

# **Příprava 1-monoacylglycerolu z kyseliny perfluoroundekanové a testování antimikrobní aktivity**

Bc. Zdenka Němcová

---

Diplomová práce  
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2009/2010

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zdenka NĚMCOVÁ**  
Osobní číslo: **T08832**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky**

Téma práce: **Příprava 1-monoacylglycerolu z kyseliny perfluoroundekanové a testování antimikrobní aktivity**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

- Provedte literární rešerži v oblasti fluorovaných a perfluorovaných derivátů, zaměřte se na jejich přípravu a praktické aplikace.
- Literární údaje kriticky zhodnoťte a navrhněte závěry, které se stanou východiskem pro experimentální část.

### II. Praktická část

- V experimentální části připravte 1-monoacylglycerol vybrané perfluorované karboxylové kyseliny, optimalizujte podmínky přípravy, proveďte základní charakterizaci produktu na TLC, HPLC a otestujte na antimikrobní aktivitu u vybraných mikroorganismů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] POKORNÝ, J., et al. *Technologie tuků*, Praha: SNTL, 1986.

[2] KROG, N., GUNSTONE, F. D., PADLEY, F. B. *Food Emulsifiers in Lipid Technologies and Applications*, New York: Marcel Dekker Inc., 1997.

[3] WHITEHURST, R. J. *Emulsifiers in food technology*, Northampton: Blackwell Publishing, 2004, ISBN 1-4051-1802-4.

[4] LIN, J. T., MCKEON, T. A. *HPLC of Acyl Lipids*, New York: HNB Publishing, 2005, ISBN 0-9728061-1-3.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

**22. února 2010**

Termín odevzdání diplomové práce:

**14. května 2010**

Ve Zlíně dne 22. února 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na přípravu 1-monoacylglycerolu z perfluoroundekanové kyseliny. 1-monoacylglycerol byl připraven adicí kyseliny na glycidol nukleofilním otevřením epoxidového kruhu za přítomnosti chromitého katalyzátoru. Po rekrystalizaci z ethanolu bylo dosaženo 90% konverze. K analytické charakterizaci byly použity metody TLC a HPLC. Dále je práce zaměřena na testování vyrobeného produktu na antimikrobní aktivitu vůči vybraným druhům bakterií a plísní. U všech grampozitivních bakterií byl prokázán inhibiční účinek především u koncentrací 1000 µg/ml a 1500 µg/ml. Nejvíce 1-monoacylglycerol kyseliny perfluoroundekanové působil na *Bacillus subtilis*. U gramnegativních bakterií nebyl inhibiční účinek prokázán. U plísní byl zaznamenán se zvyšující se koncentrací snižující se index růstu u všech druhů testovaných plísní. U *Alternaria alternata* a *Penicillium roquerforti* nebyl při nejvyšší koncentraci 1500 µg/ml zaznamenán růst ani po 12 dnech testování.

Klíčová slova: perfluorované deriváty, 1-monoacylglycerol, antimikrobní aktivita, TLC, HPLC

## ABSTRACT

This work is focused on preparation of 1-monoacylglycerol from perfluoroundecanoic acid. 1-monoacylglycerol was prepared by the addition of the acid to glycidol by nucleophilic epoxide ring opening catalyzed by  $\text{Cr}^{3+}$  catalyst. After recrystallization from ethanol 90 % conversion was achieved. Reaction products were characterized by TLC and HPLC. Further the work is focused on testing prepared products on anti-microbial activity against selected species of bacteria and fungi. Activity of MAG was pronounced especially against Gram-positive bacteria with *Bacillus subtilis* as the most sensitive bacteria. The highest concentration tested (1000 µg/ml and 1500 µg/ml) caused a complete inhibition of all Gram-positive species. On the contrary, Gram-negative bacteria were found to be resistant to perfluorinated MAG. It was recorded that with increasing concentration of 1-monoacylglycerol the growth index of all tested filamentous fungi decreased. There was no growth of *Alternaria alternata* and *Penicillium roquerforti* recorded at the highest concentration of MAG (1500 µg/ml) not even after 12 day of testing.

Keywords: perfluorinated derivatives, 1-monoacylglycerol, anti-microbial activity, TLC, HPLC

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chci poděkovat vedoucímu diplomové práce Ing. Rahulovi Janišovi, CSc. a Mgr. Ivě Doležálkové za odborné vedení, cenné připomínky a trvalý zájem, který věnovali mé práci. Dále bych chtěla poděkovat paní Evě Svobodové za rady a pomoc v laboratoři a pracovníkům Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky a Ústavu technologie a mikrobiologie potravin za poskytnutou pomoc.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>1 FLUOROVANÉ A PERFLUOROVANÉ DERIVÁTY .....</b>	<b>11</b>
1.1 VLASTNOSTI.....	11
1.2 VYUŽITÍ V PRŮMYSLU.....	11
1.2.1 Ochrana textilií, koberců a kůže.....	12
1.2.2 Ochrana papíru a obalových materiálů.....	12
1.2.3 Hasicí pěny .....	12
1.2.4 Průmyslové a domácí čisticí prostředky.....	12
1.3 VYUŽITÍ V MEDICÍNĚ.....	13
1.3.1 Perfluorované kyslíkové přenašeče .....	13
1.3.2 Fluorované léky .....	14
1.4 TOXICITA.....	17
1.5 VÝROBA .....	17
1.5.1 Elektrochemická fluorinace.....	18
1.5.1.1 Simonsův proces.....	18
1.5.1.2 Phillips-petroleum proces.....	18
1.5.2 Telomerace .....	19
<b>2 MONOACYGLYCEROLY.....</b>	<b>20</b>
2.1 CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI.....	21
2.2 PŘÍPRAVA MONOACYLGLYCEROLŮ.....	22
2.2.1 Adice mastných kyselin na glycidol .....	23
2.3 VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ.....	24
2.4 METODY STANOVENÍ.....	24
2.4.1 Chromatografické metody .....	24
2.4.2 Tenkovrstvá chromatografie.....	25
2.4.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	25
<b>3 MIKROORGANISMY .....</b>	<b>28</b>
3.1 DOMÉNA BACTERIA.....	28
3.1.1 Stavba .....	28
3.1.2 Rozdělení.....	28
3.1.3 Grampozitivní bakterie použité v praktické části.....	28
3.1.4 Gramnegativní bakterie použité v praktické části .....	29
3.1.5 Růstová křivka bakteriální populace .....	30
3.2 ŘÍŠE HOUBY FUNGI.....	32
3.2.1 Stavba .....	32
3.2.2 Vlastnosti.....	33
3.2.3 Plísně použité v praktické části .....	33
<b>4 ZHODNOCENÍ TEORETICKÉ ČÁSTI .....</b>	<b>35</b>



<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>36</b>
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	37
4.2	POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY .....	38
4.3	POUŽITÉ METODIKY .....	39
4.3.1	Stanovení bodu tání kyseliny perfluoroundekanové.....	39
4.3.2	Výroba 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové.....	39
4.3.3	Stanovení konverze reakce .....	40
4.3.4	Příprava 0,1M ethanolického roztoku hydroxidu draselného.....	40
4.3.5	Stanovení přesné koncentrace ethanolického roztoku hydroxidu draselného.....	40
4.3.6	Purifikace 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové .....	41
4.3.7	Tenkovrstvá chromatografie.....	41
4.3.8	Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC .....	42
4.3.9	Antimikrobní aktivita .....	42
4.3.10	Antimikrobní účinky 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové v bujónu .....	42
4.3.11	Antimikrobní účinky 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové na pevné půdě.....	43
4.4	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	45
4.4.1	Stanovení bodu tání kyseliny perfluoroundekanové.....	45
4.4.2	Výroba 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové.....	45
4.4.3	Analýza 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové pomocí TLC.....	46
4.4.4	Analýza 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové pomocí HPLC.....	47
4.4.5	Antimikrobní účinky 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové v bujónu .....	49
4.4.6	Antimikrobní účinky 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové na pevné půdě.....	53
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>57</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>66</b>

## ÚVOD

Fluorované a perfluorované deriváty jsou využívány v řadě průmyslových odvětví. Perfluorované deriváty naznačují díky své stabilitě, odolnosti a schopnosti vázat kyslík potenciální využití jako krevní náhražky. Fluorované léky jsou využívány v léčbě centrální nervové soustavy jako antidepresiva, testovány byly také v léčbě metabolických a kardiovaskulárních chorob. Fluorované léky mají výrazné antimikrobní účinky. Antimikrobní účinky byly zjištěny také u 1-monoacylglycerolů, jejichž výzkumem se zabývá naše fakulta. 1-monoacylglyceroly se používají ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče léčiv nebo vitamínů, v potravinářském průmyslu zejména jako emulgátory. Nejnovější metoda výroby 1-monoacylglycerolů je adice mastných kyselin na glycidol pomocí otevření epoxidového kruhu a následná nukleofilní adice mastné kyseliny na glycidol, tento postup byl použit v praktické části. Protože 1-monoacylglyceroly i perfluorované deriváty mají antimikrobní účinky, dá se očekávat prohloubení antimikrobní aktivity u vyrobeného produktu 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové (MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>). Tato práce tedy řeší přípravu 1-monoacylglycerolu z kyseliny perfluoroundekanové a testování antimikrobní aktivity. Rovněž je provedena chromatografická charakterizace pomocí tenkovrstvé (TLC) a kapalinové vysokoúčinné chromatografie (HPLC).

## I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1 FLUOROVANÉ A PERFLUOROVANÉ DERIVÁTY

Perfluorované deriváty je společný název pro skupinu syntetických fluorovaných látek, včetně jejich oligomerů a polymerů. Tato skupina zahrnuje několik set sloučenin rozdělených do 23 kategorií. Jsou pro ně charakteristické plně fluorované hydrofobní lineární uhlíkaté řetězce připojené k různým hydrofilním hlavám. Perfluorované deriváty jsou produkovány od 50 let minulého století a jsou používány v mnoha průmyslových odvětvích a aplikacích. [1,2]

### 1.1 Vlastnosti

Perfluorované deriváty mají speciální fyzikální a chemické vlastnosti. Jsou vysoce tepelně a chemicky stabilní, snižují povrchové napětí. Odpuzují jak vodu, tak i olej, jedná se tedy o látky hydrofobní i hydrofilní povahy. Vazba C-F je silná a velmi odolná. Tato odolnost poskytuje perfluorovaným derivátům výjimečnou stabilitu. Pokud však molekula perfluorovaného derivátu podlehe transformaci, netýká se to části perfluorovaného řetězce, ale zasáhne to především hydrofilní části molekuly. [1,2]

### 1.2 Využití v průmyslu

Tyto látky našly využití [2]:

- při ošetření povrchu koberců, tkanin, kůže, papíru,
- při výrobě nátěrů a aditiv do nátěrových hmot,
- při výrobě čisticích prostředků pro domácí i průmyslové použití,
- při výrobě pesticidů a insekticidů,
- jako aditiva do hasicích pěn a do hydraulických tekutin,
- ve fotografickém průmyslu,
- při výrobě pokovovaných předmětů,
- při výrobě polovodičů,
- ve fotalitografii.

### 1.2.1 Ochrana textilií, koberců a kůže

Perfluorované deriváty a jim příbuzné látky byly vyráběny na ochranu textilií, oděvů, nábytku, čalounění, koberců a výrobků z kůže proti znečištění. Používají se pro výrobu nehořlavého oblečení a také těsnění. [3] Byly používány proto, že jsou schopné modifikovat vlastnosti povrchů těchto materiálů a poskytovat jim tak odolnost proti vodě a špíně.

Tento mechanismus působení je založen na tom, že při ošetření povrchu perfluorovanými látkami se řetězec orientuje směrem ven z povrchu, čímž snižuje povrchové napětí, a vytváří tak ochrannou bariéru.[2]

### 1.2.2 Ochrana papíru a obalových materiálů

Perfluorované deriváty byly používány v obalovém a papírenském průmyslu, protože propůjčovaly těmto materiálům odolnost proti vodě a látkám lipidické povahy. Aplikovány byly jak při ošetření potravinářských materiálů jako jsou talíře, krabice, tašky a obaly na potraviny, tak i u nepotravinářských obalů jako jsou kartony, krabice a papíry na výrobu masek. [2]

### 1.2.3 Hasicí pěny

Voda je stále velmi účinnou látkou používanou při hašení většiny požárů. Nicméně pokud hoří hořlavé tekutiny (třída B), má voda tendenci díky své hustotě klesnout pod hořící tekutinu, což způsobuje, že má na hašení takových typů požárů jen malý účinek. Z tohoto důvodu byly pro hašení hořlavých tekutin vyvinuty hasicí pěny, které jsou velmi důležité a užitečné pro boj s těmito typy požárů. Hasicí pěny vznikají při hašení z pěnového koncentrátu (v této formě jsou v hasicích přístrojích skladovány). Vzniklá pěna tvoří povlak o nízké hustotě, který má schopnost uhasit požár vzniklý hořením hořlavých tekutin.[2]

### 1.2.4 Průmyslové a domácí čisticí prostředky

Polyfluoroalkylované amfifilní částice jsou speciální třída surfaktantů skládající se z hydrofilní části a z hydrofobního fluorizovaného řetězce. Tyto sloučeniny projevují pozoruhodné povrchové vlastnosti, což je předurčuje v použití v biomedicínské sféře jako speciální čisticí detergenty. Využívají se především na čištění protéz.

Perfluorované deriváty byly v minulosti přidávány jako povrchově aktivní látky do řady čisticích prostředků, např. zásaditých čisticích prostředků, leštících přípravků na podlahu a šampónů. [2,4]

## 1.3 Využití v medicíně

### 1.3.1 Perfluorované kyslíkové přenašeče

Byly zkoumány fluorizované polymery založené na polyaspartamidu s polyethylenglykolovými řetězci. Spektroskopické stanovení kyslíkové rozpustnosti ve vodném prostředí ukázalo jejich schopnost udržet vysokou kyslíkovou hladinu v roztocích. Biokompatibilita těchto fluoropolymerů byla stanovena pomocí zkoušek in vitro na lidských buňkách a lidských červených krvinkách. Výzkum naznačuje potenciální použití těchto fluoropolymerů jako umělých přenašečů kyslíku.[5]

Polymerizovaný hemoglobin, má velmi podobné vlastnosti červeným krvinkám, ale je pořád velmi problematické ho vyrobit v netoxické formě. Má výhodu, že může pojmout plnou kyslíkovou kapacitu, jako jsou toho schopny plíce. Na druhou stranu má krátkou životnost v nitrožilním oběhu. Perfluorouhlíkaté emulze nejsou schopny ještě udržet tolik kyslíku jako hemoglobin, ale potřebují být vystaveny ovzduší s velmi vysokou koncentrací kyslíku. Tyto perfluorované látky jsou schopny selektivně oksyličovat nádory a resorbovat inertní plyny mnohem lépe než dokáže krev.[6]

Perfluorované estradiolové deriváty byly testovány na nádorovou biodistribuci a adsorpci in vivo. Testy vědci prováděli na myších, které měly nádory. Prokázána byla absorpce nádory prsními a děložními. [7]

Perfluorouhlíkaté látky snižují tvorbu volných kyslíkových radikálů a poškození plic při tzv. tekuté ventilaci. Mohou být využity i při syndromech náhlého respiračního selhání dospělých a dětí a dalších akutních respiračních syndromů. Také dochází ke zlepšení výsledků u částečné kapalinové ventilace.

K obecným výhodám krevních náhražek patří možnost sterilizace proti virovým a bakteriálním kontaminantům, možnost uchovávání při pokojové teplotě a výhodou je absence antigenů krvinek.[8]

Jejich výhodou je, že některé nemají krevní destičky a bílé krvinky a jsou schopny napodobovat krvinky červené. [6]

Tým vědců Dafik, d'Alarcao a Kumar [9] se zabýval vytvořením buněčného povrchu s fluorovanými polysacharidy. Zjistili, že fluorizované povrchy savčích buněk poskytují prostředky pro další modulaci nekovalentními interakcemi a změnu vlastností buněk.

Můžeme tedy předpokládat, že perfluorované krevní náhrady budou dále klinicky testovány a následně přizpůsobeny na několik specifických použití. [6]

### 1.3.2 Fluorované léky

Další významnou skupinou byly fluorované léky. Sloučenina měla obvykle navázanou jednu molekulu fluoru. Fluor má velkou elektronegativitu, při malém atomárním objemu (atom fluoru je malý). Výzkumy bylo zjištěno, že látky s fluorem mají zvýšenou metabolickou stabilitu a řadu pozitivních efektů, které se dají využít v léčbě různých onemocnění. [10]

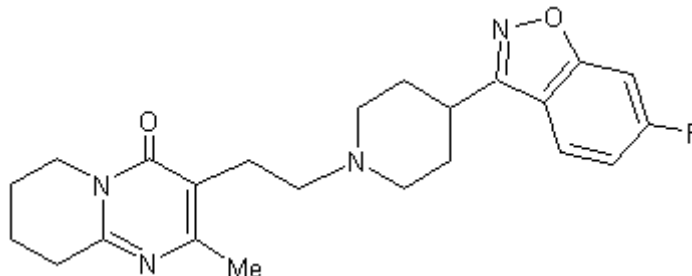
Fluorované léky našly využití v léčbě centrální nervové soustavy jako antidepresiva. Do první generace fluorovaných antipsychotik patřil:

- Spiroperidol
- Haloperidol

Druhé generaci se říká atypická antipsychotika a patří sem:

- Risperidon (obr.1)
- Fluoxetin

Tyto látky účinkují jako SSRI (selective serotonin reuptake inhibitors = selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu). [10]



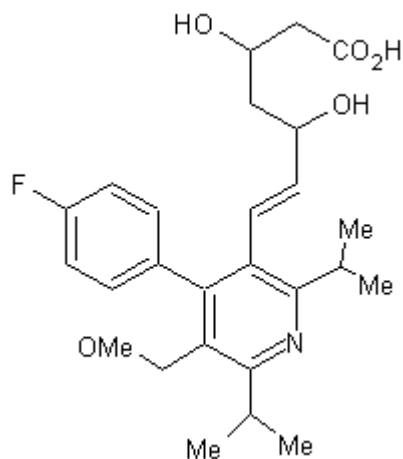
Obr.1 Risperidon

Fluorované léky byly testovány také v léčbě metabolických nemocí a kardiovaskulárních chorob. Pro léčbu diabetu byly testovány inhibitory dipeptidyl peptidasy IV. Inhibitor je založen na triazolopiperazinu DPP-IV. Tento fluorovaný inhibitor má vynikající selektivitu, což naznačuje slibnou budoucnost v případě dalšího případného využití.

V léčbě hypercholesterémie byly zkoumány z fluorovaných léků:

- Lipitor
- Cerivastatin (obr.2)
- Pitavastatin
- Rosuvastin

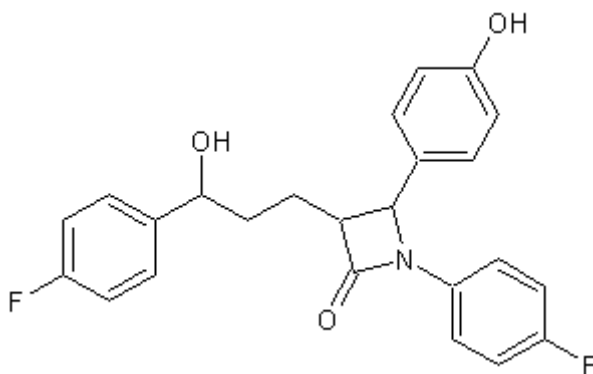
Jsou to potenciální inhibitory HMG-CoA reductázy. Tyto inhibitory představují limitující krok v biosyntéze cholesterolu v játrech. V současné době jsou široce používány jako léky pro kontrolu hypercholesterémie. [10]



Obr.2 Cerivastatin

Inhibitory zpětného vstřebávání cholesterolu:

- Ezetimib (obr.3) – blokuje intestinální cholesterolový transport. V klinické praxi je ezetimib v terapii určen pacientům, u kterých je žádoucí mírné snížení LDL-cholesterolu nebo u nichž jsou kontraindikována hypolipidemika jiných skupin. [10, 11]



Obr.3 Ezetimib

Fluorovaná antikoagulancia:

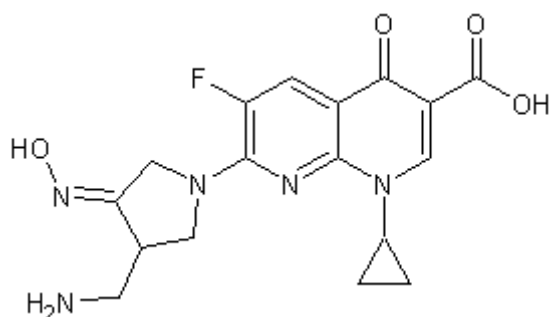
- inhibitory faktoru Xa – klinický kandidát DPC4223 – zjištěna byla malá aktivita po orálním užití. Klinický kandidát rasaxaban je zatím ve 2 fázích klinických testů.

Do fluorizovaných antibakteriálních léčiv patří fluorochinolony. Fluorochinolony lze charakterizovat jako baktericidní přípravky se širokým antimikrobním spektrem účinků, vysokou biologickou do-



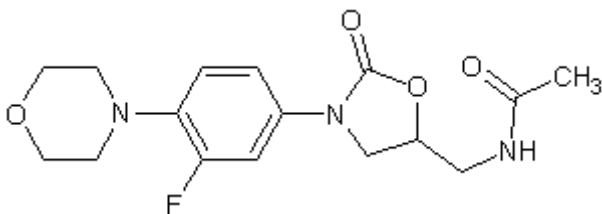
stupností perorálních forem, dlouhým biologickým poločasem rozpadu a dobrou snášenlivostí. Pro dosud nevyjasněné působení na vyvíjející se pohybový aparát a dětí a případné další nežádoucí účinky, platí pro všechny chinolony kontraindikace použití do 18 let věku. Také nejsou doporučovány ženám v období těhotenství a kojení. Rezistence k těmto skupinám antibakteriálních léčiv vzniká ovšem velmi rychle. U některých původců infekcí byla odolnost zjištěna již v průběhu léčby. Proto jsou fluorochinolony indikovány jen v situacích, kdy jsou jiná antibiotika *in vitro* neúčinná nebo jsou nevhodná pro léčbu z důvodu toxicity či nežádoucích účinků. [12]

- Gemifloxacin (obr.4) je používán jako účinné antibiotikum, užívané při léčbě chronické bronchitidy a pneumonie.[10, 13]



Obr.4 Gemifloxacin

- Balofloxacin je poměrně novým fluorochinolonom, který vyniká zvýšenou aktivitou vůči gram pozitivním bakteriím, je účinný zejména vůči mykobakteriím (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*). [10, 14]
- Pazufloxacin a prulifloxacin našli využití při léčbě systémových infekcí respiračního a zažívacího traktu. [10, 15]
- Linezolid (obr.5) byl v roce 2000 prvním antibiotikem nové struktury, které bylo vyvinuto pro léčbu rezistentní formy tuberkulózy. [10, 16]

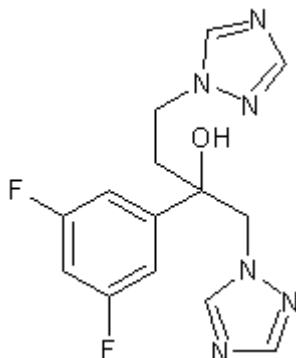


Obr.5 Linezolid

- Flurithromycin je fluorovaný analog erythromycinu, je využíván jako chemoterapeutikum. [10, 17]

Fluorizované léky proti plísním:

- Fluconazol (obr.6) je aplikován k léčbě infekcí způsobených nejčastěji houbami a kvasinkami *Candida* a meningitid způsobených kvasinkami rodu *Cryptococcus*. [10, 18]



Obr.6 Fluconazol

- Voriconazol je využíván k léčbě mykotických infekcí, způsobených bakterií *Aspergillus sp.*, kandidemií způsobených kvasinkou rodu *Candida sp.* Voriconazol se také aplikuje pokud je houba odolná proti fluconozalu. Dále je vhodný proti závažným mykotickým onemocněním způsobených *Scedosporium sp.* nebo *Fusarium sp.*. [10, 19]

## 1.4 Toxicita

Perfluorované deriváty jsou v dnešní době detekovány v přírodě tak i v člověku samotném. Protože jsou perzistentní a mají schopnost se akumulovat, začala se řešit jejich toxicita. Prováděny byly testy na hladinu perfluorovaných látek v krvi, lidském mléce a lidských tkáních. Odhadovaná expozice v dospělé populaci se pohybovala v limitních mezích. Bylo také zjištěno, že hlavním zdrojem příjmu perfluorovaných látek jsou především potraviny. [1]

Přesný mechanismus toxického účinku jednotlivých perfluorovaných sloučenin není doposud objasněn. Mezi možné škodlivé účinky může patřit vliv na transport a metabolismus mastných kyselin, na funkci membrán nebo bioenergetické procesy v mitochondriích.[2]

## 1.5 Výroba

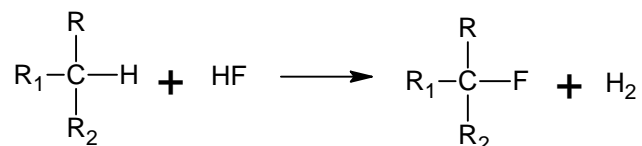
Perfluorované látky lze komerčně syntetizovat procesem známým jako elektrochemická fluorinace (EFC). EFC je neselektivní a vedle hlavního produktu, který koresponduje s použitým výchozím produktem, se objevují i jiné perfluorované homology. [1]

### 1.5.1 Elektrochemická fluorinace

Obecný přístup představuje aplikaci elektrosyntézy. Fluorované uhlíky vytvořené pomocí EFC jsou velmi užitečné, protože jsou odolné a inertní díky silné vazbě C-F. Komerčně jsou prováděny dva postupy EFC, Simonsův proces a Phillips-petroleum proces. Také je možná EFC v organických mediích. Před vývojem těchto metod byla používána fluorace fluórem. Tento proces byl však málo efektivní.[20]

#### 1.5.1.1 Simonsův proces

Probíhá jako elektrolýza organických složek v roztoku HF. Reakce je znázorněna na obrázku (obr.7).



Obr.7 Reakce Simonsova procesu

V této syntéze se vymění každý H za F. Reakce probíhá při elektrickém potenciálu 5-6 V, kde anoda je z niklu. Simons objevil tento proces v roce 1930. Výsledky nebyly publikovány až do skončení 2. světové války, protože práce poukazovala na výrobu fluoridu uranového. V roce 1949 Simons a jeho spolupracovníci publikovali svou práci v Journal of the Electrochemical Society. [21]

Při práci se objevila dvě rizika [21] :

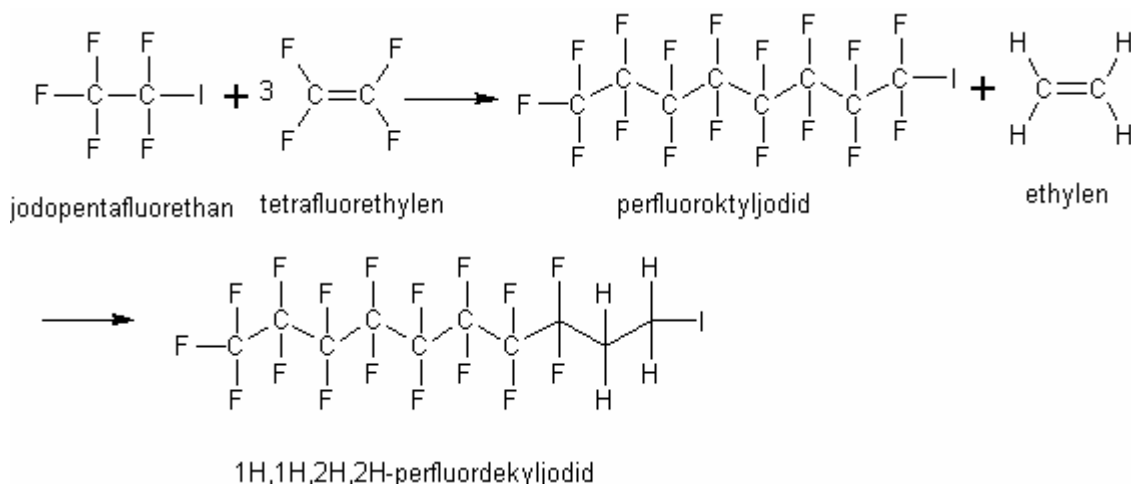
1. práce s HF
2. požadavek na bezvodé prostředí

#### 1.5.1.2 Phillips-petroleum proces

Metoda je podobná Simonsovu procesu, ale je aplikována na přípravu z těkavých uhlovodíků a chlorovaných uhlovodíků. EFC je vedena v pórovitém grafitu, který slouží také jako anoda, v rozpuštěném fluoridu draselném. Organická látka je vedena skrz pórovitou anodu, kde dochází k výměně H za F. Vzniklý hydrofluorid draselný je relativně málo rozpustný, je to dobrý elektrolyt a bohatý zdroj fluoru. Metoda je také zvaná "CAVE" = Carbon Anode Vapor Phase Electrochemical. [22]

### 1.5.2 Telomerace

Je to radikálová reakce, při které vzniká z monomeru a iniciátoru perfluorovaný produkt. Výrobní proces telomerace můžeme vidět na obrázku (obr.8).



Obr.8 Schéma telomerace

Pro produkty je charakteristická ethylenová skupina v molekule. V další fázi je podle způsobu použití jodid substituován funkční skupinou. Výsledkem tohoto výrobního procesu jsou nevětvené řetězce obsahující jen velmi málo vedlejších produktů. Produkty nejsou plně fluorované. [2]

Nejdůležitějším rozdílem mezi oběma výrobními postupy je podoba finálního produktu. Elektrochemickou fluorací mohou vznikat všechny typy perfluorovaných látek, v závislosti na výchozím materiálu a jeho čistotě. Téměř všechny produkty vyráběné telomerací mají společný meziprodukt. Tento meziprodukt tvoří perfluorovaný alkylový řetězec a na něm jsou navázané různé funkční skupiny. Dalším důležitým rozdílem je také čistota finálního produktu. Látky vyrobené telomerací obsahují velmi málo vedlejších produktů, které lze snadno od žádoucího produktu oddělit. Naproti tomu produkty vyrobené elektrochemickou fluorací obsahují až 30 % nežádoucích větvených řetězců. V neposlední řadě se produkty z obou procesů liší cenou. Telomerací se vyrábějí drahé produkty, zatímco EFC jsou relativně levné. [2]

## 2 MONOACYGLYCEROLY

Mikrobicidní vlastnosti byly zjištěny také u monoacylglycerolů (MAG), na které se v současnosti zaměřuje výzkum na naší fakultě na Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky.

Výzkum u monoacylglycerolů prokázal antimikrobní účinky. Zjištěny byly bakteriostatické nebo bakteriocidní účinky zejména u MAG kyselin s 8 až 12 uhlíky. Prokázáno bylo, že monoacylglyceroly omezovaly růst poměrně širokého množství mikroorganismů. [23-25]

Studie vlivu MAG kyseliny kaprinové na důležité rody bakterií, plísní a kvasinek zjistila minimální inhibiční koncentrace, které činí 100-200 mg/l. Při této koncentraci je MAG kyseliny kaprinové schopen úplně zastavit růst všech testovaných grampozitivních bakterií a kvasinek. Koncentrace 100-400 mg/l dokázala zastavit růst většiny testovaných plísní. Na druhou stranu, některé gramnegativní bakterie a také plíseň *Mucor ramosus* ukázaly svou rezistenci na monoacylglycerol kyseliny kaprinové. [26]

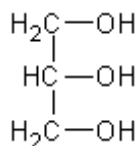
Při výzkumu antimikrobní aktivity kyseliny laurové, myristové, palmitové a jejich monoacylglycerolů proti gramnegativním bakteriím, byl zjištěn výrazný inhibiční efekt především v prvních 10 až 24 hodinách. [27]

Bergsson a kol. [28] v roce 1999 zkoumali účinky několika mastných kyselin se středně dlouhými řetězci a jejich monoacylglycerolů na původce kapavky *Neisseria gonorrhoeae*. Výrazné inhibiční účinky byly zjištěny zejména u MAG kyseliny kaprinové.

V pozdější studii se Bergsson a kol. [29] zaměřili na působení kyseliny kaprinové, laurové a jejich monoacylglycerolů na kvasinku *Candida albicans*. Přítomnost kyseliny kaprinové vedla k nejrychlejší a nejúčinnější inaktivaci všech testovaných kmenů *C. albicans*. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie bylo prokázáno narušení a desintegrace cytoplasmatické membrány způsobené přítomností mastných kyselin a monoacylglycerolů. Účinná koncentrace vedoucí k lyzi buněk byla pro kyselinu laurovou nižší, ale její působení bylo ve srovnání s kyselinou kaprinovou pomalejší.

Monoacylglyceroly patří do skupiny parciálních esterů glycerolu. Je-li na glycerol (obr.9) vázána jen jedna mastná kyselina (MK), pak vznikají 1-monoacylglyceroly, nebo 2-monoacylglyceroly. Pokud se na molekulu glycerolu naváží dvě mastné kyseliny, vznikají 1,2- nebo 1,3-diacylglyceroly, které se v přírodních tucích vyskytují ve vysokém množství. Monoacylglyceroly a diacylglyceroly jsou v

praxi označovány jako parciální estery glycerolu. Nejvíce se však v přírodě vyskytují triacylglyceroly (dříve nazývané triglyceridy), kdy na jednu molekulu glycerolu jsou esterově navázány tři mastné kyseliny. [30]



Obr.9 Glycerol

Za mastné kyseliny jsou považovány karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem obsahujícím více jak čtyři atomy uhlíku. Většinou mají sudý počet uhlíků. Mastné kyseliny se vyskytují hlavně jako estery v přírodních tucích a olejích, ale mohou být přítomné i v neesterifikované formě jako volné, kdy jsou transportní formou přítomnou v krevní plasmě.

V lipidech se vyskytují tyto skupiny mastných kyselin:

- nasycené mastné kyseliny
- nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monoenové)
- nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami (polyenové)
- mastné kyseliny s trojnými vazbami
- mastné kyseliny s acyklickým popř. cyklickým uhlíkatým řetězcem
- mastné kyseliny s polárními funkčními skupinami (kyslíkaté, dusíkaté, sirné)

[30,31]

## 2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Bod tání mastných kyselin (MK) se sudým počtem atomů uhlíku se zvyšuje s délkou řetězce a klesá s přibývajícím počtem dvojných vazeb. Většina běžných nasycených MK jsou viskózní kapaliny nebo tuhé látky.[32] Bod varu mastných kyselin roste se stoupajícím počtem uhlíků v molekule. Většinu kyselin přítomných v tucích a olejích nelze destilovat za atmosférického tlaku, protože jejich body varů jsou již tak vysoké, že dochází k jejich rozkladu. Proto je nutné pracovat za sníženého tlaku. [30]

Bod tání MK závisí na krystalické modifikaci. Nasycené MK se přeměňují na stabilní modifikaci poměrně rychle, u nenasycených MK to trvá pomaleji. Nižší MK jsou těkavé za atmosférického tlaku, vyšší MK jsou netěkavé.[33]

Rozpustnost ve vodě rychle klesá s rostoucím počtem atomů uhlíku. Vyšší MK se ve vodě rozpouštějí jen nepatrně, mohou tvořit na hladině film. [32, 34]

Monoacylglyceroly mají bod tání vyšší než jeho příslušná mastná kyselina. Monoacylglyceroly jsou rozpustné v alkoholu a nerozpustné v petroletheru. Všechny estery glycerolu se dobře rozpouštějí v chloroformu a diethyletheru, ve vodě jsou nerozpustné. [32]

Monoacylglyceroly jsou povrchově aktivní látky, mají hydrofilní a hydrofobní část. Tvoří monomolekulární nebo více molekulární film, který usnadňuje disperzi a stabilizaci. Na rozhraní fází v disperzích se molekuly orientují tak, že hydrofobní konce molekul, tvořené hlavně mastnou kyselinou, směřují do hydrofobní fáze. Hydrofilní části molekul směřují do hydrofilní fáze.

Monoacylglyceroly jsou poměrně málo polární, jejich emulgační schopnost se dá zvýšit přidáním fosfolipidů nebo bílkovin. Emulgační schopnost se pro různé účely může zlepšit, esterifikací monoacylglycerolů různými kyselinami, např. kys. mléčnou, vinnou nebo citrónovou. [34] MAG obsahující nenasycené mastné kyseliny musí být chráněny antioxidanty proti oxidačním reakcím. [34]

## 2.2 Příprava monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly byly připraveny více postupy. Metody byly popsány autory [30-35]. Patří sem:

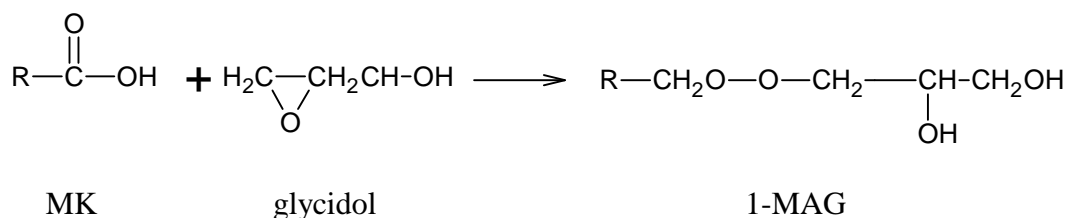
- Interesterifikace
  - Alkoholýza [32-35]
  - Acidolýza [30-34]
  - Transesterifikace [30-34]
- Esterifikace mastných kyselin s glycerolem [30]
- Hydrolýza [33]
- Adice mastných kyselin na glycidol

### 2.2.1 Adice mastných kyselin na glycidol

Jde o novější metodu výroby monoacylglycerolů pomocí otevření epoxidového kruhu a následnou nukleofilní adicí mastné kyseliny na glycidol. Schéma reakce můžeme vidět na obrázku (obr.10).

Glycidol je organická sloučenina obsahující epoxid a alkoholovou funkční skupinu. Je to čistá jemně viskózní kapalina, která má mnoho průmyslového využití. Glycidol je používán jako stabilizátor přírodních olejů a vinylových polymerů a používá se také jako deemulgátor. [36] Glycidol je iritant kůže, očí, sliznic a horních cest dýchacích. [37]

Jako účinné katalyzátory mohou působit také komplexy tranzitních kovů (chróm, zinek, kobalt), přičemž nejlepších výsledků se dosáhne použitím chromitých komplexů vyrobených tavením MK a chromitých solí při 160 °C. [38]



Obr.10 Adice mastných kyseliny na glycidol

Mezi výhody tohoto postupu patří:

- univerzálnost reakce,
- vysoká regiosektivita (výroba prostorových izomerů),
- dosažení vysokých konverzí,
- katalyzátor lze snadno připravit v bezrozpouštědlovém systému a je ho potřeba malé množství,
- nevznikají žádné vedlejší produkty,
- reakce probíhá v desítkách minut při reakční teplotě cca 90 °C.

Nevýhodou je však nutnost přečišťování vzniklého produktu od nežádoucích látek mezi něž patří katalyzátor a glycidol tak, aby obsah vyhovoval normám.[38]



## 2.3 Využití monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly mají výborné emulgační vlastnosti a proto se využívají v potravinářství, kosmetickém průmyslu, farmacii a dalších odvětvích.

V potravinářství se monoacylglyceroly se využívají zejména jako emulgátory typu V/O při výrobě margarínů. Dále jako stabilizátory, zahušťovadla, mazadla. [39] Zkoumány byli i jejich antimikrobní vlastnosti.[40]

V dnešní době se celosvětově vyprodukuje 150 000 až 200 000 tun emulgátorů. Z toho množství je až 75% monoacylglycerolů, diacylglycerolů (DAG) a jejich derivátů. MAG a DAG jsou obvykle používány ve směsích. Nejčastější používané deriváty jsou uvedené v tabulce (tab. 1) [35]

Tab.1 Emulgátory s monoacylglycerolových a diacylglycerolových směsí [39].

Název	MAG a DAG esterifikovány	Složka, která byla použita pro výrobu směsi
acetem	kyselina octová	anhydrid kyseliny octové
lactem	kyselina mléčná	kyselina mléčná
citrem	kyselina citronová	kyselina citronová
datem	MAG a DAG kyseliny vinné	kyselina vinná a octová

## 2.4 Metody stanovení

Monoacylglyceroly lze stanovit několika metodami. Využívané jsou především kapalinová chromatografie a plynová chromatografie. Kapalinová vysokoúčinná chromatografie (HPLC) a tenkovrstvá chromatografie (TLC) byly využity v praktické části diplomové práce.

Chromatografie je souhrnné označení pro skupinu fyzikálně-chemických separačních metod. Molekuly analytu se u všech typů chromatografických separací rozdělují mezi stacionární a mobilní fázi. Dělení je založeno na rozdílné afinitě složek směsi k mobilní a stacionární fázi. [41]

### 2.4.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody je možno dělit podle různých hledisek jako je například povaha mobilní fáze (kapalina / plyn), způsob provedení (na koloně / plošné uspořádání), princip separace (rozpuštění / adsorpce / iontová výměna). [41]

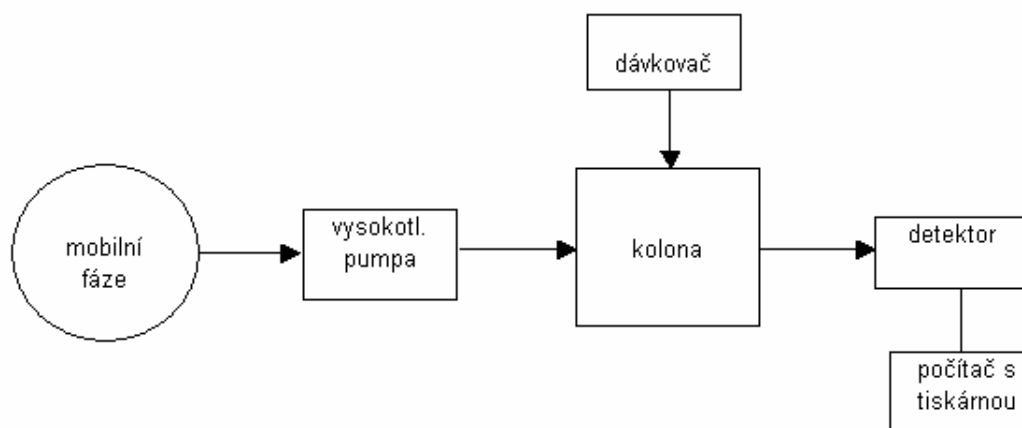
### 2.4.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je druh plošné chromatografie s převládajícím adsorpčním mechanismem dělení analyzované směsi látek. Vlastní chromatografický experiment se provádí na tenké vrstvě sorbentu (celulóza, silikagel, alumina) naneseného na vhodné podložce (sklo, kovová fólie). Vzorek se ve velmi malém množství ( $\mu\text{l}$ ) nanáší na začátek vrstvy (start) společně se standardy. Po zaschnutí nanesených vzorků se vrstva vloží do vyvíjecí komory s vhodnou směsí rozpouštědel (mobilní fáze) tak, aby startovní linie byla nad hladinou a komora se uzavře. [42, 43] Vyvíjení chromatogramu probíhá tak dlouho, dokud se čelo směsi rozpouštědel nepřiblíží k okraji desky. Poté se chromatogram vyjme, vysuší a vhodným způsobem detekce se zjistí, kam doputovaly látky obsažené ve vzorku. K detekci se používají vrstvy upravené fluorescenční látkou, fluoreskující při osvětlení UV zářením. Stanovované látky velmi často tuto fluorescenci zhasí, takže se pod UV lampou objevují na chromatogramu v podobě tmavých skvrn. Využívají se i další způsoby detekce, založené na postřiku chromatogramu vhodným činidlem, které se stanovovanou látkou vytváří barevnou sloučeninu. Vyhodnocení chromatogramu se provádí pomocí hodnot  $R_F$ . Tato hodnota charakterizuje rychlost migrace každé sloučeniny. Vyjadřuje se jako poměr středu skvrny od startu a vzdálenost čela rozpouštědla od startu. Hodnoty se pohybují od 0 do 1 (látky u startu se blíží nule, látky u čela se blíží jedné). [42, 43]

Tenkovrstvou chromatografií lze stanovovat širokou škálu organických i anorganických látek při vysoké citlivosti a nízké ekonomické náročnosti. Metoda je většinou i časově rychlá, takže je velmi rozšířená v průmyslu v oblasti mezioperační kontroly. Vzhledem ke své univerzálnosti je vhodná i pro první orientaci ve složení u neznámého vzorku, dále v oblasti sledování znečištění životního prostředí, v medicíně i v chemickém výzkumu. [42]

### 2.4.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky a to „high performance liquid chromatography“ (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf. [41, 44]



Obr.11 Schématický nákres kapalinového chromatografu

Blokové schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na obrázku (obr.11). [41, 44]

Mobilní fáze může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Zásobníky jsou skleněné láhve, kterých může být několik s navzájem různými mobilními fázemi, které je možné spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru.

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3-10  $\mu\text{m}$ ), na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Vlastní stacionární fáze může být tvořena například nepolárními uhlovodíky (C8 – oktan, C18 – oktadekan), nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou (např. -CN). Dostatečný tlak a konstantní průtok mobilní fáze zajišťuje právě vysokotlaká pumpa. Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky nebo pomocí automatického dávkovače. [41, 44]

O schopnosti kolony separovat určité směsi na jednotlivé složky rozhoduje zejména typ stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči.

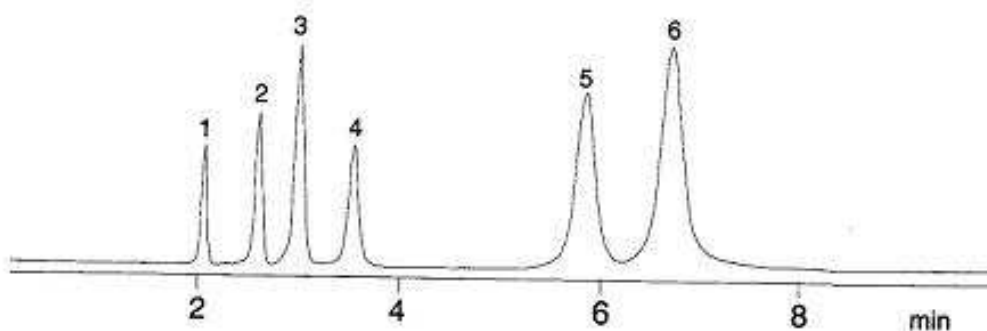
V metodě HPLC je dostupná řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Metoda HPLC využívá například tyto typy detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor. Volba detektoru závisí na konkrétní aplikaci. Podmínkou použití detektorů je, aby daný analyt absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce) anebo aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce).

Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (řádově několik málo  $\mu\text{l}$ ). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány.

Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC a tisknut v podobě chromatogramu (obr.12). [41, 44]

Tato metoda je citlivá na složení a pH mobilní fáze. Výhodou HPLC je schopnost analyzovat termolabilní látky (např. vitamíny a jiné).

Chromatogram (obr.12) je tvořen soustavou píků, které mají různou plochu a výšku, mají od sebe různou vzdálenost a v ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky.



Obr.12 Ukázka chromatogramu.

Každý pík (č. 1 - 6) odpovídá jedné složce analyzované směsi. Vodorovná osa znázorňuje čas. Čas, který odpovídá vrcholu píku je tzv. retenční čas, který je na dané koloně a za daných experimentálních podmínek pro každou látku charakteristický. [41]

Pokud je zkoumaná směs dobře rozdělena, pak každý pík na chromatogramu odpovídá jedné ze složek směsi. Poloha píku na ose x uváděná pomocí retenčního času (určeno podle polohy vrcholu) určuje o jakou látku se jedná (kvalitativní analýza), plocha píku (nebo jeho výška) určuje koncentraci látky ve směsi (kvantitativní analýza). Identifikace píků (látek) se provede tak, že se na stejné separační koloně za stejných experimentálních podmínek provede analýza předem připravené směsi o známém kvalitativním složení, tzv. standardní směs. Pokud se retenční časy píků na chromatogramu neznámé směsi shodují s retenčními časy píků směsi o známém složení, pak se jedná o stejné látky. [41, 44]

### 3 MIKROORGANISMY

Při základních testech na antimikrobní aktivitu se používá určité spektrum grampozitivních a gramnegativních bakterií a plísní. Pro praktickou část byly vybrány druhy, které způsobují kažení a sníženou jakost potravin či alimentární onemocnění.

#### 3.1 Doména Bacteria

Jsou to jednobuněčné prokaryotické mikroorganismy. Velikost buněk se udává v  $\mu\text{m}$ . Základní tvar bakterií je tyčinkovitý a kulovitý. [45, 46]

##### 3.1.1 Stavba

Cytoplasma bakteriální buňky je obklopena cytoplasmatickou membránou. Na ni obvykle nasedá pevná buněčná stěna. Na jejím povrchu může být bakteriální pouzdro nebo vrstva slizu. Z povrchu některých bakterií vystupují bičíky, případně submikroskopické výběžky zvané pili. V cytoplasmě se nalézají nukleoid neboli jaderný ekvivalent, ribosomy a inkluzní tělíska, vakuoly nebo granula, u některých bakterií spory (např. u rodu *Bacillus* a *Clostridium*). [45, 46]

##### 3.1.2 Rozdělení

Bakterie lze rozdělit dle stavby buněčné stěny na grampozitivní a gramnegativní dle dánského lékaře Grama, který objevil, že se bakterie dají rozdělit do dvou skupin na základě schopnosti či neschopnosti obarvených buněk podržet si barvivo v přítomnosti alkoholu nebo acetonu. Grampozitivní bakterie zůstanou tmavomodré, gramnegativní červené.

Buněčná stěna gramnegativních bakterií obsahuje více lipidů než stěna grampozitivních. Předpokládá se, že alkohol v ní vytváří póry, jimiž se barevný komplex snáz vyplavuje. Jiní zase soudí, že příčinou grampozitivity je silnější vrstva peptidoglykanu ve stěně grampozitivních bakterií.

Bakterie se vyskytují v přírodě hlavně ve stojaté a tekoucí vodě, v bahně, půdě, některé i jako kontaminanty potravin. Některé druhy způsobují alimentární onemocnění. [46]

##### 3.1.3 Grampozitivní bakterie použité v praktické části

- *Bacillus cereus* je sporulující tyčinka z čeledi *Bacillaceae*. Spory jsou oválné, nezduřují buňku. *B. cereus* patří mezi bakterie aerobní, chemoorganotrofní, s optimální teplotou růstu 30 °C. Běžně se vyskytuje v půdě, v prachu a ve vzduchu. Produkuje však řadu toxinů, z nichž

nejvýznamnější jsou dva enterotoxiny tzv. emetický a průjmový toxin. Emetický toxin je zodpovědný za zvracení, nevolnost, obvykle bez průjmů. K vyvolání tohoto tzv. „syndromu zvracení“ dochází po požití kontaminované potravin. Průjmový toxin je zodpovědný za vodnaté průjmy a bolesti břicha. Je produkován bakterií *B. cereus* po jejím pomnožení v tenkém střevě. K onemocnění dochází při požití kontaminované potravin, která byla nevhodně skladována po dokončení kuchyňské úpravy a ve které došlo při pokojové teplotě k pomnožení mikroba. Zdrojem šíření bývá často vařená rýže, zelenina, mléko, masové výrobky a také cukrářské výrobky. [47]

- *Bacillus subtilis* - je v přírodě téměř všudypřítomný. Podobně jako *B. cereus* je to sporulující tyčinka, spory jsou oválné a nezduřují buňku. Roste aerobně, optimální kultivační teplota je 30 °C. Produkuje antibiotika, která se průmyslově vyrábí (bacitracin), bakteriální amylázy se uplatňují v pivovarství a v textilním průmyslu. U některých kmenů byla zjištěna produkce toxinů. [46]
- *Enterococcus faecalis* – patří mezi grampozitivní koky, které často tvoří diplokoky. Je to fakultativně anaerobní bakterie a chemoorganotrofní výživou a růstovým optimem 37°C. Enterokoky se běžně vyskytují v obsahu gastrointestinálního traktu člověka i živočichů, proto jsou používány jako indikátor fekálního znečištění pitných vod. Jsou značně odolné, snášejí i 6,5 % koncentraci NaCl, 10 - 45°C, pH 9,5. [46]
- *Micrococcus luteus* - grampozitivní aerobní kokovité bakterie z čeledi *Micrococcaceae*. Teplotní optimum leží v rozmezí 25-37°C. Vyskytují se ve vodě, prachu a půdě. Především na solených potravinách, v mléčných a živočišných produktech i v pivu a také na lidské pokožce [48]
- *Staphylococcus aureus* – vyskytuje se na kůži, rozmnožuje se i v prostředí s 10 % chloridu sodného. Způsobuje angínu, hnisavé onemocnění kůže, hnisání ran a hnisavé onemocnění poraněných kostí. Dostane-li se do potravin produkuje enterotoxiny bílkovinné povahy, které mohou způsobit vážné až smrtelné otravy. [46, 49]

### 3.1.4 Gramnegativní bakterie použité v praktické části

- *Citrobacter freundii* - zástupce čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o fakultativně anaerobní rovné tyčinky s optimální kultivační teplotou 37°C. Je běžným obyvatelům střevního traktu

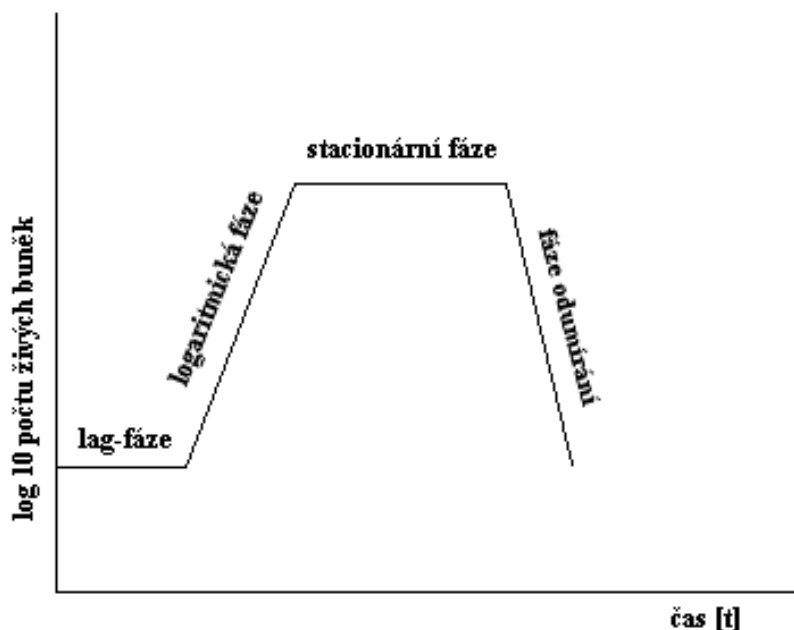
člověka, ale ve vyšších koncentracích může způsobit onemocnění u oslabených jedinců. Způsobuje průjmová onemocnění. [46]

- *Salmonella enterica* - patří mezi gramnegativní pohyblivé bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* vyvolávající lehké gastroenteritidy až těžká onemocnění lidí i zvířat. Jde o bakterie fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s teplotním optimem 37°C. Přenáší se hlavně masem a vejci. [46]
- *Serratia marcescens* – rod *Serratia* náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*. Podobně jako další zástupci této čeledi i *S. marcescens* je rovná tyčinka, pohyblivá pomocí bičíků, fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s teplotním optimem 37°C. Vyskytuje se v půdě, ve vodě nebo na povrchu rostlin, může se uplatnit i jako oportunní patogen člověka a častý původce nozokomiálních infekcí dýchacího traktu. [46]
- *Escherichia coli* – tyčinkovité bakterie, fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s teplotním optimem 37°C. Žije v tlustém střevě teplokrevných živočichů a člověka. Její přítomnost ve vodě indikuje fekální znečištění. [46]
- *Pseudomonas aeruginosa* – zástupce čeledi *Pseudomonadaceae*, rovné nebo mírně zakřivené tyčinky, pohyblivé, aerobní, chemoorganotrofní s optimální teplotou pro růst 25-30 °C. Její výskyt je běžný ve vodě i v půdě. *P. aeruginosa* je však i významným oportunním patogenem člověka a častým původcem nozokomiálních infekcí. Vyvolává kožní infekce, infikuje bércevé vředy, původcem infekcí urogenitálního a respiračního traktu. [46]

### 3.1.5 Růstová křivka bakteriální populace

Za ideálních podmínek probíhá dělení bakterií geometrickou řadou. Během každé generační doby se počet buněk zdvojnásobí. Teoreticky tedy při generační době 30 minut může za 24 hodin vzniknout asi  $2,8 \cdot 10^{14}$  buněk. Ve skutečnosti však těchto koncentrací bakterie dosáhnout nemohou, protože buď vyčerpají živiny, nebo jsou buňky inhibovány zplodinami svého metabolismu. Laboratorní kultury pěstované tzv. stacionárním způsobem v tekutém prostředí obsahují nanejvýš  $5 \cdot 10^9$  bakterií v 1 ml.

Růstová křivka (obr. 13) znázorňuje počet živých buněk v závislosti na stáří kultury, přičemž počet živých buněk je uveden v logaritmické stupnici. Na růstové křivce lze pozorovat zejména fázi prodlevy čili lag-fázi, logaritmickou fázi, stacionární fázi, a nakonec fázi odumírání a smrti buněk. Mezi fázemi existují pozvolné přechody. [45]



Obr.13 Růstová křivka

Termín *lag-fáze* se týká prodlevy v dělení buněk, nikoli jiných aspektů růstu bakterií. Buňky v lag-fázi mohou syntetizovat různé enzymy nebo zvětšovat svůj objem, aniž se dělí. Délka lag-fáze závisí hlavně na fyziologickém stavu inokula. Pokud byly jako inokulum použity intenzivně se množící buňky logaritmické fáze růstu ve stejném médiu oplývající spoustou enzymů, bude lag-fáze velmi krátká. Naopak se lag-fáze výrazně prodlouží, použijeme-li k naočkování starou kulturu vyhladovělých či dokonce odumírajících buněk. Lag-fáze končí krátkým obdobím, kdy se buňky začínají dělit, ne však ještě stálou rychlostí (někdy se hovoří o fázi zrychlení růstu). [45]

*Logaritmická nebo též exponenciální fáze* se vyznačuje konstantní rychlostí dělení buněk. Vztah mezi počtem živých buněk a časem je exponenciální. Rychlost, s jakou se buňky dělí, závisí na druhu mikroba, na teplotě a na složení kultivačního prostředí a uvádí se obvykle jako generační doba. V uzavřeném systému představovaném např. nádobkou s bujónem se složení kultivačního média postupně zhoršuje: ubývá živin a přibývá zplodin metabolismu, zejména těch, které ovlivňují pH prostředí. To posléze vede ke zpomalování rychlosti dělení buněk (fáze zpomalení růstu).

Ve *stacionární fázi* se buňky téměř nemnoží. Pro nedostatek živin mohou být buňky ve stacionární fázi menší. Buněčné složky se tvoří stále méně koordinovaně, přibývá kyselých a jiných odpadních produktů a odumírajících buněk. Nutno připomenout, že buňky odumírají i v prostředí o optimálním složení. Jejich struktury jsou vystaveny například tepelnému pohybu molekul a musí být neustále



opravovány. Ve stacionární fázi tedy životaschopných buněk nepřibývá ani neubývá. Délka stacionární fáze závisí na druhu bakterie a charakteru prostředí. [45]

Rychlost, s jakou ve fázi *odumírání* populace buněk hyne, opět závisí jak na mikrobiálním druhu, tak na charakteru prostředí. Některé mikroby, například neisserie nebo pneumokoky se v této fázi rychle doslova rozpouštějí (autolyzují). Příčinou je indukce enzymů destruujičích buněčnou stěnu. Jedná se o tytéž enzymy, které se během růstu buňky podílely na vkládání nově vytvořeného peptidoglykanu do buněčné stěny, je však porušena rovnováha mezi lytickým působením a syntézou stěny.

Někdy je rychlost odumírání populace po určitou dobu konstantní a křivka vyjadřující počet přežívajících buněk v čase je exponenciála opačného směru než v případě fáze logaritmické. K tomu dochází tehdy, usmrtí-li buňku jediný zásah nepříznivého faktoru. Většinou se však v buňce kumuluje těchto zásahů několik a kinetika odumírání populace pak není exponenciální.

Pokud se podaří stále přivádět živiny do kultury a odstraňovat z ní zplodiny včetně namnožených buněk, můžeme bakteriální populaci udržet v logaritmické fázi po neomezeně dlouhou dobu. Tomuto způsobu pěstování buněk se říká kontinuální kultivace. Probíhá v přístrojích zvaných fermentory a o jejich propracování se zasloužili i českoslovenští mikrobiologové. Využívá se v průmyslové mikrobiologii k produkci rozmanitých látek včetně antibiotik. Prvky kontinuální kultivace však nalézáme i v přirozených systémech. Příkladem je růst bakterií v zažívacím traktu. V přirozených systémech se však bakterie množí většinou pomaleji než v laboratorních podmínkách. Příčinou bývá omezený přívod živin a suboptimální teplota, ale i působení ostatních mikrobů a dalších faktorů přirozeného prostředí. [45]

## 3.2 Říše houby Fungi

Houby jsou eukaryotické organismy. Pro vláknité houby se používá termín plísně. Představují velkou skupinu živých organismů dříve řazenou k rostlinám, ale nyní vyčleněnou jako samostatnou říši. Její zástupce lze nalézt po celé Zemi. V potravinářství se používají se pro výrobu lihu kvašením, výrobu chleba a kynutého pečiva, výrobu piva, vína, některých druhů sýrů.

### 3.2.1 Stavba

Houby mají v porovnání s bakteriemi složitější stavbu buněk. Jedná se o heterotrofní organismy bez plastidů (neprobíhá fotosyntéza), pokud obsahují barviva, pak neslouží k asimilaci. Tělo, tzv. stélka,

hub je různého typu, od jednoduché (u primitivních hub) jako je nahá a améboidní až po složitou mnohjadernou a vláknitou u dokonalých hub. Vegetativní tělo je tvořeno buď jednou buňkou, která může být rozvětvená, nebo je tělo vláknité a popř. rozvětvené. Stélka může být jednobuněčná i vícebuněčná, jednojaderná, dvoujaderná i vícejaderná. Buňky vláknitých hub tvoří typické řetězce, s možností větvení, které se označují jako hyfy. Hyfy jsou základní stavební jednotky a vytvářejí podhoubí (mycelium). [50]

### 3.2.2 Vlastnosti

Některé druhy plísní produkují mykotoxiny, látky schopné negativně ovlivnit zdraví člověka. Mykotoxiny často poškozují játra a ledviny, negativně působí na imunitní systém, některé jsou potenciálně karcinogenní.

Mezi nejvýznamnější mykotoxiny patří aflatoxiny, ochratoxiny, fumonisiny a zearalenon [51]

Aflatoxiny jsou karcinogenní mykotoxiny produkované plísněmi rodu *Aspergillus*. Nejčastěji jsou nalézány v arašidech, kukuřici a skořápkových plodech. Ochratoxiny jsou produkovány plísněmi rodů *Aspergillus* (ochratoxin A) či *Penicillium*. Nejčastěji bývají izolovány z obilovin. Fumonisiny jsou produkovány plísněmi *Fusarium*. Vyskytující se především na kukuřici a jsou nebezpečné zejména pro hospodářská zvířata. Některé druhy *Fusarium* jsou i producenty toxinu zearalenonu, který má podobné účinky jako steroidní hormony estrogeny a je rozeznáván savčími receptory pro estrogen. U dobytka vyvolává hyperestrogenní syndrom narušující reprodukci. [51, 52] Mezi další mykotoxiny patří patulin produkováný některými zástupci rodu *Penicillium* (nejčastěji v jablečných a jiných ovocných výrobcích). Námelové alkaloidy jsou produkovány plísní *Claviceps*, vyvolávají halucinace a svalové křeče. Dalším důsledkem jsou poruchy krevního oběhu, které po delší době mohou vést k odumírání končetin.

K výskytu mykotoxinů na zemědělských produktech (krmivech i potravinách rostlinného i původu) dochází v důsledku nepříznivých teplot a vlhkosti při sklizni, skladování, přepravě a dalším zpracování. [51, 52]

### 3.2.3 Plísně použité v praktické části

- *Alternaria alternata* – patří do kmene *Ascomycota*. Vyskytuje se velmi hojně na celém světě, a to na různých substrátech rostlinného původu včetně potravin a krmiv, a také v půdě. Může produkovat vysoce toxický metabolit AAT (*Alternaria alternata* toxin) podobný fumoni-

sinu, kyselinu tenuazonovou a dále řadu méně významných toxinů, např. alternariol. Patří mezi oportunní patogeny, způsobuje např. kožní léze. [53]

- *Aspergillus niger* – patří do kmene *Ascomycota*. Nachází se na potravinách rostlinného i živočišného původu. Tvoří velké množství spor. Dlouho byl považován za netoxinogenní, avšak v 90. letech byla u několika kmenů zjištěna produkce mykotoxinu ochratoxinu A. [53]
- *Penicillium roqueforti* - používá se pro výrobu sýrů typu Roquefort, může se však vyskytnout i jako kontaminant jiných potravin či krmiv (např. siláží). V čisté kultuře je schopen produkovat toxin, avšak na sýrech je jeho produkce velmi slabá a látka se rozkládá. [53]
- *Mucor rasemosus* – patří do kmene *Zygomycota*. Tvoří volně vláknitý porost většinou bílého zabarvení s kulovitými lehce nahnědlými sporangii. Parazituje na ovoci, zelenině a obilí. Způsobuje akutní plísňové infekce. Pro oslabené jedince může mít až smrtelné následky. [53]

## 4 ZHODNOCENÍ TEORETICKÉ ČÁSTI

Z rešeršní části této práce vyplývá, že perfluorované deriváty mají významné specifické vlastnosti. Díky své stabilitě, odolnosti a schopnosti vázat kyslík jsou publikovány studie zaměřené na využití perfluorovaných derivátů jako krevních náhražek. Fluorované léky byly úspěšně testovány v léčbě metabolických a kardiovaskulárních chorob a byl zjištěn výrazný antimikrobní účinek. Antimikrobní účinky byly zjištěny také u monoacylglycerolů, jejichž výzkumem se zabývá naše fakulta.

Mezi nejnovější metody přípravy monoacylglycerolů patří adice MK na glycidol nukleofilním otevřením epoxidového kruhu za přítomnosti chromitého katalyzátoru. Výhodou této metody je především vysoká výtěžnost, univerzálnost a rychlost reakce. Použitý chromitý katalyzátor a nezreagovaný glycidol je však nutno z vyrobeného MAG odstranit purifikací.

Monoacylglyceroly se nejčastěji stanovují pomocí chromatografie. Používána je jednoduchá tenkovrstvá chromatografie, plynová i vysokoučinná kapalinová chromatografie.

U monoacylglycerolů byly zjištěny bakteriostatické nebo bakteriocidní účinky zejména u MAG s kyselinami s 8 až 12 uhlíky. Prokázáno bylo, že monoacylglyceroly omezovaly růst poměrně širokého spektra mikroorganismů.

Protože monoacylglyceroly i perfluorované deriváty mají antimikrobní účinky, dá se očekávat prohloubení antimikrobní aktivity u vyrobeného produktu monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekánonové (MAG-C<sub>11:0</sub>(PF)).

Pro testování antimikrobní aktivity bylo vybráno spektrum grampozitivních a gramnegativních bakterií a plísňí, které způsobují kažení potravin až alimentární onemocnění.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4.1 Použité chemikálie

Acetonitril p.a.99% (SIGMA- ALDRICH, Německo)

Aceton p.a.99,5 % (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Destilovaná voda

Ethanol denaturovaný 96%

Fenolftalein 1% roztok v ethanolu (SIGMA-ALDRICH, Praha)

Fungal agar (HiMedia Laboratories, Bombay, India)

Glycidol (2,3-epoxy-pronanol) 96 % (SIGMA-ALDRICH, Praha)

Hydroxid draselný

Chloroform (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Chlorid sodný p.a. (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Chromium(III) acetát hydroxid (SIGMA-ALDRICH, Praha)

Kyselina boritá krystalická p.a. (LACHEMA, Brno)

Kyselina perfluoroundekanová p.a.95% (SIGMA-ALDRICH, Praha)

Methylalkohol p.a. (Penta, Chrudim)

Peptone, Bacteriological (HiMedia Laboratories, Bombay, India)

Protose – BE, (HiMedia Laboratories, Bombay, India)

Toluen p.a. 99% (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Xylen čistý (LACHEMA, Praha)

2,7-dichlorfluorescein (SIGMA-ALDRICH, Praha)

## 4.2 Použitá zařízení a pomůcky

Autokláv Varioklav H+P (Germany)

Cecil UV/VIS (CE 3041)

Digitální byreta (25ml, BH Brand)

Filtr GHP Acrodisc® (25mm, 0.45µm, 1000/pkg)

Filtr s modrou páskou (č.390) (Schleicher & Schuell, Německo)

Waters 600E Gradient Module HPLC Systém (USA)

Chromatografické desky TLC-Silica gel 60F254, 0,2 mm (Riedel-de Haëken)

Laboratorní sklo a jiné laboratorní pomůcky

Magnetické míchadlo MM4 (LAVAT Chotutice)

Mikrodestičky

Mikropipeta (BIOHIT)

Odstředivka Media (Chirana)

Počítačový program Clarity 2.4.1.65 (DataApex s.r.o.)

Počítačový program Microplate reader Benchmark (Bio-Rad)

Polytherm A Heiztisch Mikroskop (Wagner and Munz, Německo)

Skleněný dvouplášťový reaktor (vyroben na FT)

Sterilátor (MEMMERT, Germany)

Sušárna (KBC 100/250 Varšava, Polsko)

Termostat (U3, Medingen)

UV lampa Lamag (UV Cabinet II)

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic compact cleaner 4L, (Powersonic)

Vakuová odparka rotační RV-05-ST (Ika Werke, Německo)

Vyvíjecí skleněná TLC komora se zabroušeným víkem

## 4.3 Použité metodiky

### 4.3.1 Stanovení bodu tání kyseliny perfluoroundekanové

U kyseliny perfluoroundekanové byl měřen bod tání na přístroji Polytherm A Heitzisch Mikroskop. Na skleněnou podložku mikroskopu byl umístěn krystalek kyseliny perfluoroundekanové. Po zaostření mikroskopu byla podložka zahřívána rychlostí 4 °C za minutu. Jakmile se začaly okraje krystalku rozpouštět, byla odečtena hodnota bodu taní. Podle změřeného bodu tání kyseliny byla použita teplota pro výrobu 1- monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové (MAG-C<sub>11:0</sub>(PF)).

### 4.3.2 Výroba 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové

Na začátku nutno říci, že vzorky kyseliny perfluoroundekanové byly drahé (cena 5 g kyseliny perfluoroundekanové byla 50 €) a dotace na diplomovou práci omezené. Proto byla pro výrobu 1- monoacylglycerolu použita menší množství a využity zkušenosti a metody aplikované na naší fakultě již v minulosti [54]. Na experimentální stanovení a testování antimikrobní aktivity však bylo vyrobené množství (řádově několika gramů) vyhovující a dostačující.

Zvolily jsme nejnovější metodu výroby MAG adiční reakcí MK na glycidol. Pro výrobu perfluorovaného 1-monoacylglycerolu byly použity skleněné dvouplášťové reaktory. Ve stěnách pláště reaktoru proudila voda vytemperovaná na nejvyšší možnou teplotu, kterou systém umožňoval, a to 97,5°C, tak aby nedošlo k varu topného media.

Byl zvolen postup výroby v toluenu jako rozpouštědle, z toho důvodu, že se za použití nejvyšší možné teploty reaktoru a homogenizace pomocí magnetického míchadla nebyla schopna kyselina rozpustit. Proto bylo vpraveno do vnitřního prostoru reaktoru přesně navážené množství MK a 2 ml toluenu. Na reaktor byl nasazen vzduchový chladič. K MK bylo přidáno 0,5 % hm. katalyzátoru Chromium(III) acetát hydroxid na navážku reaktantů. Reakční směs byla zahřívána po dobu 30 minut a poté byl přidán glycidol v molárním poměru MK:glycidol 1:2. Směs byla za stálého míchání zahřívána při 97,5°C po dobu 110 minut. Po 110 minutách byl odstraněn vzduchový chladič, aby vyprchal těkavý glycidol. Byl získán 1-monoacylglycerol kyseliny perfluoroundekanové (MAG-C<sub>11:0</sub>(PF)). V průběhu výroby byla stanovována konverze reakce.



### 4.3.3 Stanovení konverze reakce

V určitých časových intervalech byly odebírány vzorky reakční směsi. U odebraných vzorků byl stanoven obsah nezreagované kyseliny. Vzorek byl zvážen s přesností na 0,0001 g a následně rozpuštěn v 5 ml směsi xylen:ethanol (1:1). Roztok byl titrován 0,1 M ethanolickým roztokem KOH na fenolftalein do prvního růžového zbarvení. Výsledek byl vyjádřen jako hmotnostní procenta kyseliny vztažená na navážku MK vstupující do reakce (rovnice 1).

$$\%C = \frac{a \cdot c_{\text{KOH}} \cdot M_{\text{K}}}{1000 \cdot m \cdot p} \cdot 100 \quad (1)$$

a.....spotřeba 0,1M ethanolického roztoku KOH [ml]

$c_{\text{KOH}}$ ...přesná koncentrace ethanolického roztoku KOH [mol.l<sup>-1</sup>]

$M_{\text{K}}$ .....molární hmotnost MK [g.mol<sup>-1</sup>]

m.....navážka vzorku [g]

p.....poměr skutečné navážky kyseliny do reakce k celkové hmotnosti všech reaktantů

Konverze byla vypočtena dle rovnice (2):

$$\%MAG = 100 - \%C \quad (2)$$

### 4.3.4 Příprava 0,1M ethanolického roztoku hydroxidu draselného

Předem vypočtené množství KOH (cca 6,6 g) bylo rozpuštěno v 20 ml destilované vody. Po rozpuštění byl roztok převeden do 1000 ml odměrné baňky a doplněn po rysku 96% ethanolem. Roztok se nechal přes noc na temném místě a poté byla stanovena jeho přesná koncentrace. Roztok byl uchováván v temnu.

### 4.3.5 Stanovení přesné koncentrace ethanolického roztoku hydroxidu draselného

0,0131g kyseliny perfluoroundekanové bylo rozpuštěno v 5 ml toluenu. Navážené množství odpovídá 0,1 M roztoku kyseliny perfluoroundekanové. Roztok byl následně titrován ethanolickým roztokem KOH na fenolftalein. Na základě spotřeby byla vypočtena přesná koncentrace ethanolického roztoku KOH (rovnice 3).

$$c_{\text{KOH}} = \frac{5}{a} \cdot 0,1 \quad (3)$$

$c_{\text{KOH}}$ ...přesná koncentrace ethanolického roztoku KOH [mol.l<sup>-1</sup>]

a.....spotřeba cca 0,1M ethanolického roztoku KOH [ml]

### 4.3.6 Purifikace 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové

Vyrobený 1-monoacylglycerol kyseliny perfluoroundekanové (MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>) rozpuštěný v toluenu byl převeden do 96% ethanolu tak aby poměr objemů byl 1:4. Tuhé podíly byly po 15 min. přefiltrovány vakuově přes modrou pásku. Část zbavená tuhých podílů byla umístěna v mrazničce při teplotě -18°C. Po vykrystalizování po cca 6 hodinách byl supernatant odseparován na odstředivce při 1500 ot/min. Supernatant byl odlit a tuhý MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> podroben druhé rekrystalizaci. Vyrobený finální produkt světle modré barvy a tuhé konzistence byl po přesušení za laboratorní teploty použit na charakterizaci pomocí tenkovrstvé a kapalinové chromatografie a následně otestována jeho antimikrobní aktivita vůči vybraným bakteriím a plísním.

### 4.3.7 Tenkovrstvá chromatografie

TLC vyrobeného MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> byla prováděna na silikagelových deskách impregnovaných roztokem kyseliny borité. K vyvíjení byla použita vyvíjecí soustava chloroform:aceton:methanol (95:3,5:1,5) [24]. Pro identifikaci skvrn bylo použito detekční činidlo 2,7-dichlorfluorescein a následně UV detekce.

Silikagelové desky byly impregnovány 5% roztokem kyseliny borité po dobu 5 minut. Následně byly sušeny v sušárně při 90°C po dobu 60 minut.

Vzorek kyseliny perfluoroundekanové a vzorek glycidolu byly naváženy do 5ml odměrných baněk na koncentraci 2 %. Odměrná baňka byla doplněna 96% ethanolom pro rysku. Vzorek vyrobeného MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> byl pro urychlení procesu rozpouštění na ultrazvukové lázni Ultrasonic compact cleaner při 70 °C.

Vyvíjecí soustava chloroform:aceton:methanol v poměru (95:3,5:1,5) byla dobře promýchána a nalita do skleněné vyvíjecí komory, která nechala se dokonale nasytit parami. Na stěnách komory byly umístěny filtrační papíry pro zajištění ideálního dělení v důsledku nasycení komory parami.

Jako detekční činidlo byl připraven ethanolický roztok 2,7-dichlorfluoresceinu. Roztok byl připraven do 250 ml odměrné baňky, naváženo bylo cca 0,5 g 2,7-dichlorfluoresceinu a doplněno 96% ethanolom pro rysku. Po důkladném rozmíchání byl roztok nalit do rozprašovací nádoby.

Na start impregnované silikagelové desky byly naneseny vzorky v množství 5 µl. Po odpaření rozpouštědla byly desky vloženy do vyvíjecí komory, kde se nechaly vyvíjet. Po ukončení vyvíjení bylo označeno čelo a desky byly ponechány k zaschnutí. Následně byly desky postříkány připraveným detekčním činidlem. Po zaschnutí byly pozorovány pod UV lampou při vlnové délce 366nm.

#### 4.3.8 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC

Pomocí HPLC byly stanoveny vzorky vyrobeného 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekánové. Jako standardy pro detekci byly použity kyselina perfluoroundekánová a glycidol jako výchozí látky při výrobě MAG. Analýza vzorků byla provedena na chromatografu Waters 600E, na koloně typu Nova-Pack C-18, systém byl vybaven degasérem (mikrovakuová pumpa).

Pro stanovení přesné vlnové délky byla kyselina a vyrobený vzorek dány ke změření pracovníkům na Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky.

Podmínky stanovení: UV detekce při vlnové délce 205 nm, mobilní fáze acetonitril:voda:kyselina octová (80:20:0,1), průtok mobilní fáze 0,8ml/min, smyčka velikosti 100 µl, rozsah detektoru 0-1500 mV. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Charity Data Apex.

Vzorky kyseliny perfluoroundekánové a glycidolu byly naváženy do 10 ml odměrných baněk, tak aby jejich koncentrace byla cca 0,5% a doplněna mobilní fází po rysku. Vzorek MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> byl pro urychlení rozpouštění připraven na ultrazvukové lázni při 70 °C. Vzorky byly před nástřikem filtrovány na filtru (GHP Acrodisc®).

#### 4.3.9 Antimikrobní aktivita

Antimikrobní aktivita vyrobeného 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekánové (MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>) byla testována na vybraných kulturách grampozitivních a gramnegativních bakterií a plísní.

#### 4.3.10 Antimikrobní účinky 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekánové v bujónu

Testované kultury bakterií byly poskytnuty UTMP FT UTB ve Zlíně.

Použity byly kultury:

- grampozitivních bakterií: *Bacillus cereus* (CCM 2010), *Bacillus subtilis* (CCM 4062), *Enterococcus faecalis* (CCM 4224), *Micrococcus luteus* (CCM 732), *Staphylococcus aureus* (CCM 3953)
- gramnegativních bakterií: *Citrobacter freundii* (CCM 7187), *Salmonella enterica* (ssp. *enteritica* serovar Enteritidis) (CCM4420), *Serratia marcescens* (CCM 303), *Escherichia coli* (CCM 3954), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955)

Bakterie byly naočkovány do masopeptonového bujónu (MPB) a kultivovány 24 hodin v termostatu při 30°C.

Příprava MPB:

masový výtazek.....3 g

pepton..... 5 g

NaCl .....3 g

destilovaná voda....1 l

Vliv MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> na růst bakterií byl sledován s použitím přístroje Microplate reader Benchmark. Byl připraven 2% roztok MAG v ethanolu. Před vlastním stanovením bylo ověřeno, že ethanol v dané koncentraci nemá inhibiční účinek na testované bakterie a nebudou tak ovlivněny výsledky. Růst bakterií byl pozorován na mikrotitračních destičkách po dobu 24 hodin při teplotě 25 °C. Hodnocen byl jako změna optické denzity suspenze buněk. Nárůst bakterií byl měřen při vlnové délce 655 nm v 30-ti minutových intervalech. Vzorek byl po každém měření protřepáván po dobu 20 sekund. K vyhodnocení byl použit program Microplate manager.

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 200 µl kultivačního média MPB s příslušnou koncentrací MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> a 5 µl bakteriální suspenze testovaného druhu. Koncentrace testovaného MAG byly 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml. Pro pozitivní kontrolu růstu bakterií byl do řádku jamek pipetován MPB a testované druhy bakterií, nebyl přidáván žádný MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>.

Z naměřených hodnot byl vypočítán průměr a sestrojeny růstové křivky a vypočten index růstu bakterií (rovnice 4), který byl následně vyhodnocen graficky.

$$\text{Index růstu} = \frac{(OD_{655} - NK)}{PK} \cdot 100 \quad (4)$$

OD .....optická denzita (hustota)

NK .....optická denzita negativní kontroly pro určitou koncentraci MAG

PK .....optická denzita pozitivní kontroly

#### 4.3.11 Antimikrobní účinky 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové na pevné půdě

Kultury plísní byly poskytnuty UTMP FT UTB ve Zlíně. Použity byly plísně *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor rasemosus*.

Živné médium Fungal agar bylo sterilizováno v autoklávu. K vysterilizovanému agaru byl přidán MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> do výsledné koncentrace 250 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml. Pro porovnání byla připravena pozitivní kontrola. Agar byl nalit do Petriho misek a po zatuhnutí byl zaočkován vybranými druhy plísní. Agar byl sledován v pravidelných intervalech, kdy byly měřeny a fotografovány kolonie plísní. Z naměřených hodnot byl vypočítán index růstu (vzorec 4).

## 4.4 Výsledky a diskuse

Cílem této práce bylo vyrobení 1-monoacylglycerolu z kyseliny perfluoroundekanové. Protože monoacylglyceroly i perfluorované deriváty mají antimikrobní účinky, dalo se očekávat prohloubení antimikrobní aktivity u vyrobeného 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové (MAG-C<sub>11:0</sub>(PF)).

### 4.4.1 Stanovení bodu tání kyseliny perfluoroundekanové

Hodnota bodu tání kyseliny perfluoroundekanové byla stanovena na 96,1 °C. Na základě této hodnoty bylo rozhodnuto aplikovat rozpouštědlovou metodu pro výrobu 1-monoacylglycerolu.

### 4.4.2 Výroba 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové

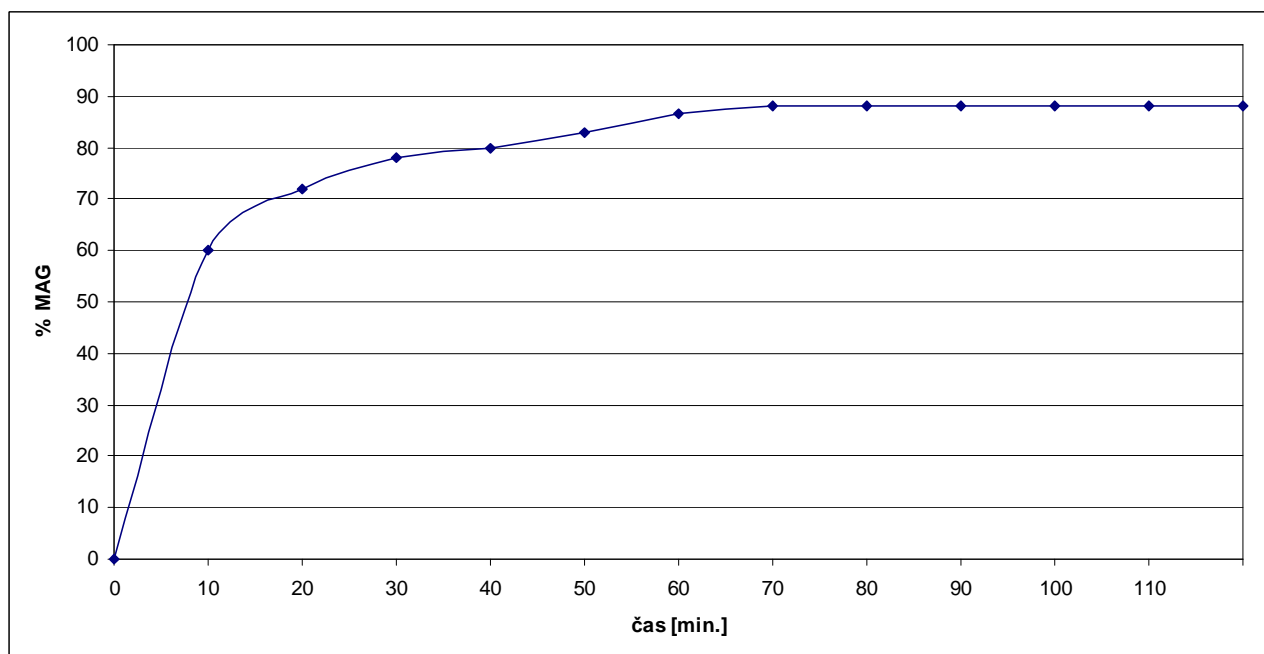
MAG byl vyroben dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.2. praktické části. Jako zařízení pro výrobu 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové byl použit skleněný dvouplášťový reaktor. Protože bod tání kyseliny je velmi blízký bodu varu vody, jako topného media v termostatu, a nebylo zaručeno dokonalé tání a homogenizace kyseliny s katalyzátorem, byl zvolen postup výroby za použití toluenu jako rozpouštědla. Toluén byl vybrán na základě zkušeností z minulosti, kdy bylo ověřeno, že reakce probíhá pouze v nepolárním prostředí. Nejvyšších konverzí při preparaci MAG organických kyselin s vyšším bodem tání bylo dosaženo právě v toluenu [54]. Ve stěnách pláště reaktoru proudila voda vytemperovaná na 97,5 °C, což byla maximální teplota, kterou umožňoval temperanční systém. Nejprve bylo do vnitřního prostoru reaktoru vloženo 5,1789 g kyseliny perfluoroundekanové a 5 ml toluenu. Směs byla homogenizována za pomoci magnetického míchadla. Na reaktor byl nasazen vzduchový chladič. Ke kyselině bylo přidáno 0,5 % hm. katalyzátoru Chromium(III) acetát hydroxidu, kalkulovaného na navážku reaktantů. Reakční směs byla zahřívána po dobu 30 minut a poté byl přidán glycidol v molárním poměru MK:glycidol (1:1,6). Směs byla za stálého míchání zahřívána při 97,5 °C po dobu 110 minut. V průběhu výroby byla stanovována konverze reakce. Výsledná konverze reakce přípravy MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) byla 79 %.

Pro dosažení vyššího výtěžku byl postup opakován s menším množstvím rozpouštědla a větším přebytkem glycidolu. Bylo naváženo 2,5196 g kyseliny perfluoroundekanové a přidáno 2 ml toluenu. Směs byla umístěna do vnitřního prostoru reaktoru a homogenizována. Na reaktor byl nasazen vzduchový chladič. Přidáno bylo 0,5 % hm. katalyzátoru Chromium(III) acetát hydroxidu. Poté byla

reakční směs zahřívána 30 minut a přidán glycidol v molárním poměru kyselina:glycidol (1:2). Směs míchána při 97,5°C po dobu 110 minut. Jak vyplývá z obrázku 14 již po 10 minutách byla konverze reakce 60 % a po proběhnutí reakce se ustálila na 88 %.

Při srovnání s prací Bobálové [54], která ve své práci ověřovala možnosti přípravy MAG z různých organických kyselin za použití chromitých katalyzátorů (v koncentraci 0,4 % (hm.) na vstupní hmotnost reaktantů, při 90 °C a reakčním čase 1 hodina) bylo v našem případě dosaženo o 10% nižšího výtěžku.

Po preparaci následovala purifikace produktu dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.6. Výsledná konverze, resp. čistota po purifikaci dosáhla hodnoty 90 %. Výtěžek po purifikaci byl 70% původního množství MAG-C<sub>11:0</sub>(PF). Výsledný produkt měl světle modrou barvu, tuhou konzistenci.

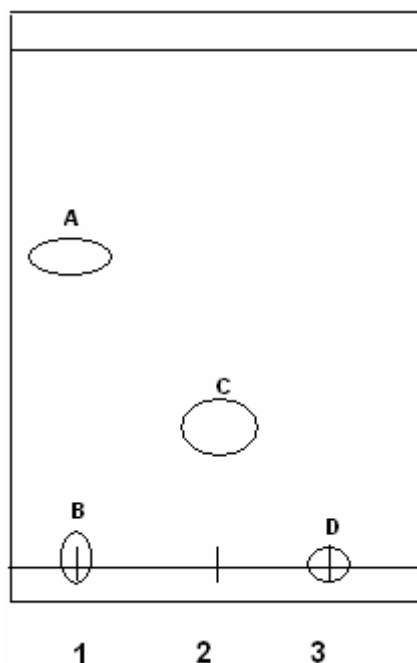


Obr.14 Výroba 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové

#### 4.4.3 Analýza 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové pomocí TLC

MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) byl analyzován pomocí TLC dle postupu uvedeném v kapitole 4.3.7. praktické části. Výsledky tenkovrstvé chromatografie znázorňuje obrázek 15. Vzorek č. 1 je kyselina perfluoroundekanová. Byly detekovány dvě skvrny. Skvrna A patrná na startu pravděpodobně přísluší nějaké neidentifikované polární nečistotě ve vzorku kyseliny. Skvrna B odpovídá kyselině perfluoroundekanové ( $R_F = 0,61$ ). Vyrobený 1-monoacylglycerol kyseliny perfluoroundekanové je reprezentován

skvrnou C (vzorek.2) s  $R_F = 0,27$ . Skvrna D znázorňuje glycidol. Vzhledem ke své polaritě a použité vyvíjecí soustavě byl logicky detekován na startu.



Obr.15 TLC chromatogram : 1. kyselina perfluoroundekanová, 2. 1-monoacylglycerol kyseliny perfluoroundekanové, 3. glycidol , vyvíjecí soustava chloroform:aceton:methanol (95:3,5:1,5), UV detekce 366 nm

#### 4.4.4 Analýza 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové pomocí HPLC

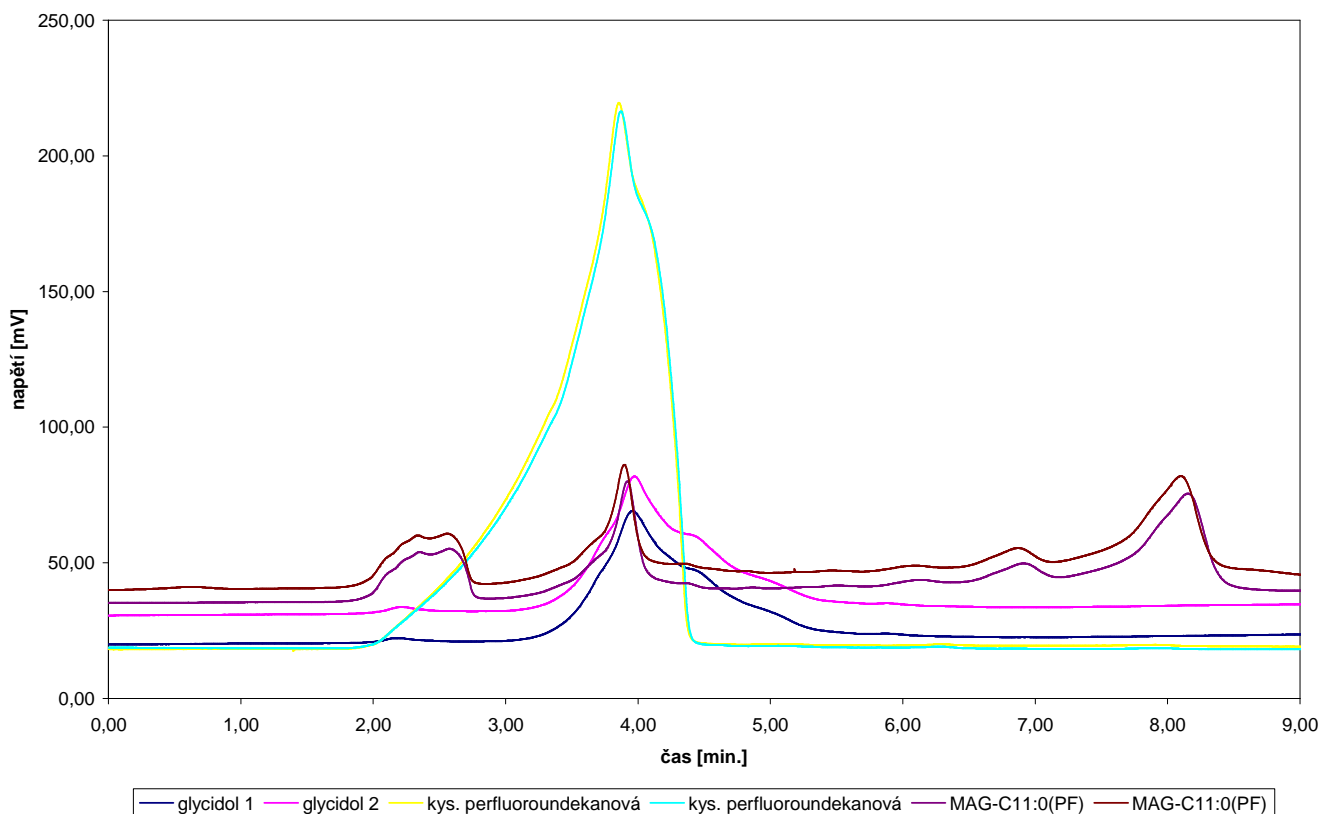
Vyrobený 1-monoacylglycerol kyseliny perfluoroundekanové byl analyzován také pomocí HPLC dle kapitoly 4.3.8. praktické části.

Nejdříve byla naměřena spektra kyseliny a MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> na Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Na spektrofotometru UV/VIS CECIL záznam vykázal maximum u kyseliny perfluoroundekanové při 208 nm, a MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> při 204,5 nm. Proto byla pro HPLC analýzu použita vlnová délka 205 nm.

Na obrázku (obr.16) můžeme vidět dva totožné chromatogramy kyseliny perfluoroundekanové, glycidolu a chromatogramy vyrobeného 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové. Prakticky identický průběh analýz dokumentuje dobrou reprodukovatelnost měření. Použitá kyselina vykazuje nesymetrický pík s maximem při retenčním času 3,89 min. Rozmytá vzestupná fáze píku kyseliny svědčí o tom, že použitá kyselina patrně obsahovala nízkomolekulární nečistoty, které byly proká-



zány i pomocí TLC (viz obr. 15 skvrna na startu u vzorku č. 2). Použitá kolona není schopná rozdělit kyselinu perfluoroundekanovou a glycidol, což dokumentují obdobné retenční časy. Pokud se podíváme na průběh stanovení MAG-C<sub>11:0</sub>(PF), je při retenčním čase 2,41 min. detekován pík, který nebyl identifikován, ale dle jeho polohy lze říci, že patří nízkomolekulární polární látce. Patrně jde o nečistotu z původní kyseliny (viz TLC). Dále následuje pík s retenčním časem 3,93 minut, tedy obdobně jako vykazuje kyselina perfluoroundekanová a glycidol. Za účelem odstranění glycidolu byl MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) po provedené reakci zahříván 30 minut v otevřeném reaktoru (aby mohl glycidol vytékat) a pak následně dvakrát čištěn pomocí rekrystalizace z ethanolu, ve kterém se glycidol dobře rozpouští. Lze předpokládat, že jmenovaný pík patří spíše zbytku kyseliny v analyzovaném MAG-C<sub>11:0</sub>(PF). Pík s retenčním časem 8,19 minut nutno ztotožnit s vyrobeným 1-monoacylglycerolem kyseliny perfluoroundekanové. Malá vlna o retenčním čase 6,94 minut by mohla patřit 2-monoacylglycerolu. Téměř totožný chromatogram MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) při opakovaném nástřiku svědčí o dobré reprodukovatelnosti měření, jak bylo uvedeno. Přestože se danou metodikou nepodařilo připravit produkt o vysoké čistotě, byl použit na antimikrobní testy. MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) totiž není komerčně dostupný.



Obr.16 Chromatogram glycidolu, kyseliny perfluoroundekanové, 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové (mobilní fáze acetonitril:voda:kyselina octová (80:20:0,1), kolona 18 C, průtok mobilní fáze 0,8ml/min, UV detekce při 205 nm, nástřík 10  $\mu$ l)

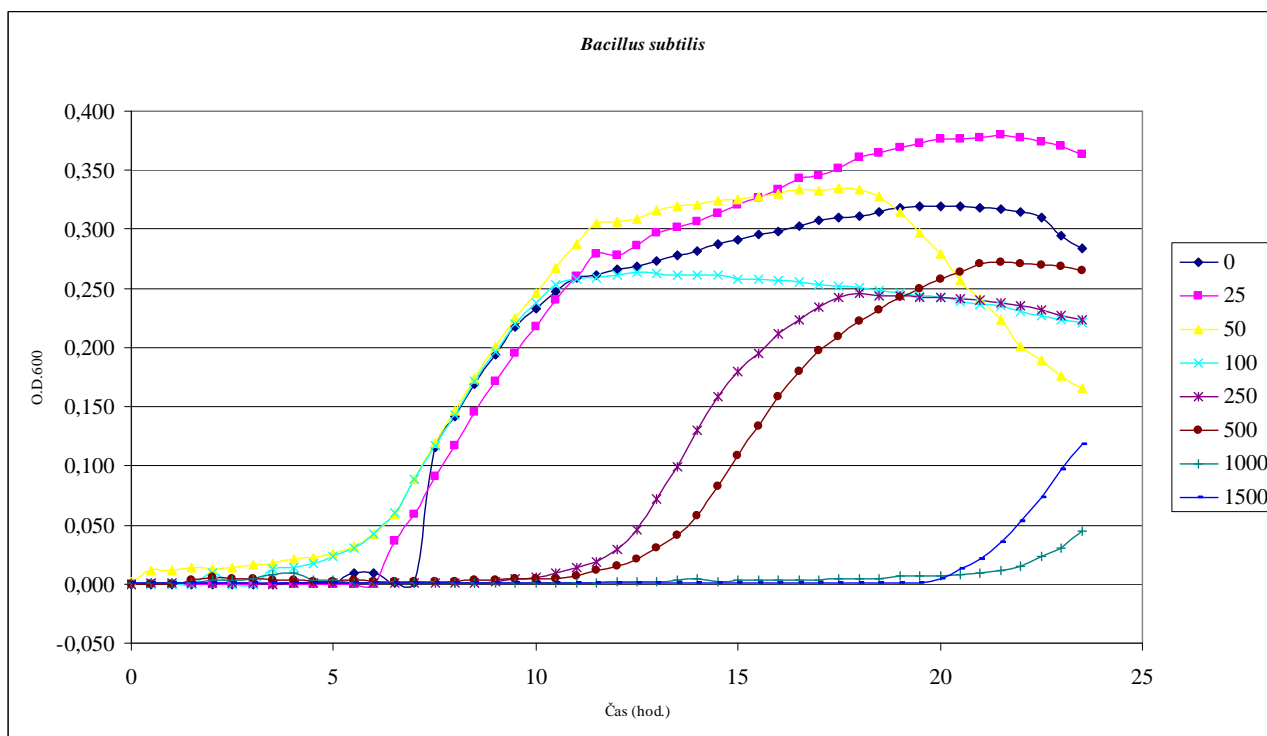
#### 4.4.5 Antimikrobní účinky 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové v bujónu

Pro studium účinku vyrobeného 1-monoacylglycerol kyseliny perfluoroundekanové na růst bakterií byly použity kultury pěti grampozitivních bakterií *Bacillus cereus* (CCM 2010), *Bacillus subtilis* (CCM 4062), *Enterococcus faecalis* (CCM 4224), *Micrococcus luteus* (CCM 732), *Staphylococcus aureus* (CCM 3953), a pěti gramnegativních bakterií (*Citrobacter freundii* (CCM 7187), *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis (CCM 4420), *Serratia marcescens* (CCM 303), *Escherichia coli* (CCM 3954), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955).

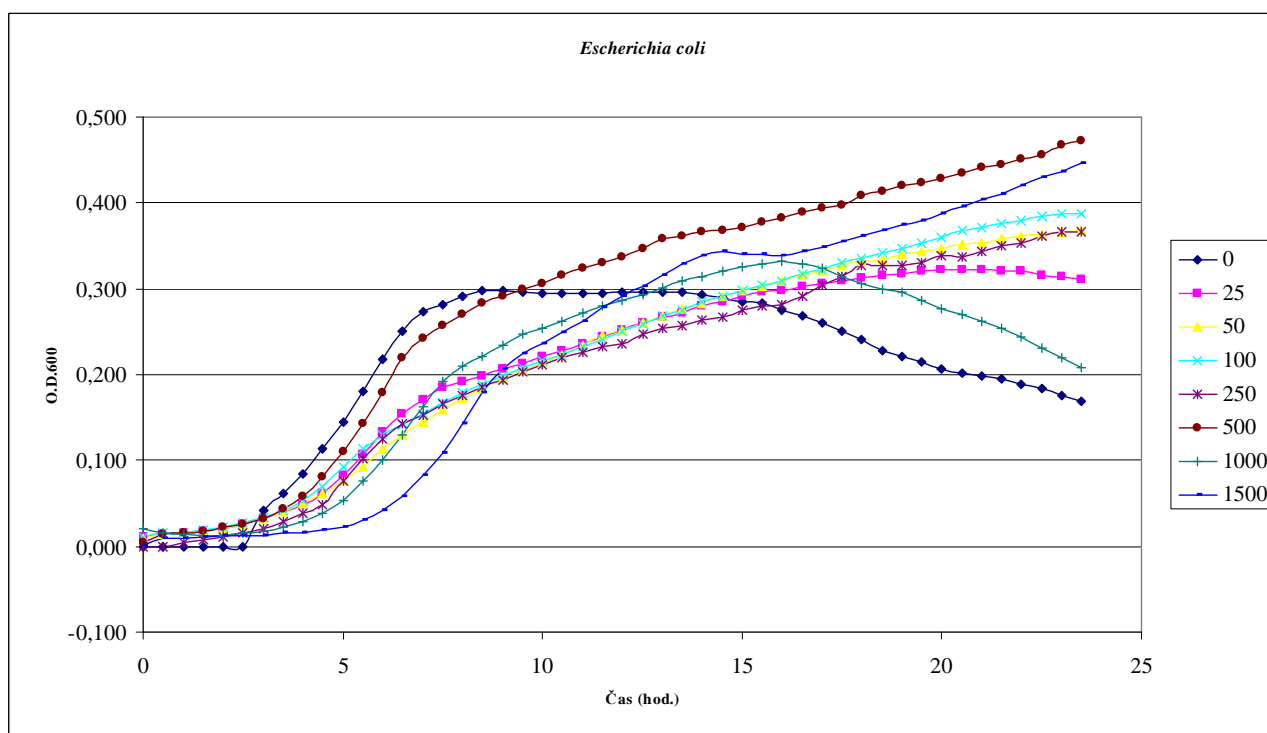
Bakterie byly kultivovány v masopeptonovém bujónu (MPB) s přidavkem 1-monoacylglycerol kyseliny perfluoroundekanové (MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>) příslušné koncentrace v termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 25°C. Pozitivní kontrola obsahovala masopeptonový bujón s bakteriemi, negativní kontrola masopeptonový bujón s příslušnou koncentrací MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>. Nárůst bakterií byl měřen v 30-ti minutových intervalech po dobu 24 hodin při 655 nm. Pro sestrojení růstových křivek byly použity aritmetické průměry dvou naměřených hodnot optické denzity. Příklady růstových křivek gramnegativních a grampozitivních bakterií jsou znázorněny na obrázku (obr.17, 18). Vzhledem k tomu, že s postupujícím časem testování dochází k postupnému vysychání média v mikrotitrační destičce, lze objektivně hodnotit růstovou křivku zhruba do 15 hodin testování. Při nižších koncentracích MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> (25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml) dochází u grampozitivních bakterií k mírné stimulaci růstu způsobené přítomností testovaného MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>. Při koncentracích od 100  $\mu$ g/ml lze říci, že dochází k postupné inhibici růstu.

K podobným závěrům dospěli i autoři Altieri et al. [27], kteří studovali antimikrobní účinky kyseliny laurové. Zjistili, že různé koncentrace těžé látky mohou v určité fázi růstu inhibovat nebo stimulovat růst bakterií. Tento jev vysvětlovali pravděpodobnou zvýšenou propustností membrán a rychlejší výměnou živin mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky.

Dále byly dle vzorce (vzorec 4) vypočítány indexy růstu a sestrojeny grafy vlivu různých koncentrací 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové (MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>) na průběh růstové křivky testovaných bakterií.

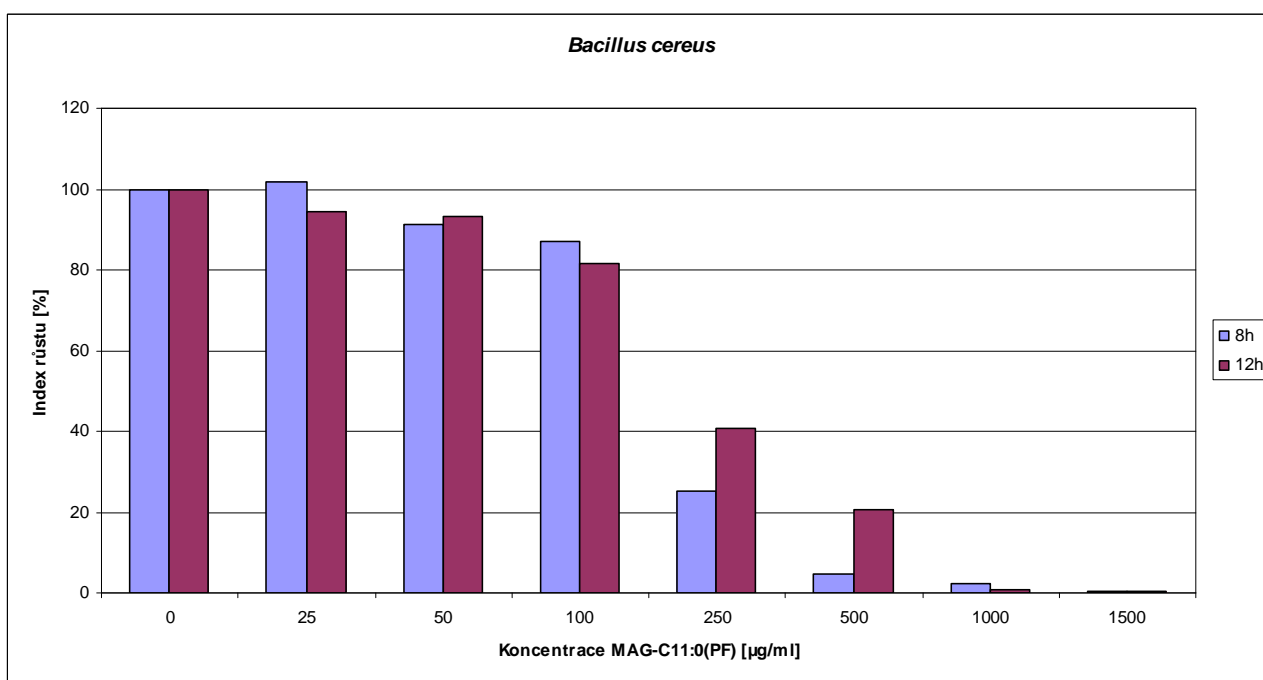


Obr.17 Vliv MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) na růst grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis*

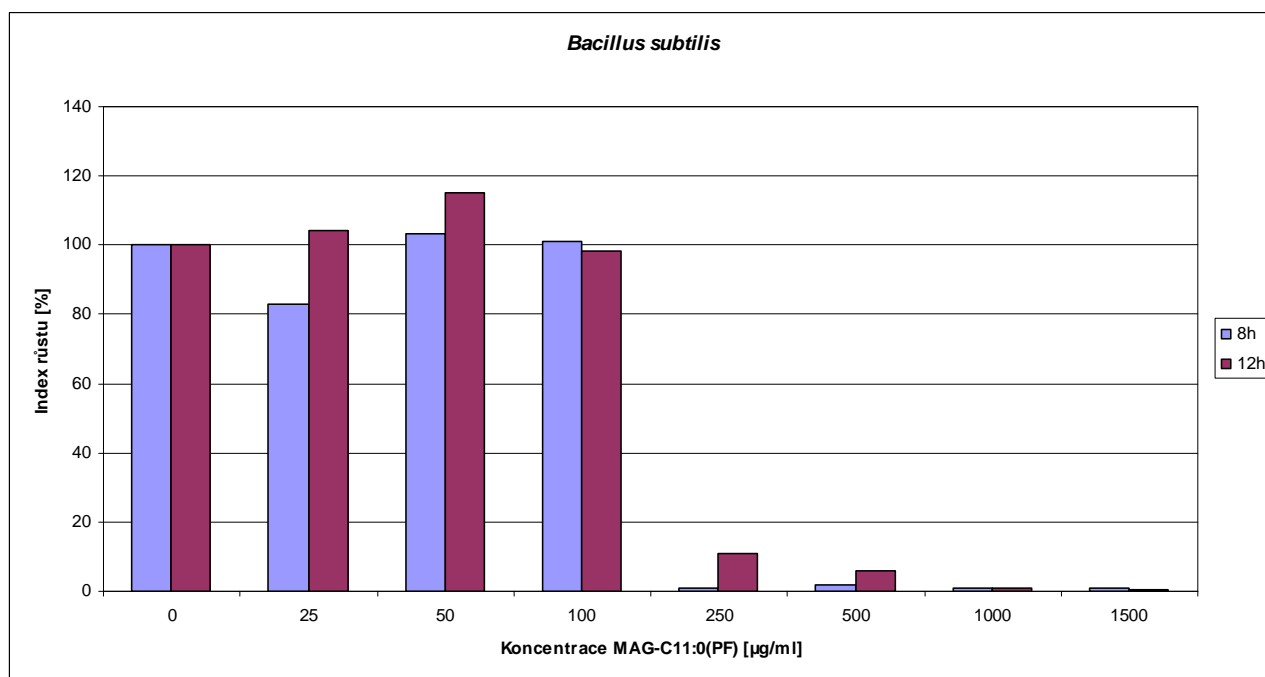


Obr.18 Vliv MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) na růst gramnegativní bakterie *Escherichia coli*

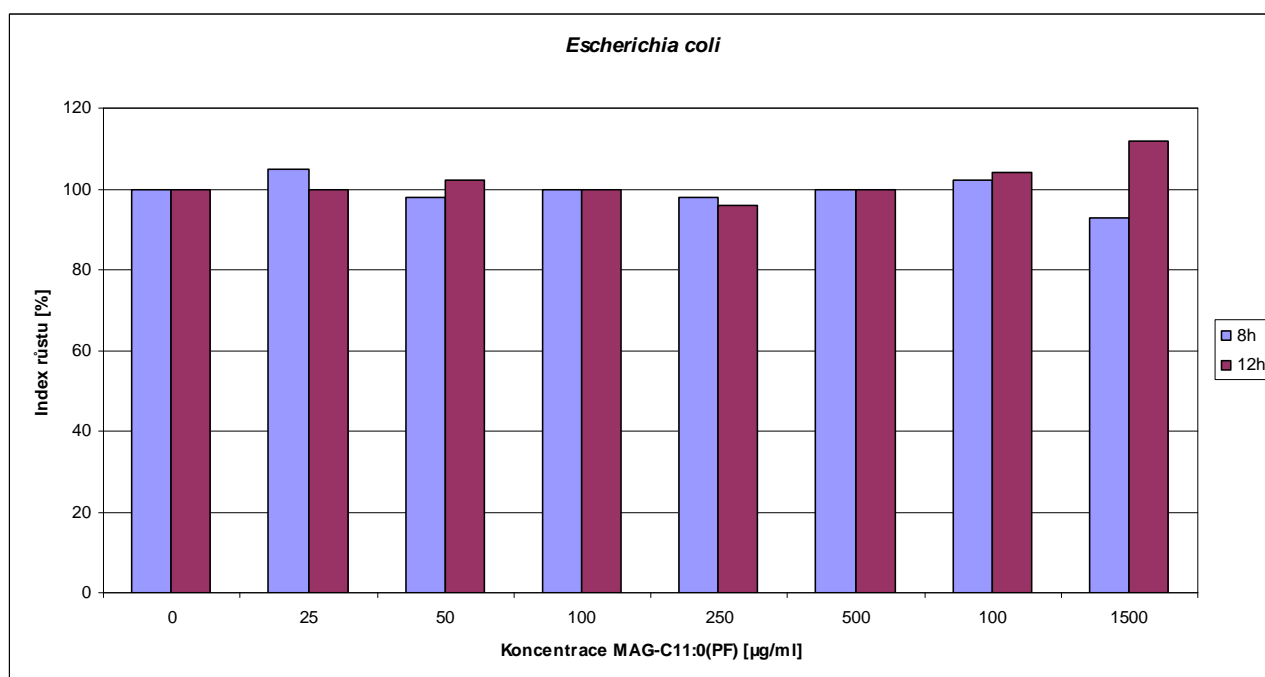
Vlivy koncentrací MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> na růst dalších gram pozitivních i gram negativních bakterií je znázorněn v grafech v příloze (PŘÍLOHA P I). Na obrázku (obr.19, 20) můžeme vidět závislost indexu růstu na koncentraci MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>. U 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové lze pozorovat zvyšující se inhibiční účinek na gram pozitivní bakterie se zvyšující se koncentrací 1-monoacylglycerolu. Při koncentraci 1000 µg/ml a 1500 µg/ml je u všech gram pozitivních bakterií patrný výrazný inhibiční účinek MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>. Nejvíce MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> působil na *Bacillus subtilis* (obr. 20), růst této bakterie byl výrazně potlačen již koncentrací 250 µg/ml.

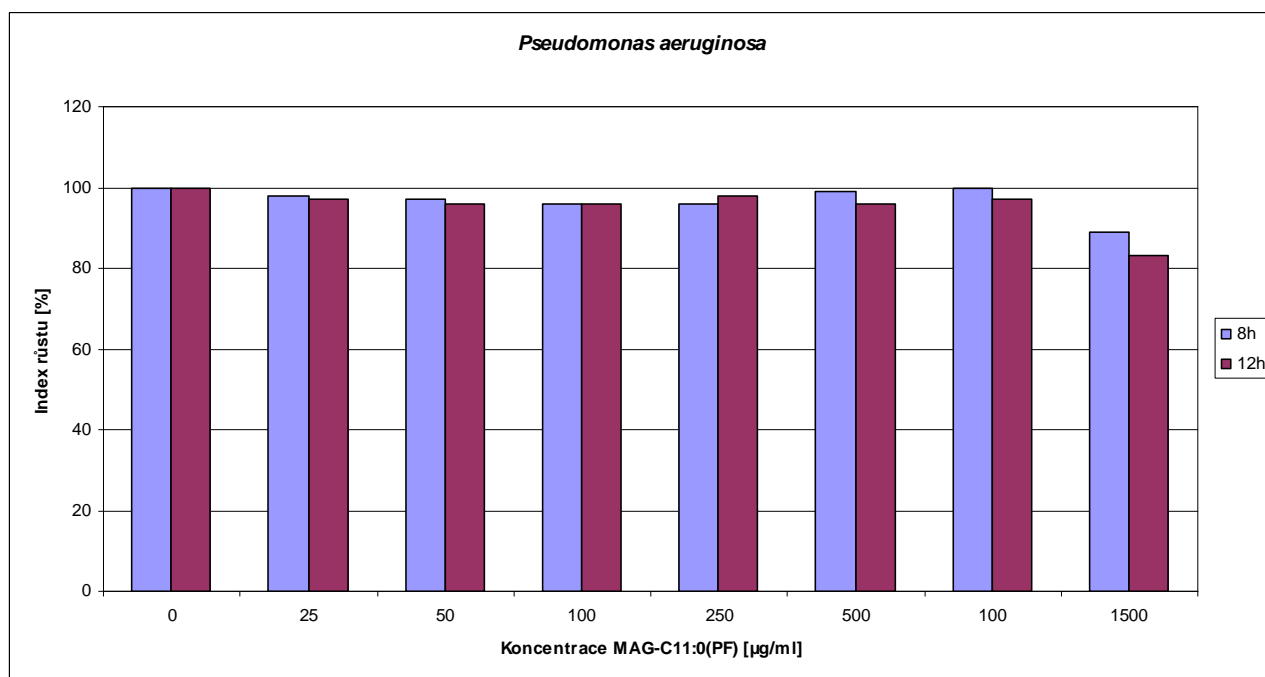


Obr.19 Vliv MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> na růst bakterie *Bacillus cereus*

Obr.20 Vliv MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) na růst bakterie *Bacillus subtilis*

U gramnegativních bakterií (PŘÍLOHA P I) na obrázku (obr.21, 22) je znázorněna závislost indexu růstu bakterií na koncentraci MAG-C<sub>11:0</sub>(PF). U testovaného MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) však nelze prokázat inhibiční účinek. K podobným výsledkům dospěli i jiní autoři [23, 25, 40]. Pravděpodobně je to způsobeno rozdíly ve stavbě buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií.

Obr.21 Vliv MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) na růst bakterie *Escherichia coli*



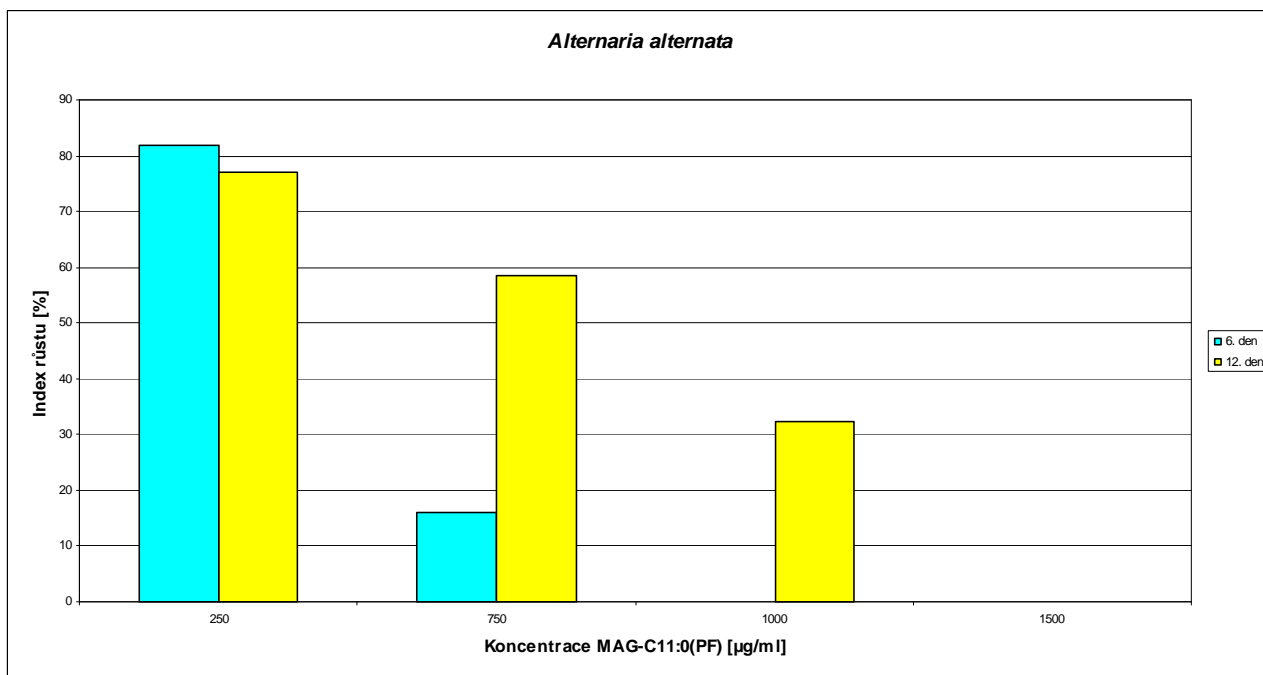
Obr.22 Vliv MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> na růst bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

#### 4.4.6 Antimikrobní účinky 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové na pevné půdě

Do agaru s přidavkem 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové v různých koncentracích byly naočkovány kultury plísní. Graficky je znázorněna závislost indexu růstu plísní na koncentraci MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> (obr.23-26). Průběh růstu plísní můžeme vidět také na fotografiích v přílohách (PŘÍLOHA P II-V).

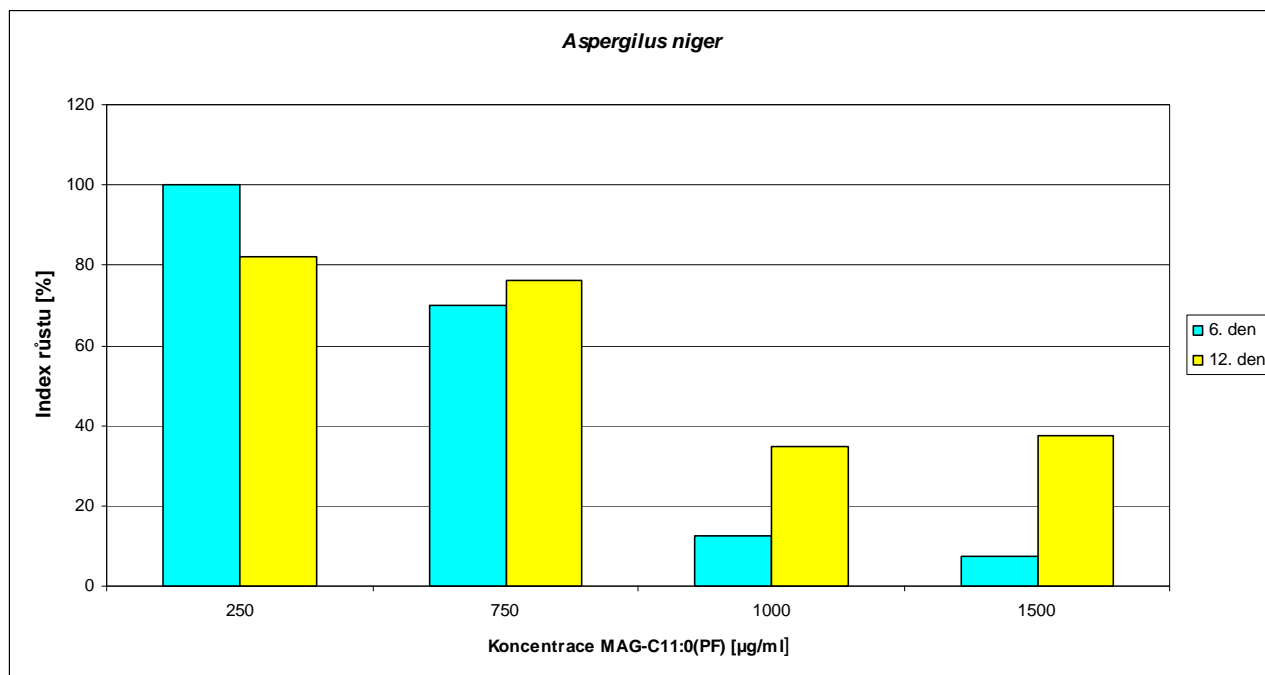
U všech druhů testovaný plísní bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové byl zaznamenán snižující se index růstu.

U plísní *Alternaria alternata* byl zaznamenán výrazný inhibiční účinek koncentrace 1000 µg/ml MAG-C<sub>11:0(PF)</sub>. Tato koncentrace vedla ke značnému zpomalení růstu a prodloužení doby lag-fáze. Zatímco u kontrolní kultury *A. alternata* byl zaznamenán růst už po 48 hod kultivace, na miskách s koncentrací MAG 1000 µg/ml byly kolonie viditelné až po 9 dnech kultivace. (Viz PŘÍLOHA P II a obr. 23) Při koncentraci 1000 µg/ml a 1500 µg/ml je od 12 dne patrná kontaminace.

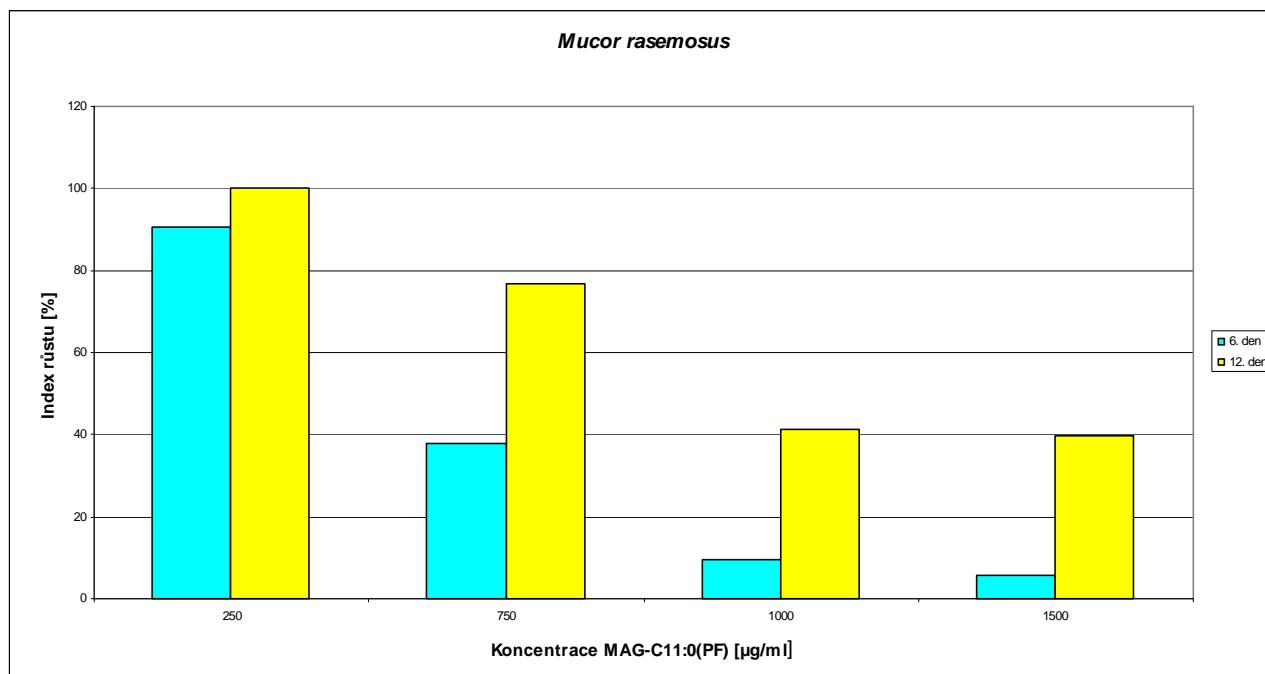


Obr.23 Vliv MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> na růst plísně *Alternaria alternata*

Plíseň *Aspergillus niger* je problematická, protože tvoří velké množství spor a jen velmi těžko lze všechny naočkovat do jednoho vpichu. I přes kontaminaci v okolí vpichů na Petriho miskách lze říci, že koncentrace 1000 µg/ml účinně zpomaluje růst. Dokonce byl účinek této koncentrace výraznější než působení MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> v nejvyšší testované koncentraci 1500 µg/ml. Podobně jako u bakterií i u plísní se zdá, že inhibiční účinek testovaného MAG-C<sub>11:0(PF)</sub> je závislý na koncentraci látky v médiu (Altieri et al. [27]) a stejná látka může působit stimulačně nebo inhibičně. (Viz PŘÍLOHA P III a obr. 24)

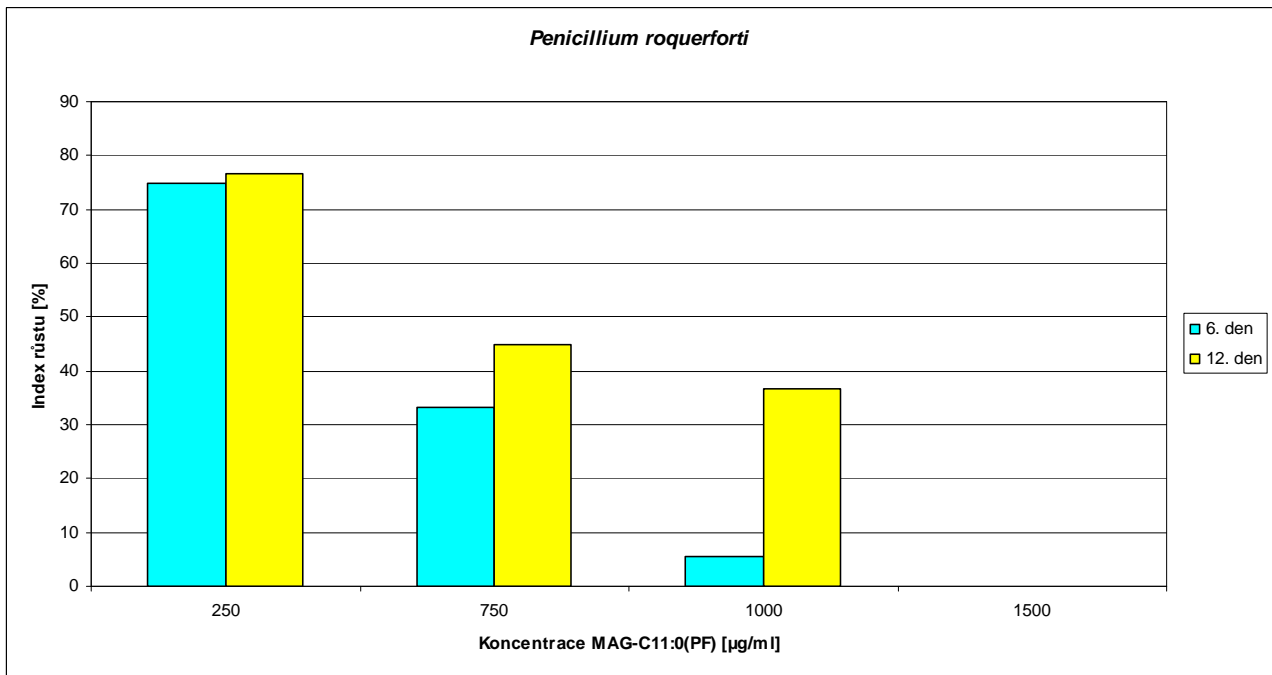
Obr.24 Vliv MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) na růst plísně *Aspergillus niger*

*Mucor ramosus* byl výrazně inhibován již při koncentraci 750  $\mu\text{g/ml}$ . Při této koncentraci byl růst patrný již 6. den, ale projevy byly omezeny až do 9. dne. (Viz PŘÍLOHA P IV a obr. 25)

Obr.25 Vliv MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) na růst plísně *Mucor ramosus*

U *Penicillium roquerforti* byl zaznamenán výrazný inhibiční účinek u koncentrace 1000  $\mu\text{g/ml}$ , přičemž první známky růstu jsou patrné už u 6. dne kultivace. (Viz PŘÍLOHA P V a obr. 26)





Obr.26 Vliv MAG-C<sub>11:0</sub>(PF) na růst plísňe *Penicillium roquerforti*

## ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na výrobu 1-monoacylglycerolu z kyseliny perfluoroundekanové. Tento 1-monoacylglycerol byl vyroben adicí MK na glycidol nukleofilním otevřením epoxidového kruhu za použití katalyzátoru Chromium(III) acetát hydroxidu. Analýza vyrobeného produktu byla provedena pomocí TLC a HPLC.

- Nejvyšší konverze bylo dosaženo za reakčních podmínek: teplota 97,5 °C, 0,5 % hm. katalyzátoru, poměr reaktantů 1:2. Hodnota konverze vyšla 88 %.
- Po purifikaci rekrystalizací v ethanolu byla výsledná konverze na 90 %.
- Pomocí TLC a HPLC analýzy byl prokázán vznik 1-monoacylglycerolu a menšího množství neidentifikovaných látek.

Vyrobený produkt byl testován na antimikrobní aktivitu vůči vybraným druhům potravinářsky významných bakterií a plísní. Byly vybrány druhy způsobující kažení a sníženou jakost potravin či alimentární onemocnění. Testování antimikrobních vlastností 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové vůči bakteriím bylo provedeno na mikrotitračních destičkách, hodnoceny byly jako změna optické denzity suspenze buněk pomocí programu Microplate manager. Testování plísní bylo provedeno na Petriho miskách s přidavkem různých koncentrací 1-monoacylglycerolu do živné půdy.

- U grampozitivních bakterií byl pozorován inhibiční účinek již od koncentrace 25 µg/ml. Výrazný účinek byl u koncentrací 1000 µg/ml a 1500 µg/ml. Nejvíce 1-monoacylglycerol kyseliny perfluoroundekanové účinkoval na bakterii *Bacillus subtilis* (obr. 20), nejodolnějším grampozitivním druhem byl *Staphylococcus aureus*. (PŘÍLOHA I)
- Účinek vyrobeného produktu na gramnegativní bakterie nebyl prokázán. (PŘÍLOHA I)
- U plísní byl zaznamenán zvyšující se inhibiční účinek 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové se stoupající koncentrací testované látky. Lze říci, že výrazné inhibice růstů testovaných plísní lze dosáhnout použitím koncentrace 1000 µg/ml (PŘÍLOHA II – V).

Vzhledem k tomu, že byla veškerá kyselina perfluoroundekanová spotřebována pro výrobu 1-monoacylglycerolu nebylo již možno ji otestovat na antimikrobní účinky. Doporučila bych v dalším výzkumu podrobit testům na antimikrobiální aktivitu samotnou kyselinu perfluoroundekanovou a porovnat ji s monoacylglycerolem kyseliny perfluoroundekanové.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] FROMME, H., TITTEMIER, S. A. , VÖLKEL., W., et al., Perfluorinated compounds-- Exposure assessment for the general population in western countries, *International Journal of Hygiene and Environmental Health.*, May 2009, s. 239–270, PMID: 18565792
- [2] HÁJAKOVÁ, K., TOMANIOVÁ, M., HAJSKLOVÁ, J., Perfluorované perzistentní kontaminanty v potravních řetězcích, [online]. *Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí*, 2005, [cit.2010-03-18]. Dostupné z <<http://www.phytosanitary.org/old/projekty/2004/vvf-10-04.pdf>>.
- [3] MARIE, A., ALVES, S., FOURNIER, F., et al., Fluorinated matrix approach for the characterization of hydrophobic perfluoropolyethers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS, *Anal Chem.*, Mar 2003, PMID: 12659188
- [4] KAPLANEK, R., PALETA, O., Amphiphilic perfluoroalkylated sulfones and sulfonate betaines, *Journal of Fluorine Chemistry*, July 2007, s. 789–796
- [5] PITARRESI, G., PALUMBO P., A., CALABRESE R., et al., Fluorinated derivatives of a poly-aspartamide bearing polyethylene glycol chains as oxygen carriers, *Journal of Fluorine Chemistry*, November 2008, ISSN 0022-1139
- [6] DENISON, D., M., Artificial oxygen carriers, *Baillière's Clinical Anaesthesiology*, September 1988, s. 605-623
- [7] BÉNARD, F., AHMED, N., BEAUREGARD, JM., et al., [18F] Fluorinated estradiol derivatives for oestrogen receptor imaging: impact of substituents, formulation and specific activity on the bio-distribution in breast tumour-bearing mice, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, August 2008, s. 1473-1479
- [8] VYSKOČIL, F., *Umělé kyslíkové přenašeče jako alternativa k homologním krevním transfúzím*, [online], [cit.2010-03-18]. Dostupné z <<http://www.anamneza.cz/moduly/clanek.php3?id=565&sekce=36>>
- [9] DAFIK, L., D'ALARCAO, M., KUMAR, K., Fluorination of mammalian cell surfaces via the sialic acid biosynthetic pathway, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2008, s. 5945-5947
- [10] KENNETH, L., K., Fluorine in medicinal chemistry: Recent therapeutic applications of fluorinated small molecules, *Journal of Fluorine Chemistry*, August 2006, s. 1013-1029

- [11] SOBOLOVÁ, L., Ezetimib – první zástupce selektivních inhibitorů cholesterolové absorpce, *Klin Farmakol Farm*, 2005, [online], [cit.2010-03-18]. Dostupné z <<http://www.solen.cz/artkey/far-200501-0005.php>>
- [12] NYČ, O., URBÁŠKOVÁ, P., MAREŠOVÁ V., et al., Chinolony, *Subkomise pro antibiotickou politiku Komise pro lékovou politiku a kategorizaci léčiv ČLS JEP*, [online], [cit.2010-03-18]. Dostupné z <<http://www.cls.cz/dokumenty/chinolony.doc>>
- [13] Anonym, *Wikipedia: the free encyclopedia*, [online], [cit.2010-03-18]. Dostupné z <<http://en.wikipedia.org/wiki/Gemifloxacin>>
- [14] SLINTÁKOVÁ, L., *Chinolin-4-ony se známými biologickými účinky*, Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007
- [15] DOLEŽAL, T., Nová léčiva v roce 2002 – 1. část, září 2003, [online], [cit.2010-03-18]. Dostupné z <<http://www.remédia.cz/Clanky/Nova-leciva/Nova-leciva-v-roce-2002-1-cast/6-P-dU.magarticle.aspx>>
- [16] Farmakologický ústav 3. LF UK, *Linezolid se ukázal jako účinný proti rezistentní formě TBC*, Praha, květen 2003, [online], [cit.2010-03-18]. Dostupné z <<http://www.zdn.cz/clanek/linezolid-se-ukazal-jako-ucinny-proti-rezistentni-forme-tbc-154258>>
- [17] MASCARETTI, O. A., *Bacteria versus Antibacterial Agens*, ASM Press, 2003, ISBN: 978-1-55581-258-4
- [18] Ardeu Pharma, Fluconazol Ardez, 2007, [online], [cit.2010-03-18]. Dostupné z <[http://www.ardez.cz/pdf/pil/fluconazol\\_pil.pdf](http://www.ardez.cz/pdf/pil/fluconazol_pil.pdf)>
- [19] Anonym, Souhrn zprávy EPAR určený pro veřejnost, *European Medicines Agency*, [online], [cit.2010-03-18]. Dostupné z <<http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/vfend/404901cs1.pdf>>
- [20] DRAKESMITH, F., G., *Electrofluorination of Organic Compounds*, *Topics in Current Chemistry*, Berlin-Heidelberg, 1997.
- [21] CONTE, L., GAMBARETTO, G., P., *Electrochemical fluorination: state of the art and future tendencies.*, *Journal of Fluorine Chemistry*, February 2004, s. 139-144
- [22] *Wikipedia: the free encyclopedia*, [online], [cit.2010-03-18]. Dostupné z <[http://en.wikipedia.org/wiki/Electrochemical\\_fluorination](http://en.wikipedia.org/wiki/Electrochemical_fluorination)>

- [23] VELCLOVÁ, K., *Protimikrobní vlastnosti monoacylglycerolů*, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2002.
- [24] KULENDOVÁ, L., *Antimikrobiální účinky monoacylglycerolů*, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006.
- [25] SVOBODOVÁ, H., *Mikrobicidní vlastnosti netradičních monoacylglycerolů.*, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007.
- [26] RUŽIČKA, J., VELCLOVÁ, K., JANIŠ, R. et al., Antimicrobial effects of 1- monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids, *European Food Research and Technology*, 2003, s. 329-331.
- [27] ALTIERI, C., BEVILACQUA, A., CARDILLO D. et al.: Effectiveness of fatty acids and their monoglycerides against gram-negative pathogens, *International Journal of Food Science and Technology*, 2009, s. 359-366.
- [28] BERGSSON, G., STEINGRÍMSSON, Ó., THORMAR, H., In Vitro Susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* Fatty Acids and Monoglycerides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, s 2790-2792.
- [29] BERGSSON, G., ARNFINNSSON, J., STEINGRÍMSSON, Ó. et al., In Vitro Killing of *Candida albicans* by Fatty Acids and Monoglycerides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, s. 3209-3212
- [30] KREJČÍ, J., *Chemie a technologie tuků 1*, [online], [cit.2010-03-18], Dostupné z <<http://utb.cepac.cz/>>
- [31] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., *Potravinářská biochemie I.*, 1.vydání. ,Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005.
- [32] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 2*, Tábor: OSSIS, 1999.
- [33] KREJČÍ, J., *Chemie a technologie tuků 2*, [online], [cit.2010-03-18], Dostupné z <<http://utb.cepac.cz/>>
- [34] DAVÍDEK, J., et al., *Chemie potravin.*, Praha, SNTL, 1983.
- [35] WHITEHURST, R.J.: Emulsifiers in food technology, *Blackwell Publishing*, Northampton, 2004, ISBN 1-4051-1802-4
- [36] Anonym, *Glycidol*, [online], [cit.2010-03-18], Dostupné z <<http://www.chemicaland21.com/specialtychem/finechem/GLYCIDOL.htm>>

- [37] Occupational Safety and Health Guideline for Glycidol, *United States Department of Labor*, [online], [cit.2010-03-18], Dostupné z <<http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/glycidol/recognition.html>>
- [38] SCHOVAJSOVÁ, M., *Využití ionexů pro odstranění reziduí chromitých katalyzátorů z 1-monoacylglycerolů*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006
- [39] NAVRÁTILOVÁ, L., *Příprava esterů adiční reakcí karboxylových kyselin se epoxidy*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2004
- [40] BUŇKOVÁ, L., *Účinky přídatných látek používaných v potravinářství a kosmetice na růst vybraných bakterií*, Rigorózní práce, Masarykova univerzita v Brně, 2008
- [41] Anonym, *Chromatografie* [online]. [2010-03-15]. Dostupné z <[http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy\\_B/chromatografie.doc](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc)>
- [42] Anonym, *Chromatografie* [online]. [2010-03-15]. Dostupné z <[http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom\\_teorie.htm](http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_teorie.htm)>
- [43] GASPARIČ, J. a kolektiv. *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin*. 1. vydání, Nakladatelství technické literatury, Praha, 1981, ISBN 04 –613 – 81
- [44] LIN, J. T., MCKEON, T. A., *HPLC of Acyl Lipids*, *HNB Publishing*, New York, 2005, ISBN 0-9728061-1-3
- [45] VOTAVA, M., *Lékařská mikrobiologie obecná*, *Neptun*, 2005, ISBN 80-86850-00-5
- [46] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, *Victotia publishing*, 1995, ISBN 80-85605-71-6
- [47] BARTOŠOVÁ, L., HANULÍKOVÁ, A., *Mikrobiální původci alimentárních onemocnění*, [online]. [2010-04-17]. Dostupné z <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000167&nid=11325&chnum=6>>
- [48] NĚMEC, M., TVRZOVÁ, L., PÁČOVÁ, Z., *Miniatlas mikroorganismů*, [online]. [2010-04-17], Dostupné z <<http://elanor.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/micr.htm>>
- [49] SCHINDLER, J., *Mikrobiologie pro studenty zdravotních oborů*, *Grada Publishing*, 2010 ISBN 978-80-247-3170-4

- [50] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J., *Houby, Fungi, Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník* [online]. [2010-04-17]. Dostupné z <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-006/ebook.html?p=H007](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=H007)>
- [51] LESLIE, J.F., BANDYOPADHYAY, R., VISCONTI, A.: *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade. CAB International, Wallingford, UK, 2008, 476 stran. ISBN-13: 978 1 84593 082 0*
- [52] Anonym, *Informační centrum bezpečnosti potravin, ÚZPI Praha*, [online]. [2010-04-17]. Dostupné z <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76672>>
- [53] KOBÁTOVÁ, A., *Mini atlas mikroorganismů*, [online]. [2010-04-17]. Dostupné z <<http://elanor.sci.muni.cz/mikrob/Mini atlas/micr.htm>>
- [54] BOBÁLOVÁ, J.: *Studium možnosti syntézy monoacylglycerolů z glycidolu za katalýzy Cr(III) komplexů*, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2001.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CCM	Czech Colletction of Mircroorganismus
EFC	Elektrochemická fluorizace
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie/vysokoúčinná kapalinová chromatografie
hm.	hmotnostní
MAG	monoacylglycerol
MK	mastné kyseliny
MPB	masopeptonový bujon
OD	optická denzita
MAG-C <sub>11:0</sub> (PF)	1-monoacylglycerol kyseliny perfluoroundekanové
R <sub>F</sub>	retardační faktor
ssp.	Subspecies neboli poddruh
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	spektrofotometrický detektor
hm.	hmotnostní
V/O	Emulze voda v oleji



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr.1 Respiridon.....	14
Obr.2 Cerivastatin .....	15
Obr.3 Ezetimib.....	15
Obr.4 Gemifloxacin .....	16
Obr.5 Linelozid .....	16
Obr.6 Fluconazol.....	17
Obr.7 Reakce Simonsova procesu .....	18
Obr.8 Schéma telomerace .....	19
Obr.9 Glycerol.....	21
Obr.10 Adice mastných kyseliny na glycidol.....	23
Obr.11 Schématický náčrt kapalínového chromatografu.....	26
Obr.12 Ukázka chromatogramu. ....	27
Obr.13 Růstová křivka .....	31
Obr.14 Výroba 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové .....	46
Obr.15 TLC chromatogram.....	47
Obr.16 Chromatogram glycidolu, kyseliny perfluoroundekanové, 1-monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové.....	49
Obr.17 Vliv MAG-C <sub>11:0(PF)</sub> na růst grampozitivní bakterie <i>Bacillus subtilis</i> .....	50
Obr.18 Vliv MAG-C <sub>11:0(PF)</sub> na růst gramnegativní bakterie <i>Escherichia coli</i> .....	50
Obr.19 Vliv MAG-C <sub>11:0(PF)</sub> na růst bakterie <i>Bacillus cereus</i> .....	51
Obr.20 Vliv MAG-C <sub>11:0(PF)</sub> na růst bakterie <i>Bacillus subtilis</i> .....	52
Obr.21 Vliv MAG-C <sub>11:0(PF)</sub> na růst bakterie <i>Escherichia coli</i> .....	52
Obr.22 Vliv MAG-C <sub>11:0(PF)</sub> na růst bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	53
Obr.23 Vliv MAG-C <sub>11:0(PF)</sub> na růst plísně <i>Alternaria alternata</i> .....	54
Obr.24 Vliv MAG-C <sub>11:0(PF)</sub> na růst plísně <i>Aspergillus niger</i> .....	55
Obr.25 Vliv MAG-C <sub>11:0(PF)</sub> na růst plísně <i>Mucor rasemosus</i> .....	55
Obr.26 Vliv MAG-C <sub>11:0(PF)</sub> na růst plísně <i>Penicillium roquerforti</i> .....	56

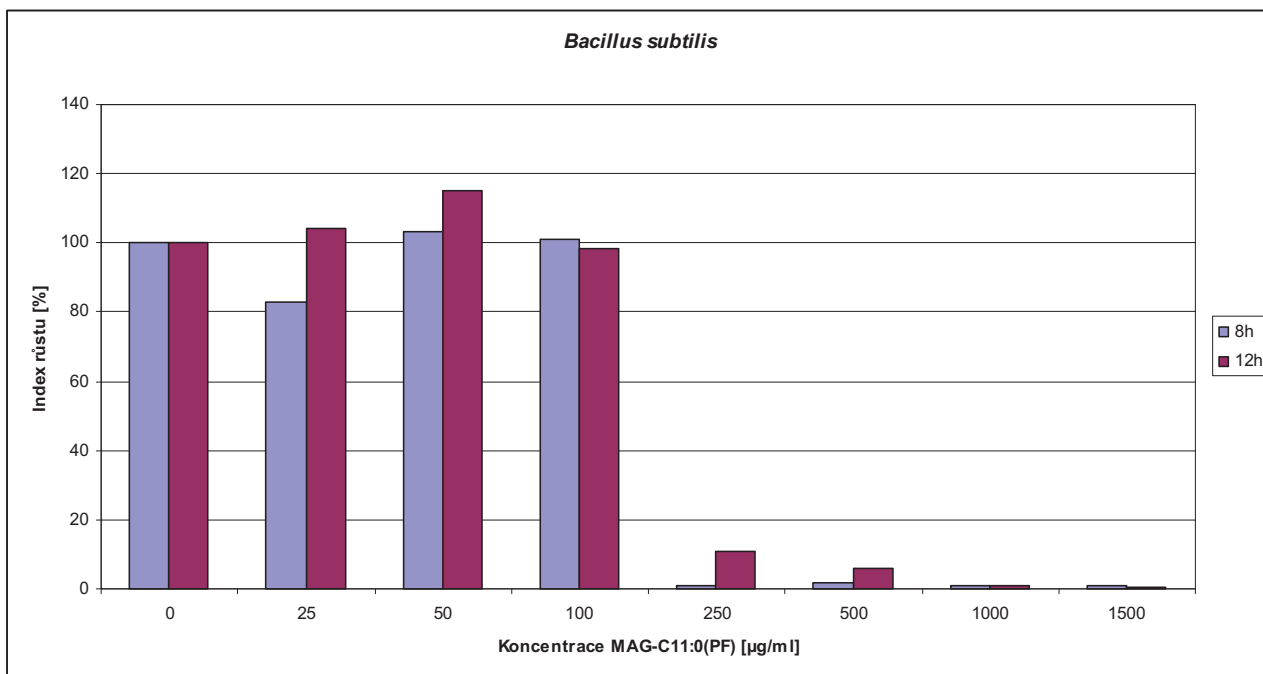
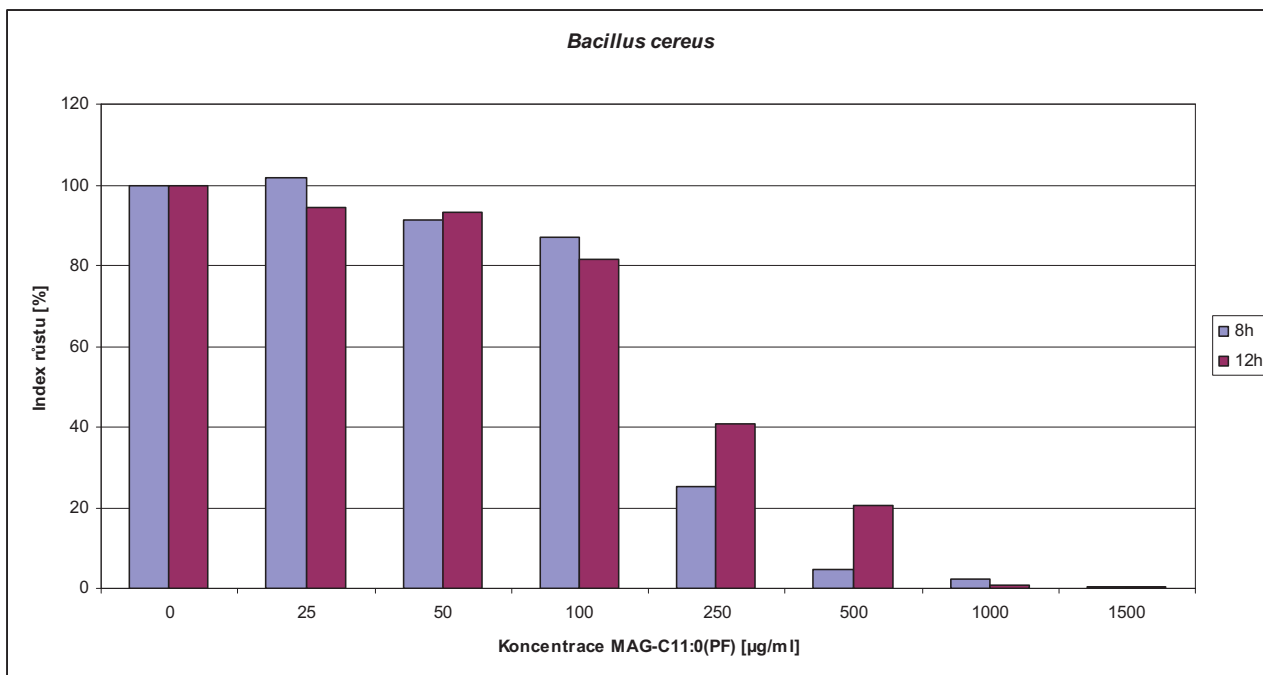
## SEZNAM TABULEK

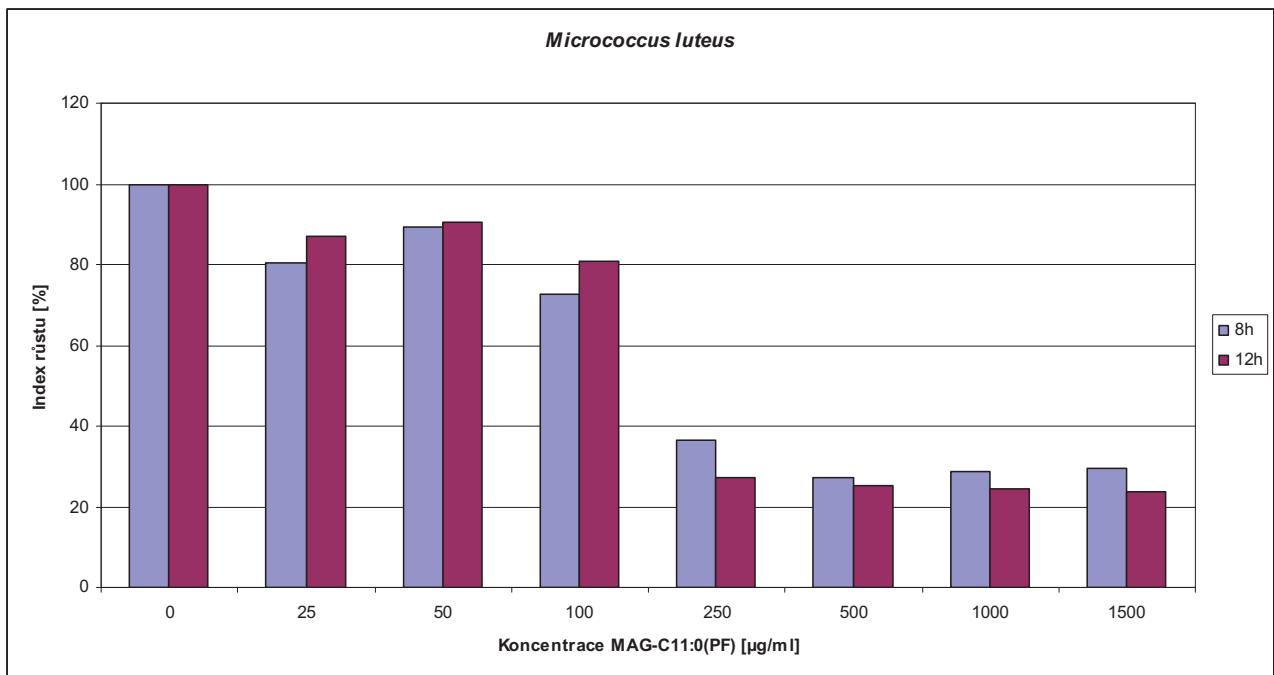
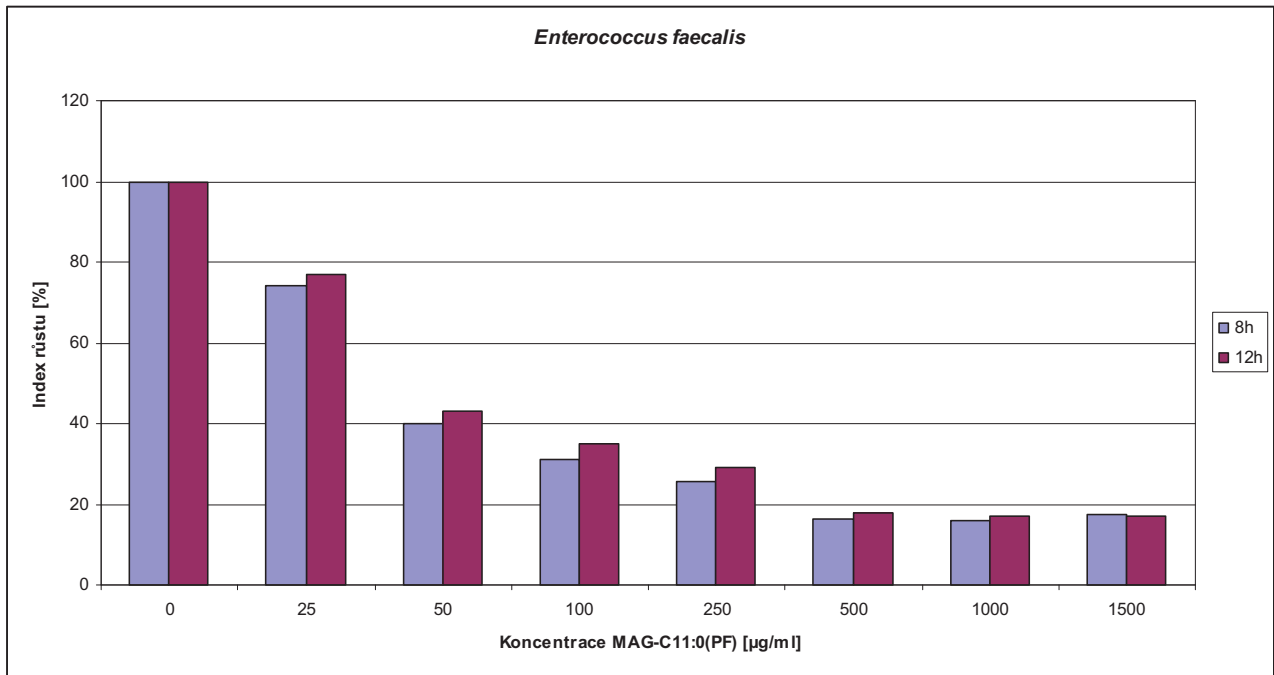
Tab.1 Emulgátory s monoacylglycerolových a diacylglycerolových směsí .....	24
--	----

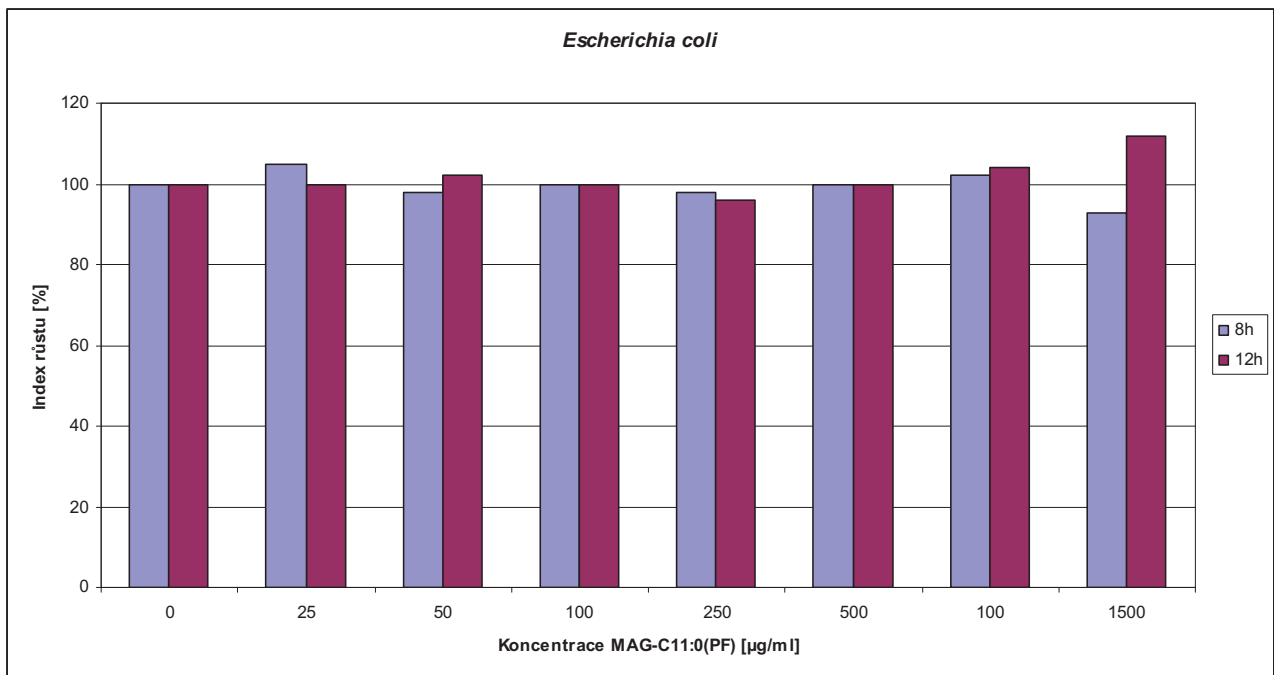
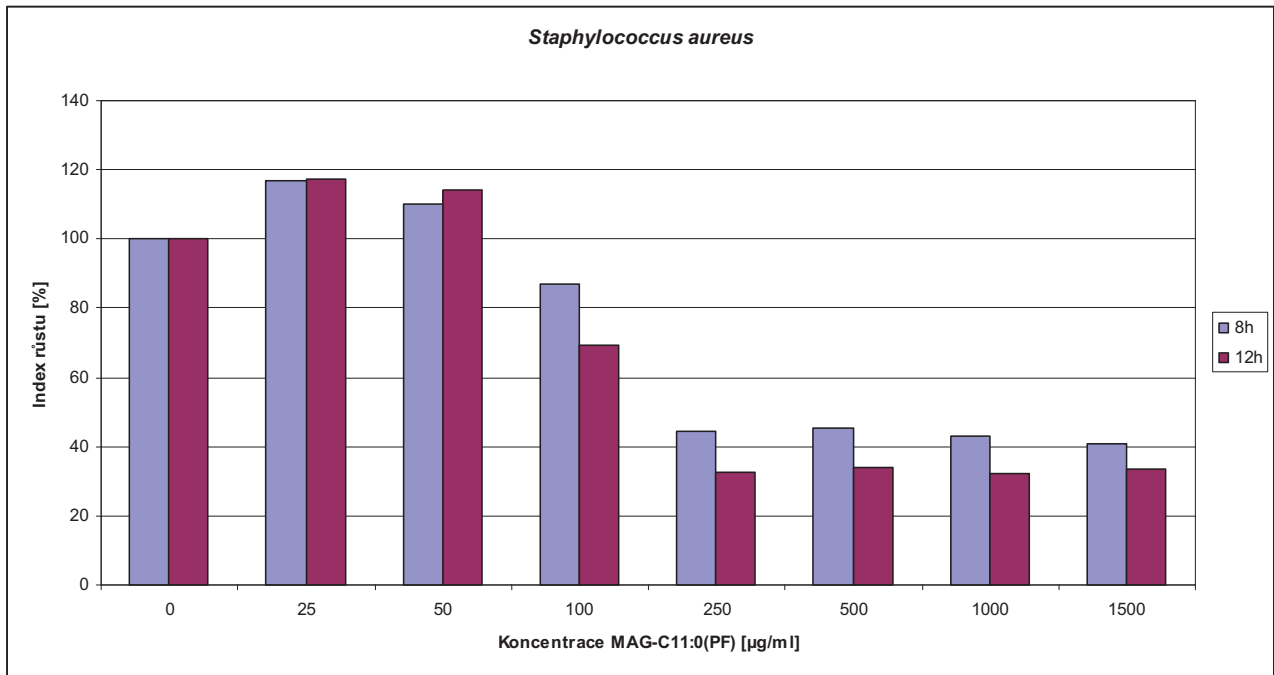
**SEZNAM PŘÍLOH**

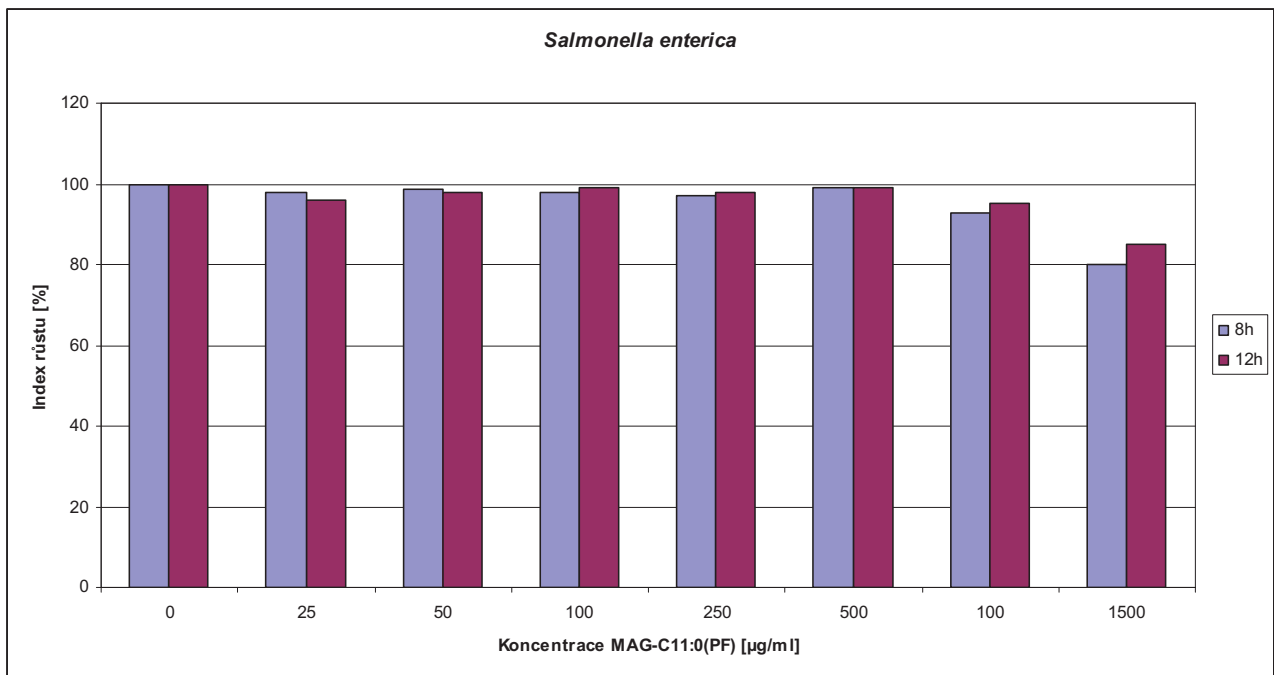
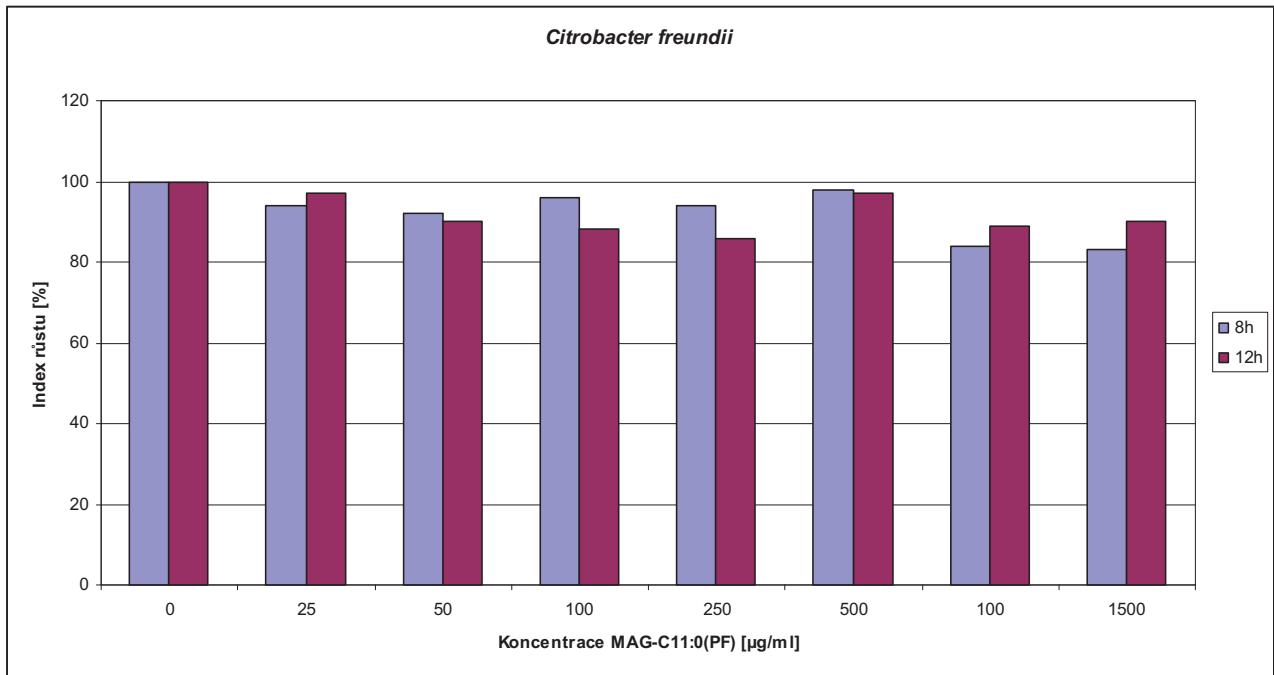
- P I Antimikrobní účinky monoacylglycerolu kyseliny perfluoroundekanové v bujónu
- P II Fotografie *Alternaria alternata*
- P III Fotografie *Aspergillus niger*
- P IV Fotografie *Mucor rasemosus*
- P V Fotografie *Penicillium roquerforti*

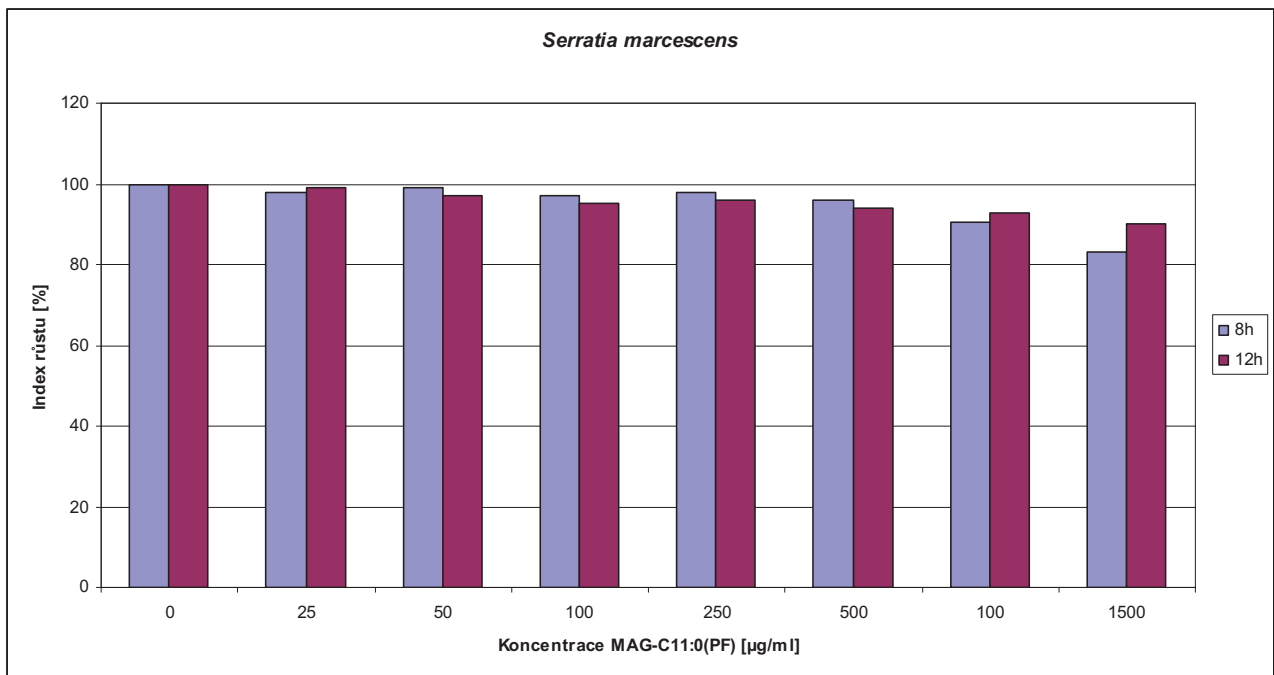
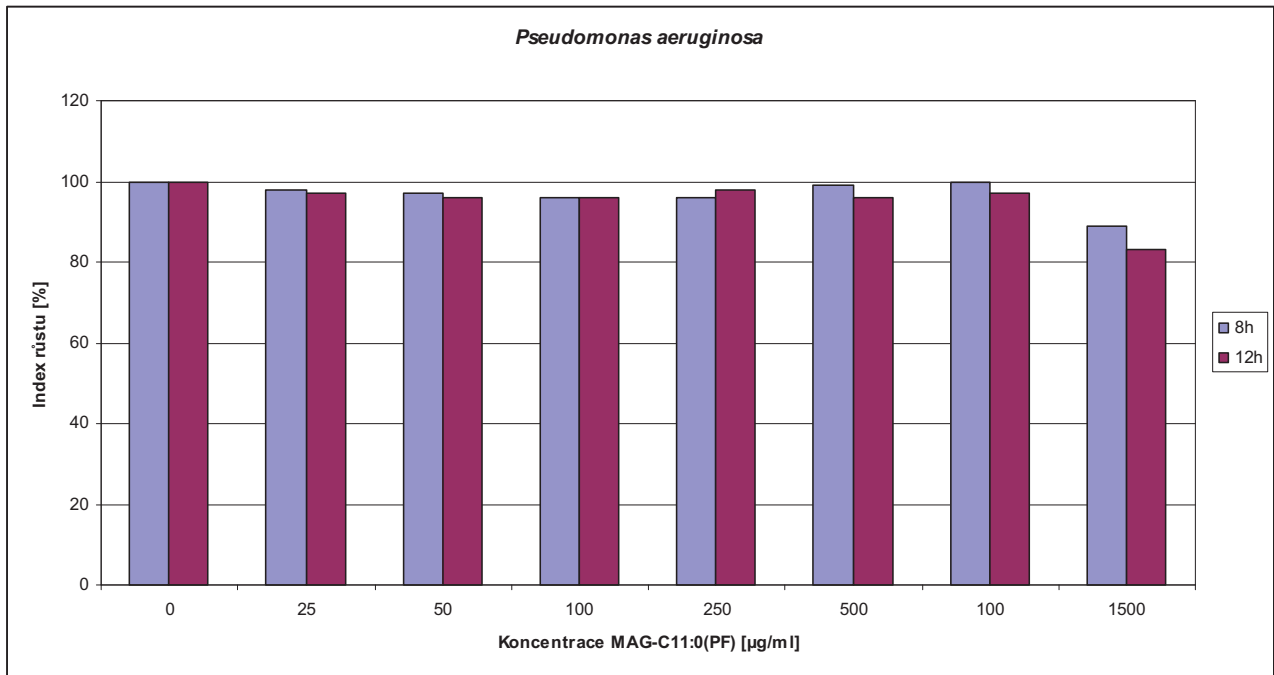
**PŘÍLOHA P I: ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLU KYSELINY  
PERFLUOROUNDEKANOVÉ V BUJÓNĚ**























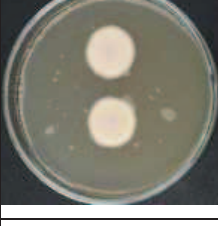


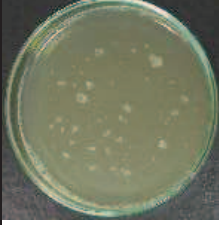
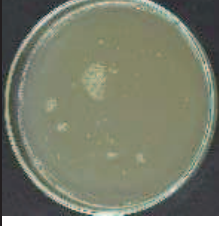
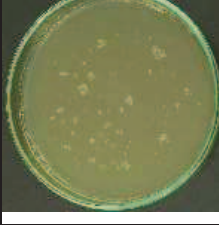




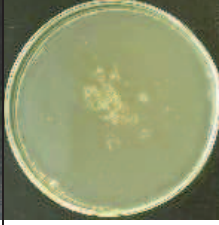
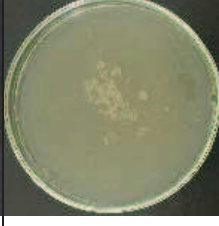
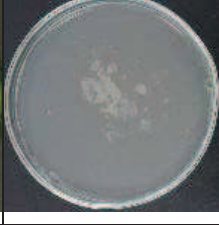

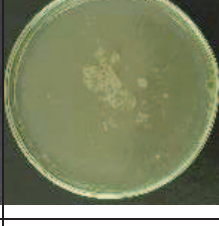

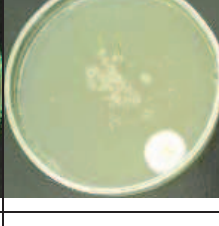







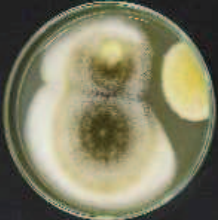
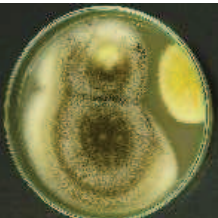




















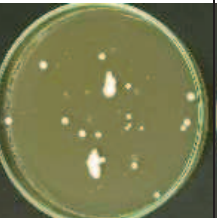









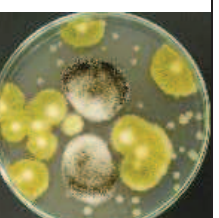
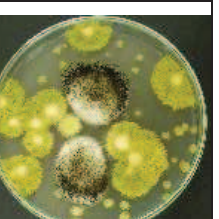


PŘÍLOHA P II: *Alternaria alternata*

	3. den	6. den	7. den	8. den	9. den	12. den	13. den
Kontrola							
250µg/ml							
750µg/ml							
1000µg/ml							
1500µg/ml							



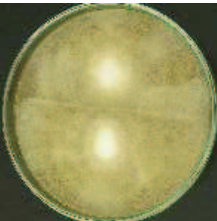






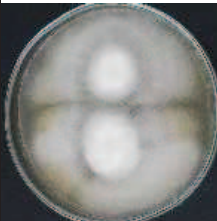





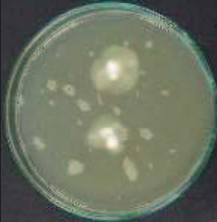
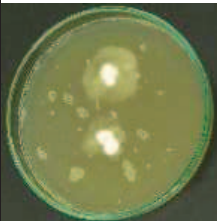
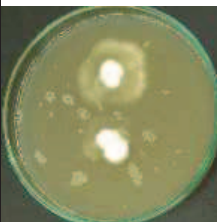
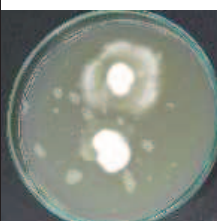

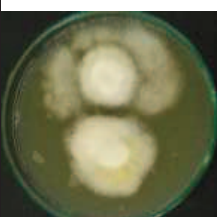


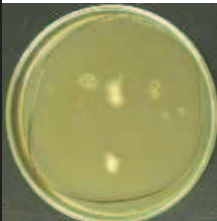




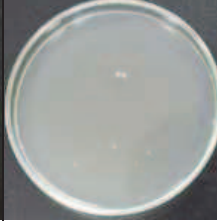
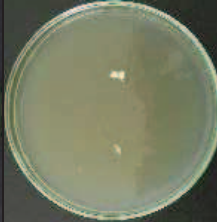
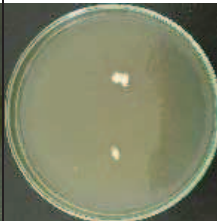






PŘÍLOHA P III: *Aspergillus niger*













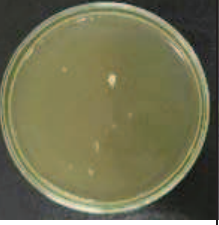



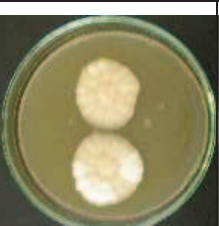
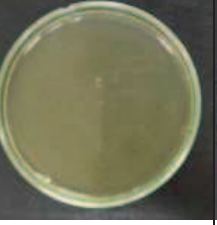

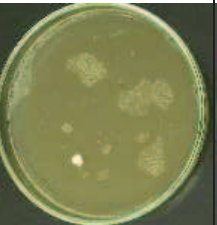


	3. den	6. den	7. den	8. den	9. den	12. den	13. den
Kontrola							
250µg/ml							
750µg/ml							
1000µg/ml							
1500µg/ml							



PŘÍLOHA P IV: *Mucor ramososus*

	3. den	6. den	7. den	8. den	9. den	12. den	13. den
Kontrola							
250µg/ml							
750µg/ml							
1000µg/ml							
1500µg/ml							

PŘÍLOHA P V: *Penicillium roquerforti*

	3. den	6. den	7. den	8. den	9. den	12. den	13. den
Kontrola							
250µg/ml							
750µg/ml							
1000µg/ml							
1500µg/ml	