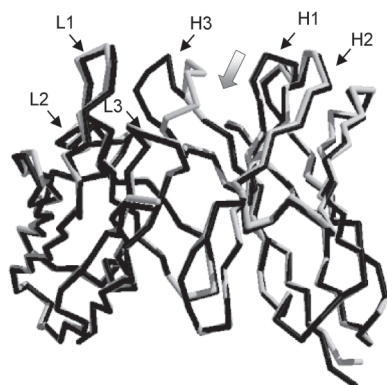


Fig. 1. Comparison between the structure of unliganded variable domains of Fab1696 (gray) and the structure of scFv1696 in complex with epitope peptide PQITLWKRR (black). Hypervariable regions (CDRs) are marked, the large arrow shows where the peptide is bound

X-RAY STRUCTURE ANALYSIS OF AN MUTANT OF HUMAN γ -D-CRYSTALLIN: A UNIQUE CATARACT PHENOTYPE EXPLAINED BY PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY

JIŘÍ BRYNDA^a, STANISLAV KMOCH^b, BEFEKADU AWSAV^b, KAREL BEZOUŠKA^c, PETR NOVÁK^d, PAVLÍNA ŘEZÁČOVÁ^a, LENKA ONDROVÁ^b, MARTIN FILIPEČ^e, MILAN ELLEDER^b, and JURAJ SEDLÁČEK^a

^aDepartment of Gene Manipulation, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, ^bInstitute of Inherited Metabolic Diseases, 1st Faculty of Medicine and University Hospital, ^cDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, ^dInstitute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, ^eOphthalmologic Clinic, Charles University, 1st Faculty of Medicine and University Hospital, Prague, Czech Republic

We describe a 5-year old boy with unique congenital cataract caused by deposition of numerous birefringent, pleiochroic, macroscopically prismatic crystals. Crystal analysis with subsequent automatic Edman degradation and MALDI-TOF mass spectrometry have identified the crystal-forming protein as γ -D-crystallin (CRYGD) lacking the N-terminal methionine. Sequencing of the CRYGD gene has shown a heterozygous C→A transversion in the position 109 of the inferred cDNA (36R→S of the processed, N-terminal methionine lacking CRYGD). The lens protein crystals were X-ray diffracting up to 2.25 Å. We solved the structure of human R36S mutated CRYGD by molecular replacement using the known structure of bovine CRYGD (Ref.¹) as search model. The unit cell dimensions at 100° K were a = 54.24 Å, b = 81.98 Å, c = 105.54 Å; the space group was P2₁2₁2₁ with two molecules of CRYGD per asymmetric unit (termed A and B). The structure is presently refined to R/R_{free} 26.5%/29.5%. The model lacks the C-terminal amino acids 172 and 173, where the electron density is poor. "Omit" density maps clearly indicate the presence of serine side-chains in both molecules at amino positions 36, and make it obvious that the bulky arginine side-chains cannot be accommodated there in any rotamer position. While the protein fold of the mutated human CRYGD is almost identical to that of bovine CRYGD, the respective molecular contacts differ substantially. In crystals of bovine CRYGD (Ref.¹) the side chains of arginine 36 do not point towards neighbouring protein molecules. The structure determined for R36S human CRYGD shows that the Ser-36 side chain of molecule A interacts with Asn-24 of molecule B, and the Ser-36 side chain of molecule B points to Asn-24 of the symmetry related molecule A' (SerOγ to AspNδ distances being 3.0 Å and 2.7 Å, respectively). It is believed that many structural features determine the relative orientation of molecules in crystal lattices, the distribution of the surface charges being prominent among them. The absence of the Arg-36 charge could be seen as the factor promoting the resultant orientation of the molecules and, in turn, the crystal formation (and pathogenesis). At least, with all caveats of the complicated theory of mechanisms and kinetics of crystal formation, the missing charge can be seen as the feature that decreases the solubility of the R36S mutated protein. Protein

crystallography, however, gives also the most solid and clear-cut clue to the pathogenic crystal formation: the crystals cannot form with wild-type protein (either as the major, or as an admixed component) because of steric hindrances imposed by the bulky arginine 36 side chains. It is tempting to extend such line of reasoning also for comprehension of the dominance of the mutant allele. Then, in qualitative terms, the steric hindrance could prevent the protein product of the normal allele from bringing sufficient perturbations into the formation of crystals of the pathogenic product. This is the first described case of human cataract caused by crystallisation of a protein in the lens. It involves the third known mutation in the CRYGD gene but offers for the first time a causative explanation of the phenotype.

This work was supported by grant No. 203/98/K023 of the Grant Agency of the Czech Republic.

REFERENCES

1. Chirgadze Y. N., Tabolina O. Yu.: Protein Eng. 9, 745 (1996).

EXPERIMENTAL NEUROPATHY PRODUCES ALTERNATIONS OF NITRIC OXIDE SYNTHASE IN THE SPINAL CORD

DASA CIZKOVA^a, MILAN CIZEK^b, and JOZEF MARSALA^a

^aInstitute of Neurobiology, Šoltésovej 6, Košice, ^bUniversity of Veterinary Medicine, Komenského 73, Košice, Slovak Republic

Introduction

Nitric oxide (NO) is a free radical gas that acts as a major messenger molecule regulating immune functions, blood vessel dilatation and serving as a neurotransmitter. Recent studies suggest a functional role for nitric oxide (NO) in the modulation of thermal/inflammatory hyperalgesia¹. Peripheral nerve injury may produce an increased excitability of spinal cord neurons (central sensitization) through activation of nociceptive afferents, leading to activation of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors² and subsequent production of spinal NO, which in turn enhances the release of excitatory amino acids. This can cause hyperactivity of spinal cord neurons as manifested by exaggerated responses to innocuous stimuli (allodynia), an abnormal sensation state referred to as neuropathic pain. To examine the possible role of NO in central sensitization, we mapped neuronal NO synthase (nNOS) expression in the spinal cord of rats with tactile allodynia due to a chronic constriction injury (CCI).

Material and methods

Male adult Wistar rats (n = 6; 300 g body weight) were used in present study. Peripheral neuropathy was induced under halothane anaesthesia (0.8 %) in a 1:1 mixture O₂ and N₂O. The common sciatic nerve was exposed and loosely tied with 4 ligatures with about 1mm spacing (4.0 chromic gut)³.

Mechanical sensitivity was measured as the 50 % response threshold (grams) using von Frey filaments. Two weeks post surgery rats were perfused intracardially with saline followed by 4 % paraformaldehyde, frozen transverse sections of lumbar spinal cord segments (L4–L5) were processed for nNOS immunocytochemistry and quantitative analyses. Free-floating tissue sections were incubated with monoclonal antibodies against rat brain nitric oxide synthase (1:1000 dilution, Sigma) followed by ABC Vector staining procedure. In parallel control sections, the primary antibody was omitted from the staining procedure and there was no detectable positive staining.

The number of nNOS-IR positive cells in contralateral and ipsilateral dorsal horn sides (L4–L5 spinal cord segments) was counted under a light microscope. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's t-test, $p < 0.05$.

Results and discussion

All rats displayed mechanical allodynia (threshold < 2.8 – 3 grams) on the ipsilateral side from 4–14 days after nerve injury. The allodynia peaked at day 6 and lasted for at least 2 weeks. The hind paw withdrawal threshold (PWT) on the contralateral-nonligated side was significantly higher PWT > 14 gm. All experimental animals tend to reveal a characteristic positioning (ventroflexed toes) of the ligated paw.

The number of nNOS positive neurons in ipsilateral side of dorsal horn (laminae I–II) was reduced (23.2 %). Total number of nNOS-IR neurons in spinal cord segments L4–L5

contralateral: 24.6 ± 3.75 , ipsilateral: 18.4 ± 3.5 . However, the density of the ipsilateral nNOS positive nerve fibers located in the dorsal horn was following ligation slightly increased.

This experimental study shows, that chronic constriction injury was associated with alterations in mechanical nociceptive processing. Unilateral sciatic nerve ligation leads to pain syndrome manifested by tactile allodynia (PWT < 3 gm). Thus, pathways controlling neuropathic pain states are functional and activated in these nerve-ligated animals.

The immunocytochemical procedure revealed ipsilateral down-regulation of local nNOS positive neurons in the superficial laminae I–II of the spinal cord segments L4–L5. However, the down-regulation of spinal nNOS positive neurons is in contrast with a higher density of nNOS-immunoreactive fibers seen in outer as well as inner lamina II. Therefore, only an increased transport of enzyme through the central branches of sensitive neurons into the afferent nerve endings in the superficial dorsal horn might suggest a potential role of supraspinal and spinal nNOS in a mediating nociceptive transmission in chronic pain model.

This experimental work was supported by the VEGA Grant No. 2/ 7222/ 2000.

REFERENCES

1. Lukacova N., Pavel J.: *Physiol. Res.* 49, 167 (2000).
2. Orendacova J.: *Biológia, Bratislava* 54, 81 (1999).
3. Bennett G. J, Xie Y. K.: *Pain* 33, 87 (1988).

OBSAH

ÚVODNÍK	1
REFERÁTY	
Odhad tepelných kapacit binárních oxidů v pevném stavu J. Leitner, P. Chuchvalec a D. Sedmidubský	2
Konformační flexibilita cyklosporinů B. Kratochvíl, M. Hušák a A. Jegorov	9
Súbory mikroelektrod s interagujícími difúzními vrstvami: speciální aplikace P. Tomčík, D. Bustin a I. Novotný	18
Morfolin-2,5-diony – jejich příprava a využití J. Vinšová	22
Výroba technicky důležitých dikarboxylových kyselín H. Miková, M. Rosenberg a L. Křištofiková	28
NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE	
Doporučení IUPAC Definitions Relating to Stereochemically Asymmetric Polymerizations (J. Kahovec)	34
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Jednoduchá metoda pro stanovení relativních rychlostí růstu jednotlivých ploch krystalu J. Nývlt	35
Studium vyluhovatelnosti anorganických sloučenin síry z popílků pomocí pH-statického vyluhovacího testu P. Janoš a M. Wildnerová	38
RECENZE	41
DISKUSE	44

CONTENTS

EDITORIAL	1
REVIEW ARTICLES	
Estimation of Heat Capacities of Binary Oxides in the Solid State J. Leitner, P. Chuchvalec, and D. Sedmidubský	2
Conformational Flexibility of Cyclosporins B. Kratochvíl, M. Hušák, and A. Jegorov	9
Microelectrode Arrays with Interacting Diffusion Layers: Special Applications P. Tomčík, D. Bustin, and I. Novotný	18
Morpholine-2,5-diones – Their Preparation and Exploitation J. Vinšová	22
Production of Dicarboxylic Acids Important for Technology H. Miková, M. Rosenberg, and L. Křištofiková	28
NOMENCLATURE AND TERMINOLOGY	
IUPAC Recommendations Definitions Relating to Stereochemically Asymmetric Polymerizations (J. Kahovec)	34
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
A Simple Method for Determination of Relative Growth Rates of Individual Crystal Faces J. Nývlt	35
Study of Extractability of Inorganic Sulfur Compounds Using a pH-stat Leaching Test P. Janoš and M. Wildnerová	38
BOOK REVIEWS	41
DISCUSSION	44

Buletinový úvodník na cestu do nového tisíciletí	51	Editorial on the Entry Point of the New Millennium	51
Nobelova cena v medicíně v roce 1947 – manželé Coriovi – objasnění průběhu katalytické konverze glykogenu	52	Nobel Prize for Medical Research in 1947 – Mrs. and Mr. Cori – Elucidation of the Catalytic conversion of Glycogen	52
Centrum analytické chemie molekulární struktury Univerzity Palackého v Olomouci – Jak dál?	53	Centre for Analytical Chemistry of Molecular Structures of Palacký University in Olomouc – How further?	53
Ze života chemických společností	54	From the Chemical Societies	54
Členská oznámení a služby	56	Member Services and Announcements	56
Chemik na cestách	56	Traveling Chemist	56
Z vědeckých, odborných a zahraničních společností	57	From the Learned, Professional and Foreign Societies	57
Evropský koutek	58	European Column	58
Výuka chemie	59	Chemistry Teaching	59
Osobní zprávy	60	Personal News	60
Střípky a klípky o světových chemících	63	Biographical Sketches of World Chemists	63
Technické zajímavosti a služby	64	Technical Information, Tips and Services	64
Zákony, které ovlivňují život chemiků	66	Laws that Could Influence Life of Chemists	66
Knihy a literatura	67	Books and Literature	67
Poezie	68	Poetry	68
Zajímavosti ze světa vědy a techniky	69	News from Science and Technology	69
Aprílový klub	69	Club of Jokes	69
Odborná setkání	70	Meetings and Conferences	70
Akce v ČR a v zahraničí	71	Meetings Calendar	71
Buletin představuje	74	Bulletin Presents	74
Volná místa	77	Jobs	77
Noví členové ČSCH	77	New Members of CCS	77
Výročí a jubilea	78	Anniversaries and Jubilees	78

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