

Univerzita Pardubice
Fakulta Chemicko-technologická

Přirozená barviva – dusíkaté heterocyklické sloučeniny
Daniela Cyrmonová

Bakalářská práce
2018

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Natural dyes – Nitrogen heterocyclic compounds
Daniela Cyrmonová

Bachelor thesis
2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Daniela Cyrmonová**
Osobní číslo: **C14246**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Přirozená barviva - dusíkaté heterocyklické sloučeniny**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se přirozených barviv.
2. Popsat rozdělení dusíkatých heterocyklických sloučenin podle jejich struktury, uvést charakteristiku jednotlivých skupin dusíkatých heterocyklických sloučenin.
3. V další části se zaměřit na možnosti stanovení přirozených barviv.
4. Krátce popsat vybrané choroby spojené s poruchou metabolismu přirozených barviv.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

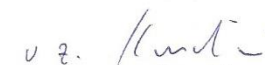
Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 6. 2018

Daniela Cyrmonová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat mé vedoucí bakalářské práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost a dobré rady při zpracovávání této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Tomáši Heringovi za pomoc při formátování této práce.

Anotace

Tato bakalářská práce se věnuje tématu Přírozená barviva – dusíkaté heterocyklické sloučeniny. V práci je uvedeno rozdělení dusíkatých heterocyklických sloučenin podle jejich struktury, charakterizace jednotlivých skupin dusíkatých heterocyklických sloučenin, možnosti stanovení a krátký popis chorob spojených s poruchami metabolismu těchto barviv.

Klíčová slova

přírozená barviva, dusíkaté heterocyklické sloučeniny, tetrapyrrolová barviva, indolová barviva

Title

Natural dyes – Nitrogen heterocyclic compounds

Annotation

This bachelor thesis is devoted to the topic of natural dyes, namely nitrogen heterocyclic compounds. This work is comprised of the following: the division of nitrogen heterocyclic compounds according to their structure, the individual group characterisation of these compounds, the possibility of determination and short description of the diseases associated with impaired metabolism of these dyes.

Keywords

Natural dyes, nitrogen heterocyclic compounds, tetrapyrrol dyes, indol dyes

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Základní struktura porfyrinových a billinových barviv	16
Obrázek 2 – Myoglobin	17
Obrázek 3 – Struktura hemoglobinu a hemu	18
Obrázek 4 – Biosyntéza hemu	20
Obrázek 5 – Degradace hemu na sterkobilinogen a urobilinogen	22
Obrázek 6 – Možné cesty degradace pomocí hemoxygenázy a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> deoxygenázy	22
Obrázek 7 – Degradace chlorofylu u vyšších rostlin	35
Obrázek 8 – Postup stanovení chlorofylu <i>a</i> extrahovaného horkým etanolem ze sinic a řas	37
Obrázek 9 – Struktura indolu	39
Obrázek 10 – Mechanismus Fischerovy syntézy indolu	40
Obrázek 11 – Indigo a antický purpur	41
Obrázek 12 – Obecná struktura betakyanů a betaxantinů	41
Obrázek 13 – Biosyntéza betalainů	45
Obrázek 14 – Degradace betaninu a další cesty degradace	46
Obrázek 15 – Strukturní vzorec izochinolinu	48
Obrázek 16 – Strukturní vzorec berberinu	48
Obrázek 17 – Strukturní vzorce purinu, guaninu, xantinu a kyseliny močové	49
Obrázek 18 – Strukturní vzorec pteridinu a pterinu	50
Obrázek 19 – Strukturní vzorce xantopterinu, leukopterinu, erythropterinu, biopterinu a sépiopterinu	50
Obrázek 20 – Strukturní vzorec izoalloxanzinu a riboflavinu	51
Obrázek 21 – Strukturní vzorec fenazinu, pyokyanu a jodinu	52
Obrázek 22 – Strukturní vzorec fenoxazinu	53
Obrázek 23 – Strukturní vzorec orceinu	53
Obrázek 24 – Strukturní vzorec erytrinu	54
Obrázek 25 – Strukturní vzorec xantommatinu	54

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Rozdělení hemolytických anémií	27
Tabulka 2 – Rozdělení postmikrozomálních konjugovaných hyperbilirubinemií.....	30

Seznam zkratek

AIP	akutní intermitentní porfyrie
ALAD	dehydratáza δ -aminolevulové kyseliny (δ -aminolevulinic acid dehydratase)
AuNPs	zlaté nanočástice (golden nanoparticles)
CoA	koenzym A (coenzyme A)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
HH	hereditární hemochromatóza
MIPs	molekulárně potisknuté polymery (molecular imprinted polymers)
NCCs	nefluoreskující chlorofylové katabolity (nonfluorescent chlorophyll catabolites)
OATP	transportéry ze skupiny transportních proteinů pro organické ionty (organic anion-transporting polypeptide)
PAO	Pheid a oxygenáza (Pheid a oxygenase)
PBG	porfobilinogen
pFCCs	primární fluorescenční chlorofylové katabolity (primary fluorescent chlorophyll catabolites)
Pheid a	feoforbid a (Pheoforbide a)
Phein a	feofytin a (Pheofytin a)
POR	protochlorofylidoxidáza
PPH	feofytináza (pheophytinase)
RCC	červený chlorofylový katabolit (red chlorophyll catabolite)
RCCR	RCC – reduktáza (red chlorophyll catabolite reductase)
RES	retikuloendoteliální systém
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
SiO ₂ NPs	křemičité nanočástice (siliceous nanoparticles)
UGT1A1	UDP-glukuronyltransferáza
δ -ALA	δ -aminolevulová kyselina (δ -aminolevulinic acid)

Obsah

Úvod.....	13
1 Barviva	14
1.1 Dělení barviv	14
2 Přírodní barviva	15
2.1 Dusíkaté heterocyklické sloučeniny.....	15
2.1.1 Tetrapyrrolová barviva	16
2.1.2 Hemová barviva.....	17
3 Nemoci spojené s poruchami v metabolismu hemu a bilirubinu	23
3.1 Anémie z nedostatku železa (sideropenická či hypochromní mikrocytární anémie).....	23
3.2 Hereditární hemochromatóza	23
3.3 Hemosideróza.....	24
3.4 Otravy olovem.....	24
3.5 Porfyrie.....	24
3.6 Ikterus (žloutenka)	25
3.7 Hyperbilirubinémie	25
4 Stanovení hemoglobinu a bilirubinu v krvi a moči	31
5 Chlorofyly a fykobiliny	33
5.1 Chlorofyly	33
6 Poruchy metabolismu chlorofylu	36
6.1 Stanovení koncentrace chlorofylu a	36
7 Indolová barviva	39
7.1 Indigo a bromindigo	40
7.2 Betalainy	41
7.2.1 Biosyntéza betalainů.....	42
7.2.2 Degradace betalainů	45
7.2.3 Extrakce, separace, identifikace a kvantifikace betalainů	46
8 Izochinoliny	48
9 Puriny	49
10 Pteriny.....	50
11 Flaviny (izoalloxaziny).....	51
12 Fenaziny	52
13 Fenoxaziny	53

Závěr	55
Bibliografie	56

Úvod

Tato práce se zabývá tématem Přírozená barviva – dusíkaté heterocyklické sloučeniny. Pojem heterocyklické sloučeniny znamená, že jednotlivé atomy uhlíku jsou mezi sebou spojeny do kruhu a je zde přítomen i jiný atom než uhlík, v tomto případě dusík.

Mezi tato barviva řadíme tetrapyrrolová, indolová, izochinolinová, purinová, pterinová, fenazinová, fenoxazinová a flavinová barviva. Ve své práci se důkladně zabývám jen tetrapyrrolovými a indolovými barvivy, protože to jsou dvě nejdůležitější skupiny z této velké rodiny.

Tetrapyrrolová barviva se dělí na dvě skupiny, a to na lineární a cyklické tetrapyrroly. Pod lineární tetrapyrroly patří bilirubiny a fykobilliny a mezi cyklické hemoglobiny a chlorofyly.

Hemoglobiny jsou krevními barvivy u člověka a savců, vyskytující se v krevních buňkách (erytrocytech). Hemoglobiny jsou degradovány na lineární bilirubiny a fykobilliny, které jsou zodpovědné za zbarvení stolice a moči. Chlorofyly jsou barvivy rostlinných pletiv vyskytující se ve specializovaných organelách těchto pletiv (chloroplastech). Rozdíl mezi chlorofylem a hemoglobinem je, že hemoglobin ve své struktuře obsahuje železitý kation, kdežto chlorofyl obsahuje hořečnatý kation.

Zástupci indolových barviv jsou indigo, bromindigo, antický purpur a betalainy. Indigo je barvivem pocházejícím z listů rostliny *Indigofera tinctoria*. Indigo se také získává kultivováním bakterie *Pseudomonas sp.* HOB₁. Bromindigo neboli antický purpur je fialové barvivo a derivát indiga, který má ve své struktuře dva bromy.

Betalainy jsou velkou a velmi významnou skupinou mezi indoly. Název je odvozen od anglického názvu červené řepy (Beetroot). Rozeznáváme žluté betaxantiny a červeno-fialové betakyany. Betalainy se vyskytují v rostlinách řádu Laskavcovitých a hvozdíkotvarých. Významnější jsou betakyany.

Některá barviva, jako betakyany, hemoglobiny a bilirubiny, působí jako antioxidanty. Také působí jako antikancerogeny, což jsou látky zabraňující buňkám v mutaci na nádorové buňky.

1 Barviva

Barviva neboli barevné látky či pigmenty jsou organické látky, které se vyskytují v buňkách organismů. Obsahují chromofor, který je základní strukturní jednotkou a nositelem barevnosti. Chromofor je část sloučeniny (skupina), která způsobuje absorpci světla v ultrafialové a viditelné oblasti světla. Barevnost je dána absorpcí specifické vlnové délky viditelného spektra světla danou látkou (Jirásek a Vavro, 2008; Pauk et al., 2007).

Látky nesoucí chromofory se nazývají chromogeny. Více chromoforů na jednom chromogenu způsobuje posun absorpce světla k vyšším vlnovým délkám, tzn. k infračervené oblasti (Jirásek a Vavro, 2008; Pauk et al., 2007).

1.1 Dělení barviv

Barviva dělíme dle vzniku a výskytu, struktury a způsobu použití.

- Dělení dle vzniku a výskytu:
 - přírodní barviva,
 - syntetická barviva identická s přírodními,
 - syntetická barviva.
- Dělení dle struktury:
 - azobarviva,
 - arylmethanová barviva,
 - antrachinonová barviva,
 - indigoidní barviva,
 - pyrrolová barviva,
 - sírná,
 - a další...
- Dělení dle způsobu použití:
 - přímá barviva,
 - mořidlová barviva,
 - barviva vyvíjená na vláknu (Jirásek a Vavro, 2008; Pauk et al., 2007).

2 Přírodní barviva

Jsou to barevné látky vyskytující se v živých buňkách. Jsou těmito buňkami syntetizovány a akumulovány či exkretovány do prostředí. Mezi přírodní barviva také řadíme barevné produkty získávané z přírodních surovin (karamel, sladový extrakt), měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů, anorganické pigmenty (uhlíčitan vápenatý, oxid železitý, oxid titaničitý...) a syntetická barviva identická s přírodními (Velíšek a Hajšlová, 2009; Pauk et al., 2007).

Přírodní barviva klasifikujeme podle struktury, výskytu v biologických materiálech či důležitých vlastností, jako je například rozpustnost ve vodě a v tucích. Podle struktury rozeznáváme tyto následující základní skupiny barviv:

- Dusíkaté heterocyklické sloučeniny, kam se řadí tetrapyrrolová barviva, indolová barviva, isochinolinová, purinová, pterinová, flavinová, fenazinová a fenoxazinová barviva.
- Kyslíkaté heterocyklické sloučeniny, kam se řadí množství fenolových sloučenin, zejména flavonoidy.
- Další fenoly a od nich odvozené chinony zahrnující kurkuminoidy.
- Terpenoidy, kam se řadí zejména tetraterpenové a od tetraterpenů odvozené pigmenty zvané karotenoidy, monoterpenové pigmenty jako jsou iridoidy a další (Velíšek a Hajšlová, 2009; Pauk et al., 2007).

2.1 Dusíkaté heterocyklické sloučeniny

Dusíkaté heterocyklické sloučeniny jsou skupinou sloučenin, které jsou uzavřeny do cyklu a ve svém cyklu kromě uhlíku obsahují i dusík a jiné prvky. Do této velké skupiny řadíme mnoho sloučenin. Jak je již napsáno v předchozím odstavci, patří sem deriváty patřící mezi přírodní barviva. Dále sem patří purin a jeho purinové báze, které jsou součástí DNA a RNA. Barviva z této skupiny mají většinou blahodárné účinky na lidský organismus, jelikož působí jako antioxidanty (Martins et al., 2015).

Antioxidanty jsou látky, které inhibují oxidaci v jiných molekulách. Oxidace je chemický proces neboli reakce, která může vést ke vzniku kyslíkových radikálů. Na oxidaci navazuje řada reakcí, které vedou k destrukci buněk. Antioxidanty na sebe tyto radikály vážou a ničí jejich aktivitu (Oroian a Escriche, 2015).

Mezi nejvýznamnější dusíkatá barviva řadíme tetrapyrrolová barviva (tetrapyrroly) a indolová barviva (Velíšek a Hajšlová, 2009).

2.1.1 Tetrapyrrolová barviva

Tetrapyrrolová barviva jsou barviva odvozená od cyklické sloučeniny pyrrolu. Pyrrol je pětičlenná heterocyklická sloučenina. Rozeznáváme dvě základní skupiny:

- cyklické porfyriny,
- lineární billiny (Roubal, 2001).

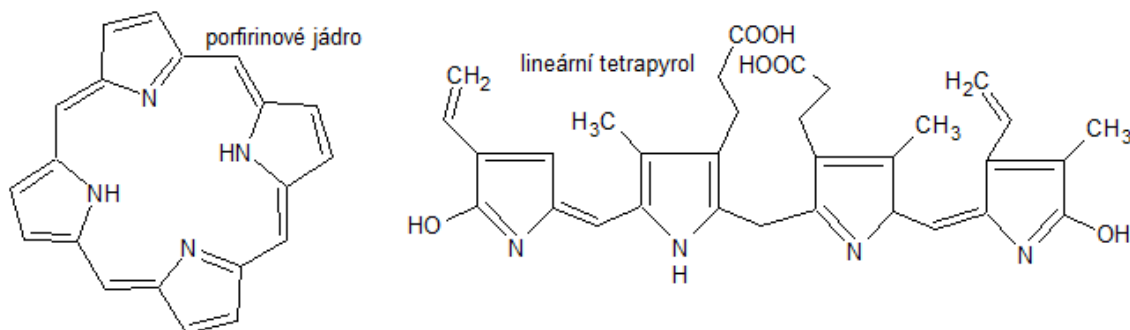
Cyklické porfyriny jsou tvořeny čtyřmi pyrroly spojenými v tetrapyrrolový kruh pomocí methinových můstků v poloze α pyrrolových struktur. Jsou to chromofory dvou základních skupin metaloproteinů:

- barviv živočišných tkání, která se nazývají hemová barviva,
- barviv rostlinných pletiv, některých řas a některých mikroorganismů, která se nazývají chlorofylová barviva neboli chlorofyly (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Lineární billiny vznikají převážně metabolickým rozkladem cyklických porfyrinů nebo jsou vytvářeny samostatně. Billiny klasifikujeme nejčastěji podle původu. Rozeznáváme:

- fykobilliny, které jsou pigmenty některých řas,
- žlučová barviva vznikající štěpením hemových barviv. Jsou to pigmenty moči a stolice savců (Roubal, 2001; Velíšek a Hajšlová, 2009).

Na obr. 1 jsou uvedeny strukturní vzorce porfyrinových a billinových barviv.



Obrázek 1 – Základní struktura porfyrinových a billinových barviv (Patočka a Jeřábková, 2013)

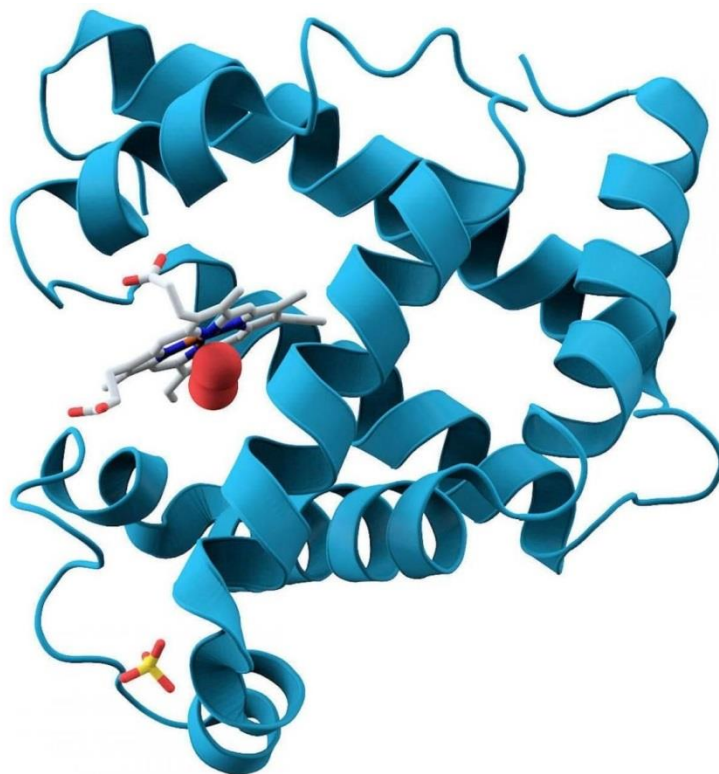
2.1.2 Hemová barviva

Hemová barviva jsou barviva živočišných tkání. Nejdůležitějšími metaloproteiny hemových barviv jsou:

- myoglobin,
- hemoglobin (Rosenthal a Glew, 2009).

Myoglobin je intracelulární protein, který získává kyslík z červených krevních buněk a uchovává ho do té doby, než bude kyslík potřeba pro různé oxidačně-redukční reakce a buněčné dýchání (Rosenthal a Glew, 2009).

Je to monomer skládající se z jedné molekuly globinu a hemu (obr. 2). Vyskytuje se v některých svalech, kde plní funkci hemoglobinu, jelikož může také přenášet kyslík. Ale může vázat pouze jednu molekulu kyslíku vzhledem k jeho struktuře. Myoglobin je syntetizován v lidském těle v srdeční svalovině a některých kosterních svalech (Kunert, 1999).



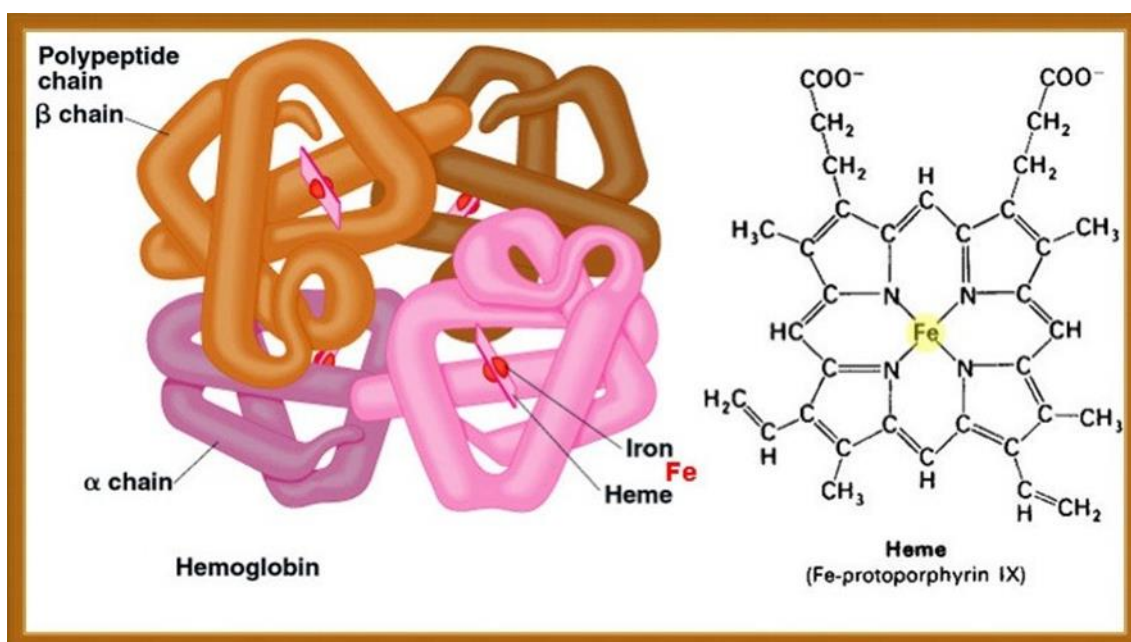
Obrázek 2 – Myoglobin (Toth, 2008)

V myoglobinu je na železnatý kation prostřednictvím imidazolové skupiny histidinu vázána jako pátý ligand bílkovina a jako šestý ligand voda, ale ta tam nemusí být přítomna. Reakcí s kyslíkem pak vzniká z myoglobinu oxymyoglobin, kde místo

vody je ligandem kyslík. Při velmi nízkých tlacích kyslíku, většinou pod 1,4 mm Hg, není tento šestý ligand přítomen a pak hovoříme o deoxymyoglobinu (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Hemoglobin je molekula červených krevních buněk, která transportuje kyslík z plic ke tkáním a oxid uhličitý ze tkání do plic. Tímto způsobem zajišťuje výměnu dýchacích plynů v těle obratlovců (Rosenthal a Glew, 2009).

Hemoglobinová struktura je tvořená čtyřmi molekulami globinu a hemu (obr. 3). Díky tomu může hemoglobin vázat čtyři molekuly kyslíku, které zaujímají místo železa v hemu (Rosenthal a Glew, 2009).



Obrázek 3 – Struktura hemoglobinu (vlevo) a hemu (vpravo) (Mortada, 2009)

Základním kamenem struktury myoglobinu, hemoglobinu a od nich odvozených pigmentů je substituovaný cyklický tetrapyrrol protoporphyrin IX s centrálním atomem dvojmocného železa, který se zde nazývá protohem či hem (Chung et al., 2017; Velíšek a Hajšlová, 2009).

Zkoumání struktury hemu odhalilo, že hemoglobin je složen z heterocyklických porfyrinových kruhů se železem vázaným na jejich střed. Klíčové vlastnosti porfyrinových kruhů zahrnují následující:

- Jejich struktura se skládá z pětičlenných kruhů, obsahujících dusík, spojených jednoduchými uhlíkovými můstky. Tato charakteristická

struktura se objevuje v hemových skupinách hemoglobinu, myoglobinu a v některých cytochomech.

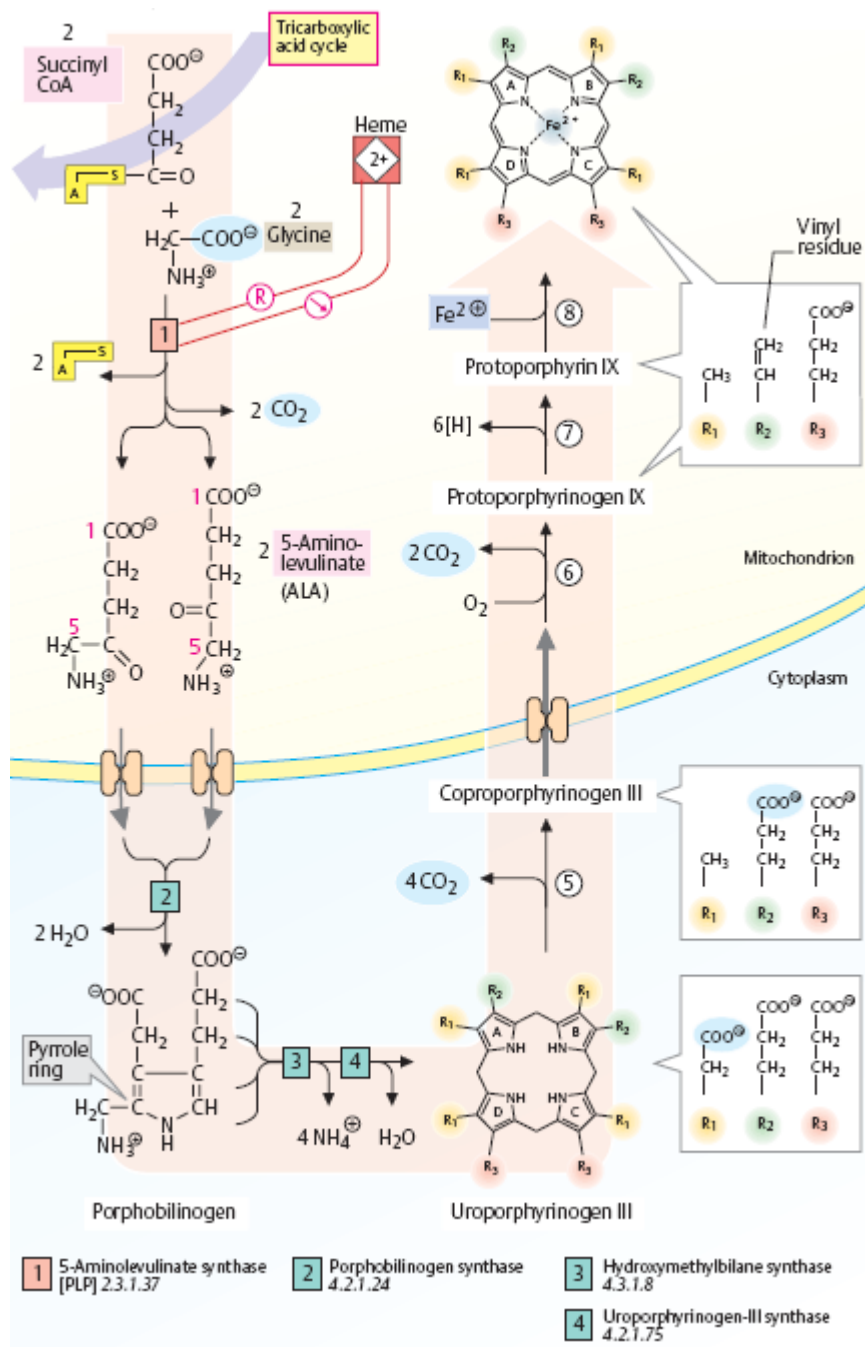
- Mají typicky vázané železo v železnatém oxidačním stavu. A tak, aktivní forma hemu v hemoglobinu má výhradně železo v železnatém stavu a oxidace na železitou formu vytváří inaktivní methemoglobin, který není schopen vázat kyslík (Panini, 2013).

Biosyntéza hemu probíhá ve dvou prostředích a ve třech fázích a je znázorněna na obrázku 4 (Chung et al., 2017; Panini, 2013).

První fáze je mitochondriální syntéza δ -aminolevulové kyseliny (δ -ALA) z glycinu a sukcinyl-koenzymu A (CoA). V této fázi je glycin kondenzován se sukcinyl-CoA se ztrátou dvou molekul CO_2 a vzniká δ -ALA. Tato kondenzační reakce je katalyzována enzymem ALA syntázou (Panini, 2013; Chung et al., 2017).

Druhou fází je sled cytosolových reakcí, kdy na začátku kondenzují dvě molekuly δ -ALA za katalýzy ALA dehydratázou (ALAD) neboli porfobilinogen syntázou a vzniká porfobilinogen (PBG). Následně čtyři PBG jsou kondenzovány za katalýzy porfobilinogen deaminázou na hydroxymethylbilan, lineární prekurzor pro cyklické porfyriny. Hydroxymethylbilan je konvertován uroporfyrinogen III syntázou na uroporfyrinogen III, který je již cyklický. Posledním krokem je přeměna uroporfyrinogenu III na koproporfyrinogen III za katalýzy uroporfyrinogen dekarboxylázy (Panini, 2013; Chung et al., 2017).

Třetí fáze probíhá opět v mitochondriích a jedná se o oxidaci koproporfyrinogenu III na protoporfyrinogen IX za katalýzy enzymem koproporfyrinogen oxidázou. Protoporfyrinogen IX je oxidován enzymem protoporfyrinogen IX oxidázou na protoporfyrin IX. V tomto kroku je bezbarvý profyrinový prekurzor konvertován na červený protoporfyrin IX. Posledním krokem je inkorporace železnatého iontu do molekuly protoporfyrinu IX za vzniku hemu. Tato reakce je zajištěna ferrochelátázou (Panini, 2013; Chung et al., 2017).



Obrázek 4 – Biosyntéza hemu (Koolman, 2005)

Hemoglobin je obsažen v červených krvinkách, které žijí 120 dní. Poté co krvinky dosáhnou zralosti, jsou vychytávány retikulárními buňkami slinivky břišní. Tyto buňky tvoří retikuloendoteliální systém (RES). V tomto systému jsou červené krvinky destruovány a hemoglobin je rozložen na hem a globin. Globin je metabolizován na jednotlivé aminokyseliny a hem je odebrán pro degradaci. Degradace hemu (obr. 5) probíhá v RES následovně (Minai-Tehrani et al., 2017).

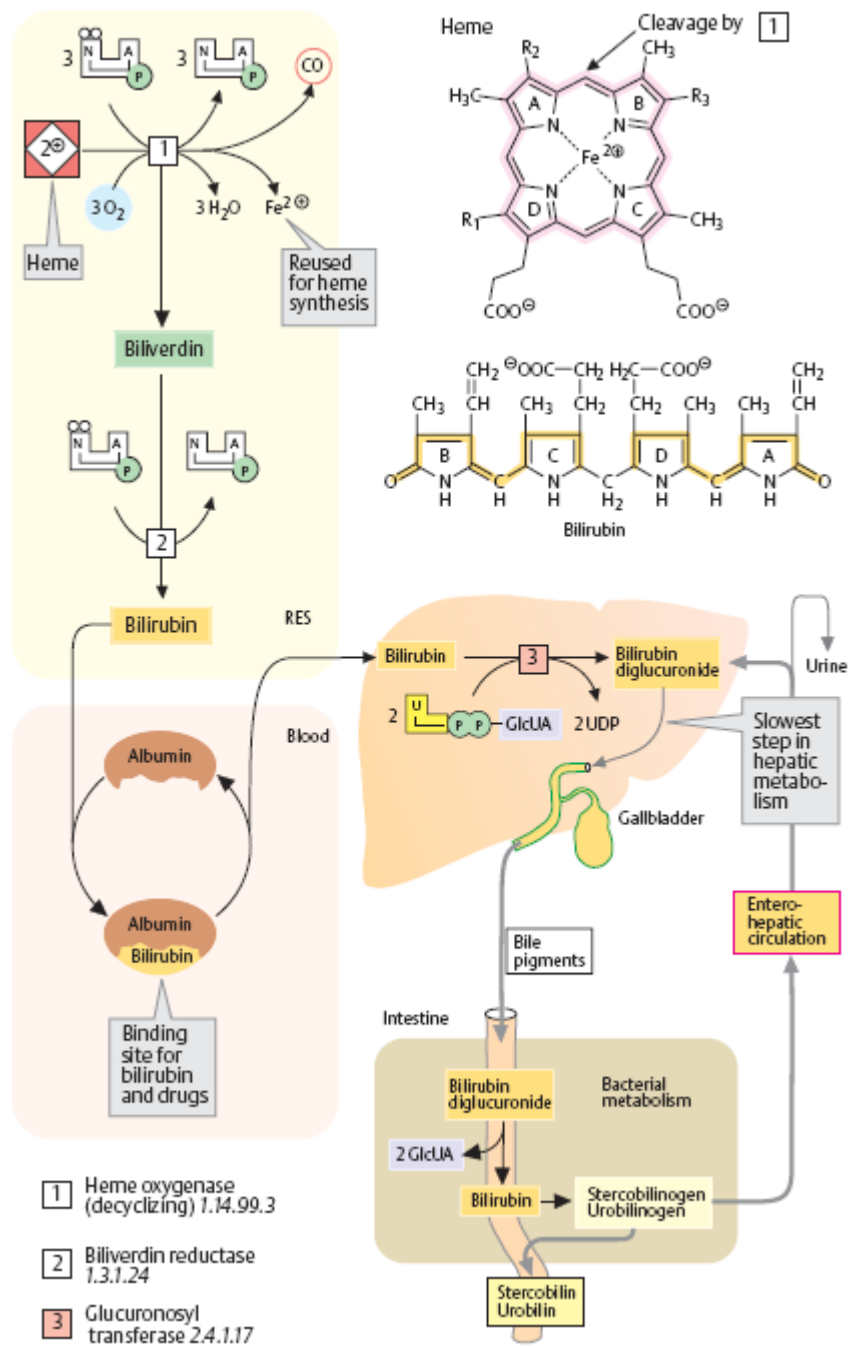
Jako první je hem oxidován na biliverdin pomocí hem oxygenázy. Ta katalyzuje přeměnu jednoho můstku mezi dvěma pyrrolovými kruhy na oxid uhelnatý. Tato reakce vyžaduje kyslík (Brown a Troxler, 2018).

- aktivita hemoxygenázy je indukovaná zvýšenou koncentrací hemu, kovovými ionty a fenylyhydrazinem,
- fialově zbarvený hem je konvertován na zeleně zbarvený lineární biliverdin,
- Fe^{2+} je přeměněno na oxidovanou formu Fe^{3+} (Panini, 2013).

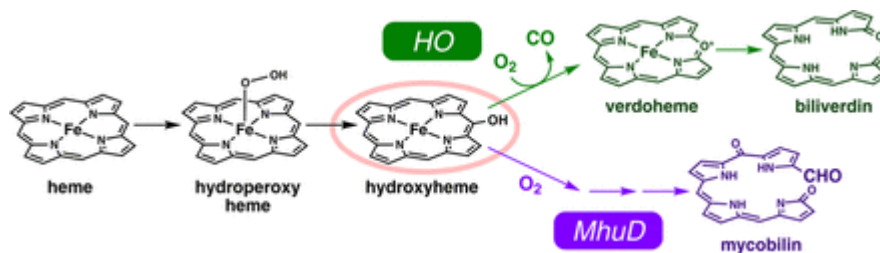
Dalším krokem je redukce biliverdinu na další pigmenty. Jako první je biliverdin redukován pomocí biliverdin reduktázy na bilirubin, který je červeno-oranžový. Bilirubin je poté z krve transportován do jater pomocí sérového proteinu albuminu, kde je konjugován, pomocí UDP-glukuronyltransferázy, s kyselinou glukuronovou. Takto vzniká bilirubin monoglukuronid a poté bilirubin diglukuronid. Tyto reakce jsou rychlost-určující kroky v degradaci bilirubinu z krve. Více rozpustný konjugovaný bilirubin diglukuronid je koncentrován ve žlučníku. Nekonjugovaný bilirubin je nerozpustný ve vodě a je nazýván nepřímým bilirubinem. Naproti tomu konjugovaný bilirubin je nazýván přímým bilirubinem. Tato označení vyplývají z metod stanovení těchto parametrů v krvi a z jejich chování ve vodě (Panini, 2013; Brown a Troxler, 2018).

Sekrecí žluče do tenkého střeva dochází k dalším úrovním v procesu, ve kterém mikrobiální enzymy redukují bilirubin na bezbarvý urobilinogen. Protože je urobilinogen lipofilní, je resorbován a transportován do ledvin, a oxidován na urobilin, žlutý pigment moče. Urobilinogen, který není resorbován je oxidován mikrobiálními enzymy na sterkobilin, červeno-oranžový pigment stolice (Panini, 2013; Brown a Troxler, 2018).

Některé bakterie, jako například *Mycobacterium tuberculosis*, mají speciální enzym, který se uplatňuje při degradaci hemu. Tento enzym pomáhá bakteriím získávat železo z hostitelských molekul, když jejich hladina extracelulárního železa je nízká. Další výhodou tohoto enzymu je, že při degradaci se netvoří oxid uhelnatý. Tento enzym se nazývá MhuD. U ostatních živočichů se uplatňuje hem oxygenáza, ale při tomto rozpadu vzniká oxid uhelnatý (Ikeda-Saito, 2013). Schéma rozpadu hemu pomocí tohoto enzymu zobrazuje obrázek č. 6.



Obrázek 5 – Degradace hemu na sterkobilinogen a urobilinogen (Koolman, 2005)



Obrázek 6 – Možné cesty degradace pomocí hemoxygenázy a *Mycobacterium tuberculosis* deoxygenázy (Ikeda-Saito, 2013)

3 Nemoci spojené s poruchami v metabolismu hemu a bilirubinu

3.1 Anémie z nedostatku železa (sideropenická či hypochromní mikrocytární anémie)

Nedostatek železa může být přítomen v důsledku nedostatečného příjmu železa nebo ze ztráty železa, které vyplývají z krvácení do gastrointestinálního traktu či nadměrné ztrátě krve při menstruaci. Hlavní globální příčinou je nedostatek železa v důsledku nedostatečného příjmu potravou většinou způsobený různými dietami, které zahrnují požívání spíše celozrnných potravin, zeleniny a méně masa. Železo je velmi významné při tvorbě hemu, a pokud ho je nedostatek, dochází k nedostatečné tvorbě tohoto pigmentu (Janz et al., 2013).

Krvácení je hlavní příčinou ztráty železa z organismu hlavně u mužů a postmenopauzálních žen. Různé diagnózy z nedostatku železa začínají u gastrointestinálních nádorů (Janz et al., 2013).

Při anémii způsobené nedostatkem železa jsou erytrocyty malé (mikrocytické) a hypochromické (bledé). Nejcitlivějším klinickým indikátorem vznikající anémie z nedostatku železa je plazmatická koncentrace feritinu, která klesá pod referenční rozmezí (Janz et al., 2013).

Léčba tohoto typu anémie spočívá v obohacení potravy o železnaté soli a džusy obsahující kyselinu askorbovou a citronovou, které zlepšují absorpci železa (Janz et al., 2013).

3.2 Hereditární hemochromatóza

Hereditární hemochromatóza, poměrně časté autosomálně recesivní onemocnění, je charakterizováno progresivní akumulací nadbytku železa v buňkách jater, srdce, slinivky břišní a dalších orgánů. Tato akumulace je způsobena poruchou genu HFE na 6. chromozomu, což vede k nadměrné akumulaci železa v hepatocytech (Haley, 2017).

Typicky se železo ukládá nejdříve do hepatocytů, následně žlučových, Kupfferových buněk a makrofágů, kde hlavní a nejzávažnější manifestací onemocnění je rozvoj jaterní cirhózy s možným vznikem a rozvojem hepatocelulárního karcinomu. Dalšími orgány poškozenými při hemochromatóze jsou myokard, pankreas, klouby a

varlata. Známý dle definice je tzv. bronzový diabetes, který vzniká na podkladě destrukce pankreatu, respektive Langerhansových ostrůvků, a neschopnosti produkce insulinu (Haley, 2017).

Nejlepší a zatím jedinou léčbou je venepunkce (pouštění žilou), která vede alespoň k utlumení progresu onemocnění. Ženy jsou při této chorobě mírně chráněny ztrátami krve menstruací, nicméně z dlouhodobého hlediska lepší prognózu nemají (Haley, 2017).

3.3 Hemosideróza

Hemosideróza je hromadění železa v podobě pigmentu hemosiderinu. Hemosiderin je intracelulární železo-skladující komplex, který umožňuje denaturaci feritinu. Hemosiderin se hromadí v makrofázích po zvýšení fagocytózy červených krvinek spojených s krvácením. Hemosiderin se také tvoří při zvýšeném příjmu železa či jeho špatném využití, například při opakovaných transfuzích krve při útlumu krvetvorby tzv. aplastické anemii (Rosenthal a Glew, 2009).

3.4 Otravy olovem

Při otravách olovem dochází k tomu, že olovo inhibuje ALA dehydratázu a ferrochelátázu, čímž se snižuje syntéza hemu, a to vede k mikrocytární, hypochromické anémii. Koncentrace plazmatické ALA a erytrocytárního protoporfyrinu jsou zvýšené u lidí s otravou olovem (Rosenthal a Glew, 2009).

Dále může otrava olovem mít také škodlivé účinky na energetický metabolismus. Olovo je zejména toxické pro nervový systém, pravděpodobně způsobené akumulací δ -ALA stejně jako narušení energetického metabolismu (Rosenthal a Glew, 2009).

3.5 Porfyrie

Porfyrie je rodina dědičných poruch způsobených nedostatkem různých enzymů v dráze syntézy hemu. Výsledkem je kumulování prostředních metabolitů. V závislosti na konkrétním postižení genu, mohou porfyrie postihovat syntézu hemu všech buněk nebo může být primárně hepatální či erythropoetická. Většina porfyrií je spojována s patologií nervového systému. Kumulování porfyrinogenů v kůži může vést k fotosenzitivitě. Mezi jaterní porfyrie patří akutní intermitentní porfyrie (AIP) (Cerbino et al., 2015).

AIP je autozomálně dominantní onemocnění a je způsobená defektem v porfobilinogen deamináze, který vede k hromadění prekurzorů hemu v játrech. Porfobilinogen syntáza je spojována s vysokou hladinou δ -ALA a PBG a následky v závažných neurologických příznacích. Lidé s akutní intermitentní porfýrií mají periodické krize, které jsou obvykle vyvolány drogami, jako jsou barbituráty a sulfonamidy. Ty indukují syntézu hemu a obsahují enzymy obsažené v cytochromu P450. Léčbou této porfýrie je v akutní fázi infuze s glukózou a hematinem. Prevencí dalších ataků je vyvarování se některých léků obsahujících barbituráty či sulfonamidy (Cerbino et al., 2015).

Další skupinou jsou erythropoetické porfýrie, mezi něž patří vrozená (kongenitální) erythropoetická porfýrie též zvaná jako Günterova choroba. Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění, které je výsledkem nedostatečnosti uroporfyrinogen III syntázy, což vede ke zvýšené tvorbě porfyrinů v kostní dřeni. Ty se potom hromadí v organismu, především v erytrocytech. Klíčové meziproducty jsou přeměňovány na nefunkční isomer uroporfyrinogenu I, který způsobuje červenou barvu v moči, červenou fluorescenci zubů, předčasnou destrukci erytrocytů a fotosenzitivitu kůže (Panini, 2013; Murray, 2012; Rosenthal a Glew, 2009; Masopust a Průša, 1999)

3.6 Ikterus (žloutenka)

Ikterus patří mezi hlavní poruchy metabolismu bilirubinu. Jak již bylo uvedeno, bilirubin se nachází ve dvou stavech, a to jako bilirubin konjugovaný a nekonjugovaný. Jako ikterus můžeme označit stav, kdy sérové koncentrace bilirubinu v séru překračují dvojnásobné hodnoty (tedy $<34 \mu\text{mol/l}$). Pokud hodnoty bilirubinu v séru nepřekročí dvojnásobné hodnoty, ale jedinci mají nažloutlé sliznice, kůže a skléry, hovoříme o subikteru (Vítek, 2009).

3.7 Hyperbilirubinémie

Poruchy metabolismu bilirubinu dělíme podle lokalizace na poruchy projevující se převážně:

- nekonjugovanou hyperbilirubinémií (tzv. premikrozomální typ)
- konjugovanou hyperbilirubinémií (tzv. postmikrozomální typ)
- smíšenou hyperbilirubinémií (Vítek, 2009).

Premikrozomální typ hyperbilirubinémie zahrnuje stavy, které dělíme z hlediska etiologie na tři základní skupiny:

1. Stavy spojené s nadprodukcí bilirubinu

Mezi stavy spojené s nadprodukcí bilirubinu patří hemolytické anémie, které jsou nejčastější příčinou. Zde je však nutno podotknout, že se organismus dokáže vyrovnat s hodnotami bilirubinu, které jsou vysoké, ale ne dlouhodobě. Podobně je organismus schopen si poradit s mírnou hemolýzou, která nevede k anémii. Jelikož organismus má své kompenzační mechanismy, aby se s touto situací vyrovnal. Z těchto důvodů je jasné, že u chronických anémií nebývá nikdy hladina bilirubinu vyšší než 70 $\mu\text{mol/l}$. Jiným případem jsou akutní hemolytické krize, které doprovázejí některé hemolytické anémie (Vítek, 2009).

Hemolytické anémie dělíme na dědičné a získané, které se dále dělí podle vyvolávající příčiny (Vítek, 2009). Stručný přehled je uveden v tabulce 1.

Dědičné hemolytické anémie jsou vyvolávány mnoha geneticky determinovanými příčinami, které způsobují poruchy ve složení buněčné membrány erytrocytů, hemoglobinu nebo v enzymové výbavě červených krvinek. Proto se nazývají tyto anémie jako korpuskulární. Oproti tomu jsou získané hemolytické anémie způsobeny většinou vlivy zevního prostředí, a proto jsou tyto anémie nazývány extrakorpuskulární. Mezi vlivy zevního prostředí patří například protilátky, xenobiotika, fyzikální, chemické či biologické faktory. Výjimku tvoří paroxysmální noční hemoglobinurie, která patří mezi získané korpuskulární anémie (Vítek, 2009).

Tabulka 1 – Rozdělení hemolytických anémií (Vítek, 2009)

Dědičné hemolytické anémie
a) z poruchy membrány erytrocytů
Dědičná sférocytóza
Dědičná eliptocytóza
Akantocytóza
b) z metabolismu erytrocytů
Deficience glukóza–6–fosfátdehydrogenázy
Deficience pyruvátkinázy
Jiné enzymové defekty vedoucí k hemolytické anémii (např. deficience hexokinázy, adenylátcyklázy, fosfofruktokinázy, glutationsyntetázy a dalších)
Získané hemolytické anémie
a) autoimunitní hemolytické anémie
Idiopatická autoimunitní hemolytická anémie (AIHA)
Symptomatická autoimunitní hemolytická anémie
b) chladové hemolytické anémie
Kryopatická hemolytická anémie
Paroxysmální chladová hemoglobinurie
c) polékové hemolytické anémie
Penicilinový typ
Stibofenový typ
Alfametyldopový typ
d) paroxysmální noční hemoglobinurie
e) mikroangiopatická hemolytická anémie
f) hemolytické anémie z chemických a fyzikálních příčin
g) hemolytické anémie vyvolané mikroorganismy

Dále vedou k nadprodukci bilirubinu i stavy tzv. zvýšené neefektivní erytropoézy. Jedná se o patologické stavy, při kterých nedochází během vývojového cyklu k maturaci červených krvinek do finální formy funkčního erytrocytu. Tyto defektní erytrocyty jsou destruovány ve slezině a podléhají předčasné hemolýze. Hladiny bilirubinu v séru bývají zvýšené jen mírně a nepřevyšují koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ (Vítek, 2009).

K nekonjugované hyperbilirubinémii může dojít i při výraznější extravaskulární hemolýze. K tomu dochází při velkých tkáňových infarktech, rozsáhlých hematomech, při krvácení z cév po kanylacích, katetrizacích, opakovaných venepunkcích či operačních výkonech. Další příčinou může být elevace tohoto bilirubinu při hemolýze červených krvinek pocházejících z krevních transfuzí (Vítek, 2009).

Poslední příčinou je nadprodukce bilirubinu z nehemoglobinových zdrojů.

2. Stavy spojené s poruchou vychytávání bilirubinu játry

Hlavní úlohu v poruše vychytávání bilirubinu nesou zřejmě transportní systémy, podílející se na transportu bilirubinu do jater. Avšak tyto systémy nejsou doposud ještě úplně známy. Předpokládá se, že se jedná o transportéry ze skupiny transportních proteinů pro organické anionty (tzv. OATP – transportéry). Při deficienci těchto transportních mechanismů může docházet k manifestaci nekonjugované hyperbilirubinémie. Klasickým klinickým příkladem je novorozenecká žloutenka. Její etiologie je multifaktoriální a jedním z hlavních faktorů podílejících se na vzniku je i nezralost transportních funkcí hepatocytů na sinusoidální membráně (Vítek, 2009).

Porucha vychytávání bilirubinu játry může být i vrozená. Existují práce poukazující na asociaci specifické varianty v genu pro OATP1B1 se zvýšeným rizikem novorozenecké žloutenky. I když není zatím k dispozici mnoho klinických dat o získané deficienci sinusoidálního transportu bilirubinu, předpokládá se, že s transportem bilirubinu na bazolaterálním pólu hepatocytů interferují některá léčiva. Například pomocí OATP1B1 transportéru jsou přenášeny léky jako fibráty, statiny, bosentan, cyklosporin A a jiné (Gazzin et al., 2016).

3. Porucha konjugace bilirubinu v játrech

Tyto poruchy jsou oproti poruchám vychytávání bilirubinu játry mnohem častější. Rozdělujeme je na:

a) Vrozené defekty konjugace bilirubinu v játrech. Patří mezi ně tzv. familiární nekonjugované hyperbilirubinémie – Gilbertův syndrom a Crigler-Najjarův syndrom I. a II. typu.

b) Získané deficiencie bilirubinu UDP-glukuronozyltransferázy (UGT1A1). K tomuto stavu může dojít při jakémkoli difúzním hepatocelulárním poškození, tedy při steatóze, steatohepatitidě, jaterní cirhóze či fibróze (Gazzin et al., 2016).

Postmikrozomální typ hyperbilirubinémie neboli konjugovaná hyperbilirubinémie vzniká na podkladě obstrukce žlučových cest a je zdaleka nejčastějším typem žloutenek. Pokud se onemocnění manifestují do pokročilejších stádií, nacházíme u nemocných smíšenou hyperbilirubinémii. To je například u Dubin-Johnsonova syndromu. K manifestaci tohoto typu hyperbilirubinémie dochází při poruše metabolismu bilirubinu po uskutečnění jeho glukuronolyzace na jaterních mikrozomech (Gazzin et al., 2016).

Postmikrozomální hyperbilirubinémie dělíme na familiární konjugované hyperbilirubinémie a získané konjugované hyperbilirubinémie, přičemž druhý typ je nejčastěji se vyskytujícím typem v interní medicíně. Získané konjugované hyperbilirubinémie dělíme na onemocnění sdružené s intrahepatální cholestázou a na onemocnění sdružené s extrahepatální cholestázou. Cholestázu definujeme jako poruchu tvorby nebo toku žluče na úrovni jaterní buňky, intra- nebo extrahepatálních žlučodů (Vítek, 2009). Přehled postmikrozomálních konjugovaných hyperbilirubinemií je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2 – Rozdělení postmikrozomálních konjugovaných hyperbilirubinemií (Vítek, 2009)

Získané konjugované hyperbilirubinémie	
Sdružené s intrahepatální cholestázou	Primární biliární cirhóza Primární sklerotizující cholangitida Cholestatická forma infekční hepatitidy Alkoholová hepatitida Toxické poškození kanalikulárního transportu bilirubinu
Sdružené s extrahepatální cholestázou	Cholelitiáza Nádory podjaterní krajiny Strikuly žlučových cest jiné etiologie Malformace žlučových cest Záněty žlučových cest (cholangitidy) Traumata žlučových cest Kompresie žlučových cest
Familiární konjugované hyperbilirubinémie	
Dubin-Johnsonův syndrom	
Rotorův syndrom	

Ke smíšené hyperbilirubinémii dochází při kombinaci etiopatologických faktorů uplatňujících se při vzniku premikrozomálních i postmikrozomálních hyperbilirubinemií. Jedná se o onemocnění difúzně poškozující jaterní parenchym, jako jsou například steatohepatitida, hepatitida, onemocnění vznikající na základě vazivové přestavby jaterní tkáně (jaterní cirhóza či fibróza). Dále sem patří i polékové či jiné toxické poškození jater (Vítek, 2009).

4 Stanovení hemoglobinu a bilirubinu v krvi a moči

- **Stanovení bilirubinu v krvi (častěji séru)**

První metodou stanovení bilirubinu je diazostanovení bilirubinu. Tímto postupem je bilirubin stanovován v rutinní diagnostice. Jedná se o diazoreakci, kterou poprvé popsal Paul Ehrlich (1883), ve které reaguje bilirubin s diazotovanou kyselinou sulfanilovou. Reakce se provádí přímo nebo se používá akcelerátoru, nejčastěji alkoholu. Při přímém provedení reaguje bisglukuronozyl bilirubin s diazotovanou kyselinou sulfanilovou přímo, kdežto při nepřímém provedení se používá navíc akcelerátor. V obou případech vznikají azopigmenty, které mají typické absorpční maximum při definovaném pH. Toho se využívá při stanovování (Vítek, 2009).

Dalšími metodami jsou enzymatické metody využívající faktu, že enzym bilirubinoxidáza oxiduje bilirubin na biliverdin a dále na další, finálně bezbarvé produkty. Zde koncentrace bilirubinu odpovídá poklesu absorpčního maxima bilirubinu. Pro odlišení konjugovaného a nekonjugovaného bilirubinu se používá různé pH prostředí, neboť při pH 3,7 – 4,5 není nekonjugovaný bilirubin oxidován (Vítek, 2009).

- **Stanovení bilirubinu v moči**

Nejběžnější metodou stanovení bilirubinu v moči je metoda suché chemie, která využívá testovací proužek impregnovaný diazotačným činidlem. Detekční limit je 8 $\mu\text{mol/l}$. Jedná se o metodu semikvantitativní, ale spolehlivou. Problémy způsobuje pouze expozice světlu a teple. Odebraný vzorek moče by proto měl být zpracován během hodiny od odběru. Také některé látky interferují s bilirubinem a způsobují falešně pozitivní výsledky testu. Jsou jimi kyselina askorbová či nitrity (Vítek, 2009).

- **Stanovení hemoglobinu v krvi (séru)**

Stanovení hemoglobinu se provádí fotometrickou metodou a patří k nejzákladnějším laboratorním stanovením hemoglobinu v krvi. Pomocí tohoto stanovení můžeme určit, zda pacient trpí anémií. Principem fotometrické metody je převedení dvojmocného železa v hemu na trojmocné pomocí hexakynoželezitanu draselného. V této reakci vzniká methemoglobin, který vstupuje do další reakce, v níž reaguje s kyanidem draselným a přeměňuje se na velmi stálý kyanmethemoglobin. Kyanmethemoglobin má jediné široké absorpční maximum při vlnové délce 540 nm (Burtis et al., 2006).

Referenční hodnoty koncentrace hemoglobinu (B hemoglobin) v krvi jsou pro muže 130-180 g/l a pro ženy 120–160 g/l (Burtis et al., 2006).

Dle novodobých studií se začíná prosazovat nová rychlá a citlivá metoda stanovení hemoglobinu v krvi, a to metoda založená na fluorescenci zlatých nanočástic (AuNPs) rozpuštěných ve vodném roztoku. Metoda spoléhá na vysokou selektivitu povrchově potiskovacích technik a na silnou fluorescenční vlastnost AuNPs (Li et al., 2016).

Nejprve jsou AuNPs navázány na amino-funkcionalizované křemičité nanočástice (SiO₂NPs). Na toto je poté hemoglobinem-potisknutý polymerní řetězec navázán pomocí povrchově potiskovací techniky. Generovaný SiO₂/Au/MIPs jako fluorescenční senzor vlastní oboje, a to jak senzitivitu zlatých nanočástic, tak specifickou selektivitu molekulárně potisknutých polymerů (MIPs) (Li et al., 2016).

Podmínky jako je pH, stabilita a vliv koncentrace fluorescenčních senzorů byly zkoumány ke zjištění optimálních podmínek detekce. Pro optimální podmínky, fluorescenčně-zhášecí detekce ukazuje optimální lineárnost s koncentrací hemoglobinu v rozmezí od 0,1 – 20 $\mu\text{mol/l}$. Detekční limit této metody je 0,03 $\mu\text{mol/l}$ (Li et al., 2016).

- **Stanovení hemoglobinu v moči**

Stanovení hemoglobinu v moči se opírá o tzv. pseudoperoxidázovou aktivitu hemoglobinu. Hemoglobin katalyzuje neenzymové štěpení peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Přičemž kyslík poté oxiduje redukovaný chromogenní substrát (*o*-tolidin) na oxidovanou formu, která je již barevná. Stejný princip je i u průkazu krve v moči pomocí diagnostických proužků (Burtis et al., 2006).

5 Chlorofyly a fykobilliny

Chlorofyly patří mezi fotosyntetické pigmenty rostlin, sinic a některých řas. Fykobilliny pak mezi fotosyntetické pigmenty sinic, ruduch a skrytěnek (Douma, 2008).

5.1 Chlorofyly

Chlorofyly patří mezi cyklická tetrapyrrolová barviva. Základ struktury tvoří tetrapyrrolový řetězec s komplexně vázaným hořečnatým kationtem. Na sedmém atomu uhlíku čtvrtého pyrolového kruhu je vázána kyselina propionová, která je esterifikována fytolem. Lipofilní charakter fytolu pak překrývá hydrofilní charakter porfyrinu, takže chlorofyly jsou lipofilní, a tudíž rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech (Procházka et al., 1998; Emmerová, 2008).

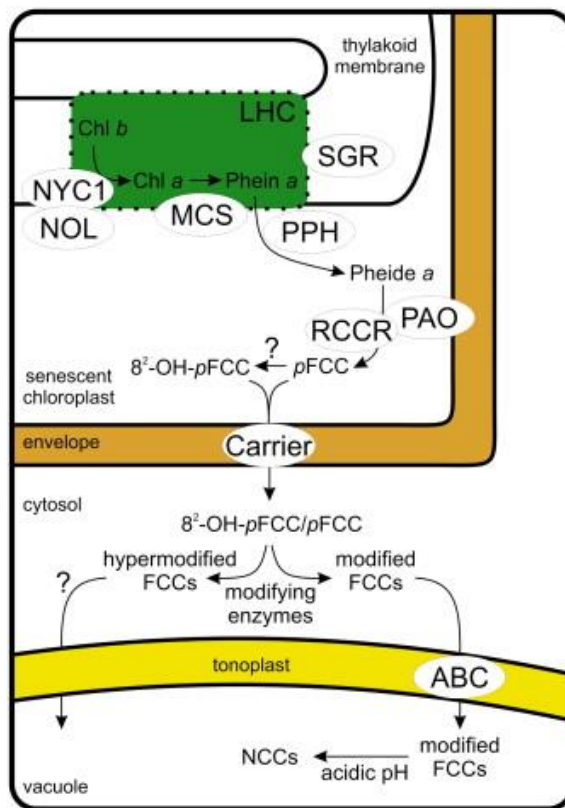
Rozeznáváme několik typů chlorofylů, a to chlorofyl *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, bakterioviridin a bakteriochlorofyl. Chlorofyl *a* je modrozelený, chlorofyl *b* je žlutozelený. Ostatní chlorofyly *c*, *d*, *e* a *f* se vyskytují v hnědých řasách, sinicích a některých různobrvkách (Procházka et al., 1998; Emmerová, 2008).

Biosyntéza chlorofylu začíná navázáním kyseliny glutamové na tRNA za přítomnosti ATP, Mg^{2+} a ligázy. Vzniklý glutamyl-tRNA je pak použit na syntézu pyrolů. Dalším krokem je redukce glutamyl-tRNA na glutamát-1-semialdehyd, který je prekurzorem pro δ -ALA. V další reakci jsou dvě molekuly δ -ALA kondenzovány, za přítomnosti enzymu δ -ALA dehydrogenázy, na PBG. PBG má již konstituované pyrolové jádro. Následuje sled reakcí stejný jako u syntézy hemu, akorát v posledním kroku je místo Fe^{2+} zabudován do molekuly protoporfyrinu IX Mg^{2+} pomocí Mg chelátázy. Vzniká Mg-protoporfyrin. Jeho biosyntéza pokračuje úpravami jeho postranních řetězců za vzniku protochlorofylidu *a*. Ten je enzymem protochlorofylidoxidáza redukován na chlorofylid *a*, který je prekurzorem pro chlorofyl *a*. Po navázání fytolu na chlorofylid vzniká chlorofyl *a*. Chlorofyl *b* vzniká oxidací chlorofylu *a*, kdy z methylové skupiny vzniká aldehydová skupina (Emmerová, 2008).

Chlorofyl je degradován v chloroplastech pomocí enzymem-katalyzovaných procesů přes feoforbid *a* (Pheid *a*) a červený chlorofylový katabolit (RCC) na primární fluorescenční chlorofylové katabolity (pFCCs). Schematicky je degradace chlorofylu znázorněna na obrázku č. 7 (Hörtensteiner a Kräuter, 2011).

Degradace chlorofylu začíná na membráně tylakoidů, kde dochází k redukci chlorofylu *b* na chlorofyl *a* pomocí chlorofyl *b* reduktázy. Poté dochází pomocí magnesium dechelatázy ke vzniku feofytinu *a* (Pheid *a*), který se mění, v senescentním (stárnoucím) chloroplastu, na Pheid *a* za katalýzy enzymem feofytinázou (PPH). Pheid *a* pomocí Pheid *a* oxygenázy (PAO) se mění na RCC. RCC je redukován, pomocí RCC reduktázy (RCCR), na pFCCs. Katabolismus pFCCs pokračuje v cytosolu rostlinné buňky. Primární chlorofylové katabolity jsou modifikovány dalšími neidentifikovanými hydroxylačními enzymy na hypermodifikované FCCs a na modifikované FCCs. Osud hypermodifikovaných FCCs není dosud prozkoumán. Modifikované FCCs jsou dále modifikovány ve vakuole, kam jsou přeneseny pomocí přenašeče. FCCs jsou přeměněny pomocí kyselého pH na nefluoreskující chlorofylové katabolity (NCCs) (Hörtensteiner a Kräuter, 2011; Marangoni, 2017).

Přírodní NCCs jsou velmi aktivními antioxidanty. Ve skutečnosti, jejich oxidace na barevné komponenty probíhá snadno, a to vysvětluje jejich původní název „rezavé pigmenty“ (Hörtensteiner a Kräuter, 2011).



Obrázek 7 – Degradace chlorofylu u vyšších rostlin (Hörtensteiner a Kräuter, 2011)

6 Poruchy metabolismu chlorofylu

Poruchy metabolismu chlorofylu mohou být u rostlin vrozené (geneticky podmíněné) nebo získané (Hrudová, 2011).

Nejčastější poruchou u rostlin je albinismus. Albinismus je u rostlin definován jako absolutní nedostatek chlorofylu, kdy chlorofyl není rostlinou vůbec tvořen. Albinismus může být způsoben mutací genu pro chlorofyl či chimérickým růstem rostliny (Hrudová, 2011).

Chimérický růst znamená výskyt dvou či více organicky propojených genotypů. V praxi to pak vypadá tak, že rostlina má dva či více různých druhů pletiv či buněk (Hrudová, 2011).

Další poruchou u rostlin je kalcioza. Jedná se o fyziologickou poruchu způsobenou nadbytkem vápníku v půdě. V důsledku nadbytku vápníku v půdě má rostlina nedostatek železa a dochází k tzv. bledniče rostlin neboli chloróze (Schuster, 2017).

Železo je potřebné pro syntézu glutamyl t-RNA reductázy, enzymu potřebného pro vytvoření δ -ALA, která je prekurzorem pro syntézu chlorofylu (Kumar a Soell, 2000).

6.1 Stanovení koncentrace chlorofylu *a*

Jedná se o spektrofotometrické stanovení chlorofylu *a* extrahovaného horkým etanolem ze sinic a řas zachycených filtrací vzorku na filtru ze skleněné vlákniny. Metoda se využívá pro povrchové vody. Obsah chlorofylu *a* ve vzorku vody se vztahuje k množství přítomného fytoplanktonu (Vejmolková et al., 2015).

Přítomnost chlorofylu *a* v planktonních sinicích a řasách odlišuje tuto skupinu mikroorganismů od ostatních složek planktonu povrchových vod, kterými jsou mikromycety, bakterie, zooplankton apod. (Vejmolková et al., 2015).

Vzorky vody se odebírají do polyethylenových lahví o objemu 1 000 – 2 000 ml. Konzervace vzorků se neprovádí. Vzorky se zpracovávají ihned po odběru. Ve výjimečných případech je možné skladování vzorků méně než 8 h, a to ve tmě a v chladničce při teplotě 2–5 °C (Vejmolková et al., 2015).

Před vlastním rozbořem se vzorek, pokud je odebírán za nízkých teplot nebo uchováván v lednici, nechá vytemperovat na laboratorní teplotu 20–25 °C. K vytemperování obvykle stačí doba nutná pro přípravu pracovní plochy a všech pomůcek nutných ke zpracování vzorku (Vejmelková et al., 2015).

Poté se vzorek důkladně promíchá protřepáním. Odměřená část vzorku, jejíž objem závisí na koncentraci přítomných suspendovaných částic, se zfiltruje přes filtr ze skleněné vlákniny za pomoci jemného podtlaku (obvykle 100 - 1 000 ml). Do formuláře na stanovení chlorofylu *a* se filtrovaný objem zaznamená (Vejmelková et al., 2015).

Do extrakční zkumavky se nadávkuje přesný objem 90% etanolu (např. 10 ml). Použitý objem etanolu se zaznamená do formuláře. Filtr se zachyceným materiálem se přeloží filtrační plochou dovnitř a pomocí pinzety se vloží do připravené zkumavky s etanolem. Zkumavka se pevně uzavře (viz obrázek č. 8) (Vejmelková et al., 2015).



Obrázek 8 – Postup stanovení chlorofylu *a* extrahovaného horkým etanolem ze sinic a řas (Vejmelková et al., 2015)

Zkumavky se umístí do nosiče a vloží se do připravené vodní lázně, vytemperované na teplotu 75 ± 1 °C. Ve vodní lázni se zkumavky zahřívají po dobu 5 min. Po vyjmutí z vodní lázně, se zkumavky ponechají zchladit na laboratorní teplotu po dobu 15 min. Po vytemperování se extrahovaný supernatant vyčistí tak, že se opatrně vyjme filtr. Vzorek se přelije do centrifugační zkumavky a vyčistí se od případně zbylých skleněných vláken. Po slítí se vyčištěný supernatant proměří spektrofotometrem (Vejmelková et al., 2015).

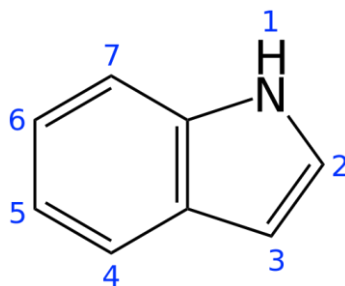
Část vyčištěného extraktu se přelije do kyvety spektrofotometru a proměří se při vlnové délce 665 nm a 750 nm proti referenční kyvetě s extrakčním činidlem, tj. 90% etanolem. Po proměření se extrakt oddělí do zkumavky a okyselí se přidáním 0,01 ml kyseliny chlorovodíkové (3 mol/l) na 10 ml objemu extraktu. Obsah zkumavky se protřepe. Po 5 min se změří absorbance znovu při 665 nm a 750 nm. Hodnoty absorbancí se zaznamenávají do formuláře pro stanovení chlorofylu *a* (Vejmelková et al., 2015).

Zjištěné hodnoty absorbance extraktu před okyselením a po okyselení se použijí pro výpočet koncentrace chlorofylu *a* a koncentrace feopigmentů. Hodnota koncentrace feopigmentů slouží jako indikace stavu organismů. Feopigmenty jsou produkty rozkladu chlorofylu. Poměr chlorofylu k feopigmentům indikuje fyziologický stav sinic a řas. Čím je více chlorofylu než feopigmentů, tím je rostlina mladší, a tedy ve velmi dobrém stavu (Vejmelková et al., 2015).

7 Indolová barviva

Indolová barviva jsou barviva odvozená od indolu. Do této skupiny barviv patří indigo a jeho deriváty (McMurray, 2007).

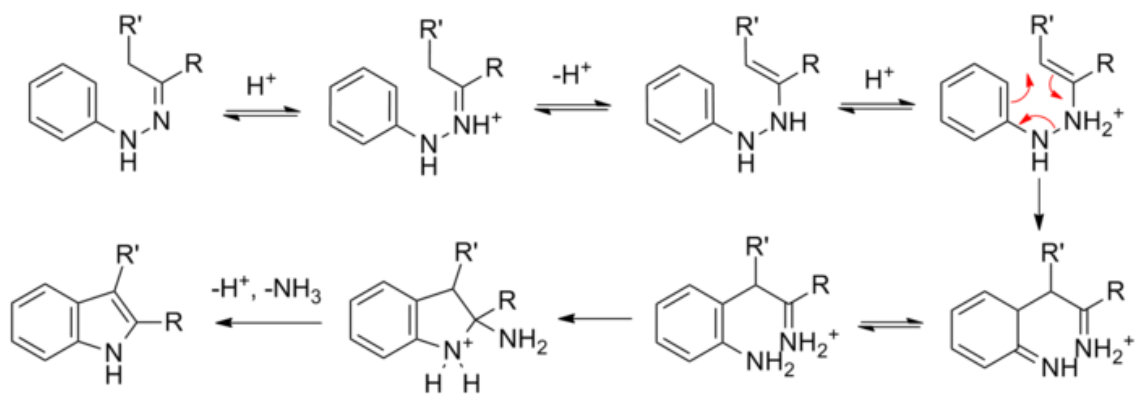
Indol (obrázek č. 9) je aromatická heterocyklická organická sloučenina, která má bicyklickou strukturu. Bicyklická struktura sestává z šestičlenného benzenového jádra a z pětičlenného pyrrolového kruhu obsahujícího dusík (McMurray, 2007).



Obrázek 9 – Struktura indolu (Szocsová, 2010)

Příprava indolu probíhá nejčastěji tzv. Fisherovou syntézou. Princip spočívá v zahřívání arylhydrazonů, aldehydů či ketonů s bezvodým chloridem zinečnatým, fluoridem boritým nebo kyselinou polyfosforečnou, případně kyselinou sírovou (McMurray, 2007). Nejprve dochází k přesunu dvojné vazby za vzniku derivátu hydrazinu. Hydrazin poté vlivem kyselého prostředí podléhá *o*-benzidinovému přesmyku, načež vzniklý diaminoderivát cyklizuje za odštěpení amoniaku a vzniká indol (McMurray, 2007).

Fischerova syntéza probíhá i se substituovanými fenylylhydrazony, ale v nejjednodušším případě, tj. z fenylylhydrazonu acetaldehydu, indol nevzniká. Používá se fenylylhydrazonu kyseliny pyrohroznové, který poskytne 2-indolkarboxylovou kyselinu. Její dekarboxylací vzniká indol. Schéma Fischerovy syntézy je uvedeno na obrázku č. 10 (McMurray, 2007).



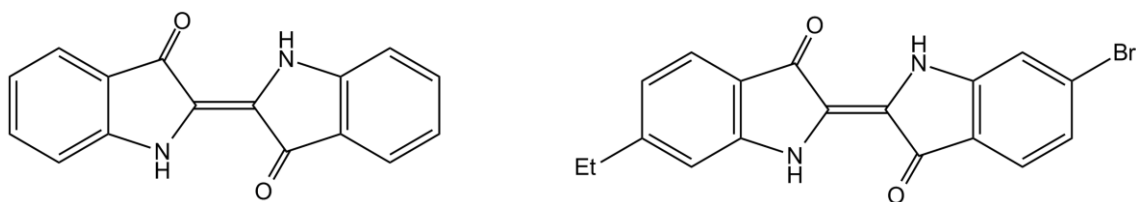
Obrázek 10 – Mechanismus Fischerovy syntézy indolu (McMurray, 2007)

7.1 Indigo a bromindigo

Indigo (obrázek č. 11) je organická sloučenina s charakteristickou modrou barvou. Indigo se dnes vyrábí synteticky. Původně se však indigo získávalo z rostliny *Indigofera tinctoria*, která roste v Asii. Indigo se pak získávalo extrakcí z listů této rostliny (Douma, 2008; Steingruber, 2004);

Indigo je jedno z nejstarších barviv vyráběných chemicky a hojně využíváno v textilním, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Nicméně, vzhledem k nebezpečí pro životní prostředí, které představuje chemická výroba, bylo nutné vynalézt alternativu v oblasti biosyntézy indiga. Tato studie popisuje původně izolovaný kmen *Pseudomonas sp. HOB₁*, který je degradován naftalinem, produkuje modrý pigment. Tento pigment produkuje, pokud byl do živného média přidán indol. Modrý pigment byl analyzován vysokotlakou tenkovrstvou chromatografií a ostatními spektroskopickými metodami, které odhalily, že to je indigo. *Pseudomonas sp. HOB₁* ukázala schopnost produkovat 246 mg indiga na litr média. Bakteriální indigo bylo později úspěšně použito pro barvení bavlněných tkanin. Tohoto se dodnes využívá ke komerční produkci indiga (Pathak a Madamwar, 2010).

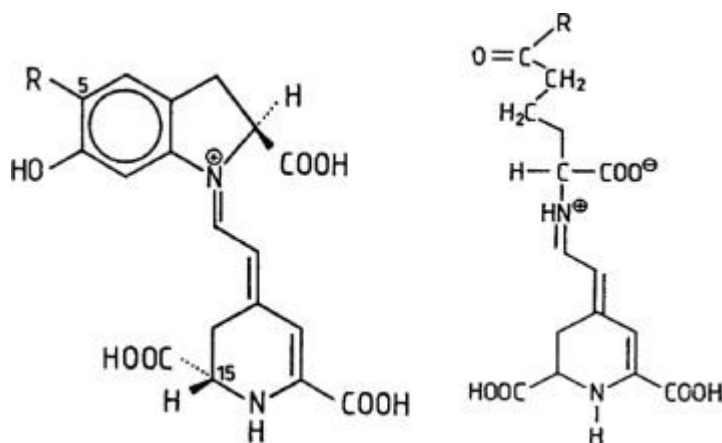
Antický purpur, též zvaný bromindigo, královský či císařský purpur je fialové barvivo obsahující dva atomy bromu. Barvivo se získává z mořského měkkýše Ostranky purpurové a používá se k barvení látek. Chemická struktura antického purpuru je znázorněna na obrázku č. 11 (Douma, 2008).



Obrázek 11 – Indigo (v levo) a antický purpur (v pravo). Převzato z (Cotton, 2011; Steingruber, 2004) a upraveno.

7.2 Betalainy

Betalainy jsou sekundární metabolity odvozené od aminokyseliny L-tyrozinu. Vyskytují se v rostlinách řádu Hvozdíkotvaré. Sem patří například Hvozdík (=karafiát) zahradní a další. Také jsou obsaženy v řepě, která patří do řádu Laskavcovitých. Zde nahrazují antokyanová barviva, která jsou nejčastějšími barvivy rostlin, ovoce a zeleniny. Betalainy se také nachází v některých vyšších houbách, listech, stoncích a kořenech rostlin. Poprvé byla betalainová barviva objevena v červené řepě, odtud získala své pojmenování. Je to skupina ve vodě rozpustných barviv obsahujících dusík, která jsou odvozena od kyseliny betalamové. Betalainy jsou děleny do dvou skupin, a to na betakyany a betaxantiny (Khan a Parvatam, 2015; Miguel, 2018). Obecná struktura betakyanů a betaxantinů je uvedena na obrázku č. 12.



Obrázek 12 – Obecná struktura betakyanů (vlevo) a betaxantinů (vpravo) (Chandrasekhar et al., 2015)

- **Betakyany**

Betakyany zahrnují červené až fialové pigmenty. Mají schopnost fluorescence při absorpčním maximu 540 nm. Betakyany se ve velkém množství vyskytují v červené řepě. V malém množství se vyskytují v mexickém kaktusu Opuncii. Mezi betakyany řadíme betanin, isobetanin, probetanin a neobetanin, z nichž nejvýznamnějším je betanin (betanidin-5-O- β -glukosid). Betanin ve své molekule obsahuje aminoskupinu, která má funkci donoru elektronů a molekula tak působí jako antioxidant. Betanin bývá z řepy extrahován a využívá se v potravinářství pod kódem E162. Betakyany svojí barvou připomínají antokyany, proto se dříve nazývali jako dusíkaté antokyany (Khan a Parvatam, 2015; Miguel, 2018).

- **Betaxantiny**

Zahrnují pigmenty žluté až oranžové barvy. Betaxantiny jsou ve velké míře zastoupeny v Opuncii, v malé míře v červené řepě. Jsou to fluoreskující pigmenty s absorpčním maximem při vlnové délce 480 nm. Mezi betaxantiny řadíme vulgaxantiny, miraxantin a indikaxantin. Hlavními zástupci jsou vulgaxantiny. Vulgaxantiny jsou skupinou žlutých rostlinných pigmentů, které se nejvíce vykytují v červené řepě. Vulgaxantinů je pět typů, a to vulgaxantin I, II, III, IV a V. V červené řepě je vulgaxantin I (Khan a Parvatam, 2015; Miguel, 2018).

7.2.1 Biosyntéza betalainů

Biosyntéza betalainů je znázorněna na obrázku č. 13 (str. 45). Syntéza začíná hydroxylací L-tyrozinu na L-DOPA. Reakce je katalyzována enzymem tyrozinázou. Enzym byl objeven v rostlinách, které tyto barviva obsahují. Také byl enzym získáván z hub rodu *Amanita muscaria*, jež produkují betalainům příbuzné pigmenty (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

Akumulace L-DOPY, která je nezbytná pro vznik kyseliny betalamové, vyžaduje zastavení oxidace L-DOPY na *o*-DOPA-chinon, prováděné tímto samým enzymem (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

L-DOPA je pak substrátem pro druhý enzym této cesty, 4,5-seco-DOPU extradiol-dioxygenázu. Tento enzym katalyzuje extradiolové štěpení L-DOPY na 4,5-seco-DOPU. Kyselina betalamová vzniká ze 4,5-seco-DOPY spontánní

mezimolekulární kondenzací mezi aminovou skupinou, přítomnou v L-DOPA, a enzymaticky produkovanou aldehydovou skupinou (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

Žluté betaxantiny jsou pak získávány kondenzací kyseliny betalamové s aminy a amino kyselinami. Předpokládá se, že reakce probíhá spontánně mezi amino-skupinou aminů a aldehydovou skupinou betalamové kyseliny do formy příslušného iminu (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

Syntéza betakyanů je poměrně složitější než betaxantinů, a proto popisují pouze syntézu betaninu, jako nejčastějšího zástupce betakyanů u rostlin. L-DOPA, v nepřítomnosti redukujících látek, je transformována tyrozinázou na *o*-DOPA-chinon využívající molekulární kyslík. Poté amino-skupina provádí mezimolekulární nukleofilní atak na kruh, vedoucí ke spontánní cyklizaci a vzniká forma molekuly leuko-DOPA-chrom, také známá pod pojmem cyklo-DOPA. Alternativně může být prováděna konverze L-DOPY na cyklo-DOPU, pomocí cytochromu P450 (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

Tyto navržené reakce se musí potýkat s nestabilitou leuko-DOPA-chromu, jež podléhá spontánní oxidaci na DOPA-chrom, se současným snížením molekuly DOPA-chinonu zpět na L-DOPU. To znamená že, v nepřítomnosti redukčního činidla jsou přítomny DOPA-chrom a necyklo-DOPA v médiu. Kromě toho DOPA-chrom se bude vyvíjet dále, aby dal vzniku hnědých polymerů, charakteristických pro enzymatické hnědnutí (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

Jedinou cestou, jak získat leuko-DOPA-chrom z L-tyrozinu nebo L-DOPY, je dosažením DOPA-chrom stavu v nepřítomnosti redukčních činidel a předtím, než vznikají hnědé polymery, ho nechat reagovat s redukčním činidlem, které je schopno přeměnit DOPA-chrom na leuko-DOPA-chrom (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

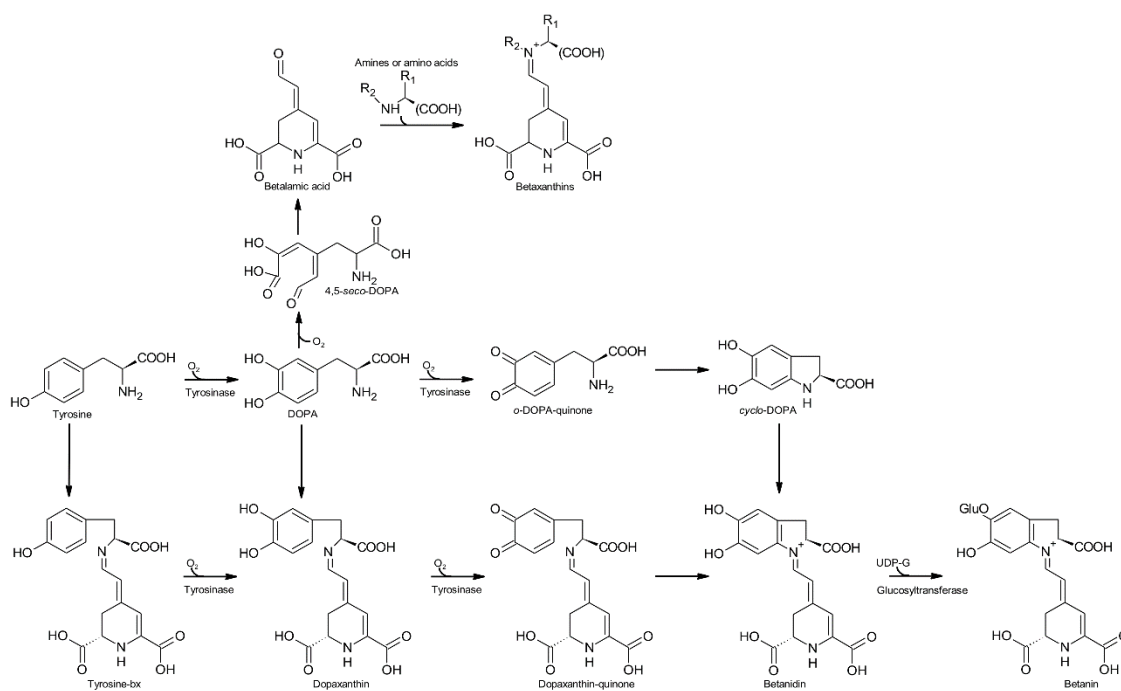
Z leuko-DOPA-chromu se poté tvoří betanidin, který je klíčovým mezikrokem v syntéze betakyanů. Tyto reakce, ale musí být prováděné *in vitro* (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

Tvoření betanidinu může být také vysvětleno, pokud zvážíme roli tyrozin – betaxantinu a dopaxantinu. Za prvé tyrozin – betaxantin je získáván kondenzací L-tyrozinu a kyselinou betalamovou. Tento pigment je substrátem pro monofenolázovou aktivitu tyrozinázy, která katalyzuje jeho konverzi na druhý pigment dopaxantinu. Dopaxantin se sám projevuje jako substrát pro tyrozinázu, která ho konvertuje na dopaxantin-chinon. Jak se stává s volnou L-DOPOU, když je dopaxantin udržován v přítomnosti tyrozinázy a redukčního činidla, dojde k navrácení se k *o*-chinonu, počátečnímu pigmentu. Podmínky pro vznik betanidinu z dopaxantin-chinonu nebyly určeny, ale reakce je opravdu možná a vznik betanidinu může být upřednostňován *in vivo* (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

Betanidin může být přeměňován na betanin enzymem betanidin-5-*O*-glukosyltransferázou, která v sobě zahrnuje glukózový zbytek na hydroxylové skupině v pozici 5. Transformace betaninu zpět na betanidin je možná, díky aktivitě β -glukosidázy. Tento pigment je také substrátem pro tyrozinázu, která zde katalyzuje přeměnu betanidinu na betanidin-chinon, přičemž se spotřebovává kyslík z tkání. Kyselina askorbová neboli vitamín C, navrací betanidin-chinon zpět na betanidin (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

Betanin může také vznikat tak, že leuko-DOPA-chrom (cyklo-DOPA) je pomocí enzymu glukosyltransferázy, glykosylována na cyklo-DOPA-glukosid a následně kondenzována získaným glukosidem s kyselinou betalamovou (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).

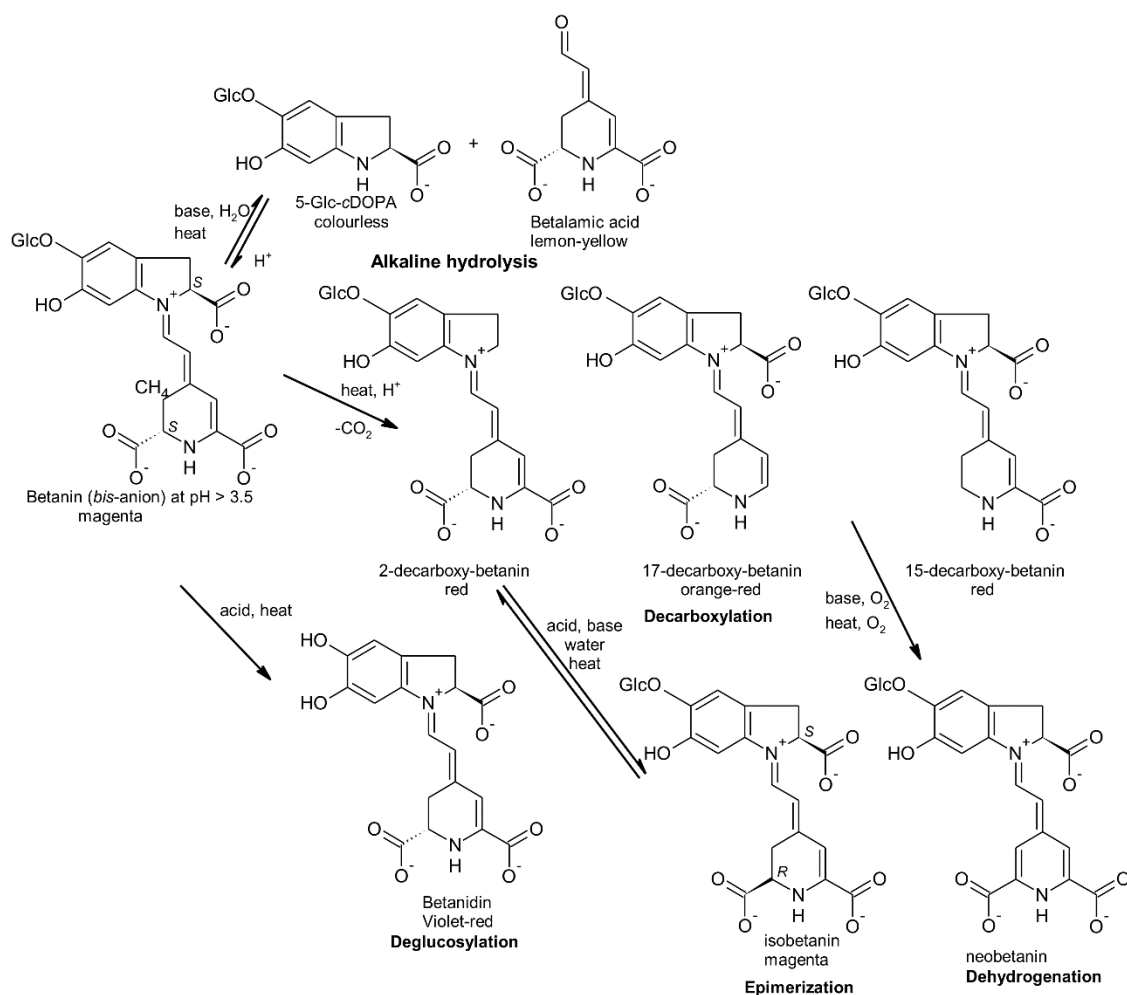
I když glykosylace chrání betanin před nestabilitou, která je popsána u betanidinu, zbývající hydroxylová skupina může být stále oxidována enzymem peroxidázou na betaninový radikál (Gandía-Herrero a García-Carmona, 2013; Polturak a Aharoni, 2018; Miguel, 2018).



Obrázek 13 – Biosyntéza betalainů (Miguel, 2018)

7.2.2 Degradace betalainů

Navzdory tomu, že jsou betalainy stabilnější než antokyany, je zde několik faktorů, které nepříznivě působí na jejich stabilitu a těmi jsou: $\text{pH} < 3$ nebo > 7 , vysoká aktivita vody, kovové kationty (Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cu^+ , Sn^{2+} , Al^{3+} , Hg^{2+} , Cr^{3+}), vysoká teplota, světlo, malý obsah pigmentu, a další. Teplota nejčastěji indukuje dehydrogenaci v přítomnosti kyslíku (oxidace), aldiminový konec hydrolyzu a dekarboxylaci betalainů, která indukuje barevnou změnu na oranžovo-červenou. Při hodnotách $\text{pH} < 3$ je struktura betalainů konvertována z aniontové formy na kationtovou, způsobující viditelnou změnu z červeného zbarvení na fialové. Při hodnotách pH větších než 7 dochází k hydrolyze aldiminovým koncem betalainů, která dává vzniku betalamové kyseliny a cyklo-DOPA-5-O-glukosidu. To vidíme jako barevnou změnu na žlutohnědou. Kovové ionty mohou podporovat oxidaci betalainů s následnou ztrátou barvy. Epimerizace je další proces, který může nastat (Miguel, 2018; Azeredo, 2009). Obrázek č. 14 představuje všechny možné chemické procesy, které mohou nastat u betaninu.



Obrázek 14 – Degradace betaninu a další cesty degradace (Miguel, 2018)

7.2.3 Extrakce, separace, identifikace a kvantifikace betalainů

Betalainy jsou běžně extrahovány z rostlinného materiálu macerovanou (kvašenou) extrakcí s vodou, v chladu nebo při pokojové teplotě nebo Soxhletovou extrakcí. Pro kompletní extrakci je spíše preferováno použití metanolvých nebo etanolvých roztoků (20-50%) (Miguel, 2018; Azeredo, 2009).

Před extrakcí je nutné vzorek zahřát na teplotu 70 °C po dobu 20 minut, aby se zabránilo možnému destrukci některých pigmentů. Malé okyselení kyselinou chlorovodíkovou či kyselinou citrónovou nebo kyselým alkoholem (0,4 - 1% HCl) může být použito k precipitaci betacyanů. Přídavek 95% etanolu poskytuje betaxantiny. Avšak byly nalezeny další techniky pro extrakci betalainů, zejména z červené řepy, za účelem zlepšení výtěžnosti v krátkém čase, zlepšení permeability buněčné membrány a zlepšení životního prostředí. Mezi tyto techniky patří: difúzní extrakce, ultrafiltrace, reverzní osmóza a volná reverzní osmóza, kryogenní tání, vodní dvoufázová extrakce,

pulsní elektrické pole a gama ozáření, mikrovlnné a ultrazvukově-pomocné extrakce (Miguel, 2018; Azeredo, 2009).

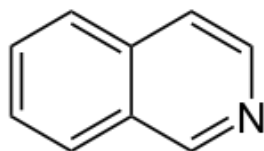
Čištění a separace betalainů je nutno udělat před kvantitativní a kvalitativní analýzou, abychom eliminovali možné rušivé sloučeniny. Chromatografické a elektroforetické metody se používají nejčastěji (Miguel, 2018; Azeredo, 2009).

Pro separaci těchto pigmentů se používá iontová chromatografie na kationtovém nosiči pryskyřice, následovaná adsorpční chromatografií na polyamidovém sloupci nebo sekvenční chromatografií na řadě iontových výměníků Sephadex (Miguel, 2018; Azeredo, 2009).

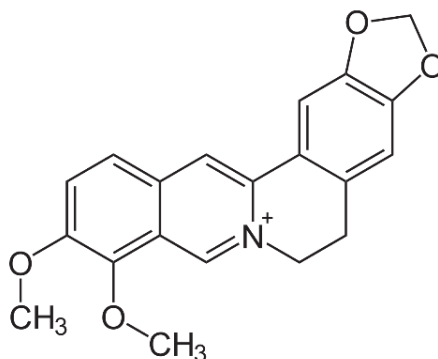
Separace, identifikace a kvantifikace betalainů může být provedena vysoko výkonnostní kapalinovou chromatografií s ultrafialovou detekcí, fotodiodovou detekcí, hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetickou rezonanční detekcí s využitím reverzních fázových sloupců a binárních gradientních roztoků (okyselená voda s kyselinou mravenčí 2-5%), acetonitrilu nebo metanolu. Jelikož betaxantiny jsou fluoreskujícími pigmenty, mohou se také stanovovat fluorescenčními metodami (Azeredo, 2009; Miguel, 2018).

8 Izochinoliny

Jsou to barviva odvozená od izochinolinu (obrázek č. 15). Jedná se o dva šestičlenné heterocykly, kdy na místě druhého uhlíku je dusík. Tato barviva se vyskytují v rostlině dřívěšálu obecném (*Berberis vulgaris*). Tyto látky se používají v boji proti nádorovým onemocněním, jelikož jsou součástí protinádorové léčby. Nejvýznamnějším zástupcem je berberin (obrázek č. 16). Ten našel využití jako žluté potravinářské barvivo a hořčidlo alkoholických nápojů v některých zemích. Vyskytuje se v množství asi 1 % ve všech částech dřívěšálu obecného a jiných dřívěšálech, zejména v kořenech a kůře, ale také v listech a nezralých plodech. Berberin obsahuje také mahonie cesminolistá (*Mahonia aquifolium*) a další rostliny rodu dřívěšálovitých (*Berberidaceae*) a vodilka kanadská (*Hydrastis canadensis*) z čeledi pryskyřníkovitých (*Ranunculaceae*). Berberin vykazuje antibakteriální, sedativní, laxativní a jiné účinky. Pro poměrnou toxicitu a vedlejší účinky se v řadě zemí nepoužívá (Velíšek a Hajšlová, 2009).



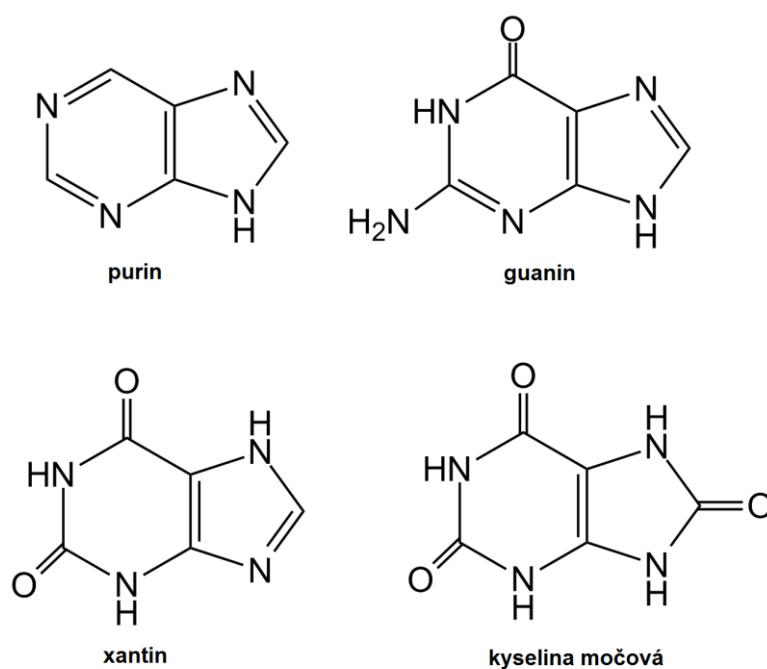
Obrázek 15 – Strukturální vzorec izochinolinu (Chemsynthesis team, 2008-2018)



Obrázek 16 – Strukturální vzorec berberinu (Tomen, 2018)

9 Puriny

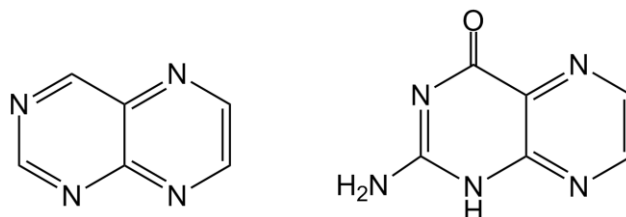
Barviva z této skupiny jsou odvozená od purinu (obrázek č. 17). Purin je dvoučlenný heterocyklus tvořený jedním šestičlenným heterocyklem a jedním pětičlenným. Patří sem pigmenty jako guanin, xantin a močová kyselina (obrázek č. 17), které jsou významnými pigmenty živočišné říše. Samotné sloučeniny jsou bezbarvé, ale ve formě mikrokrystallů nebo granulí jsou základem bílých, krémových a stříbřitých polotransparentních pigmentů například v šupinách ryb (Velíšek a Hajšlová, 2009).



Obrázek 17 – Strukturní vzorce purinu, guaninu, xantinu a kyseliny močové (Vaněk, 2018; Seghal a Jasuja, 2018)

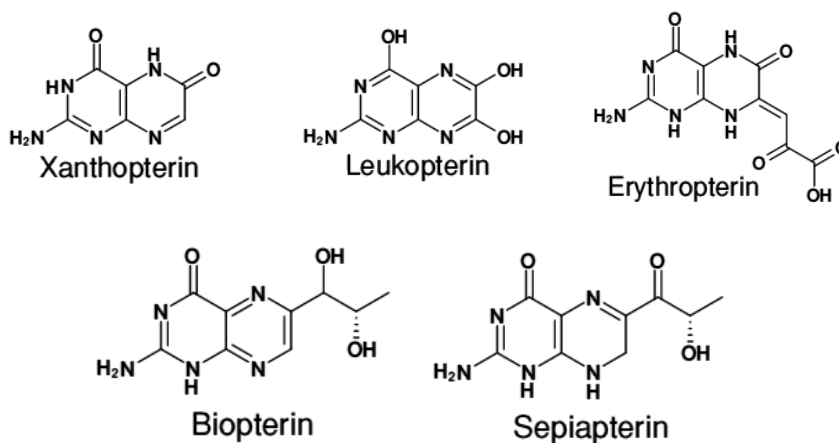
10 Pteriny

Základním skeletem pterinových barviv je pteridin (obrázek č. 18). Pteridin substituovaný v poloze 2 aminoskupinou a v poloze 4 keto skupinou se nazývá pterin (Velíšek a Hajšlová, 2009) (obrázek č. 18).



Obrázek 18 – Strukturní vzorec pteridinu (vlevo) a pterinu (vpravo) (National center for biotechnology information, 2018)

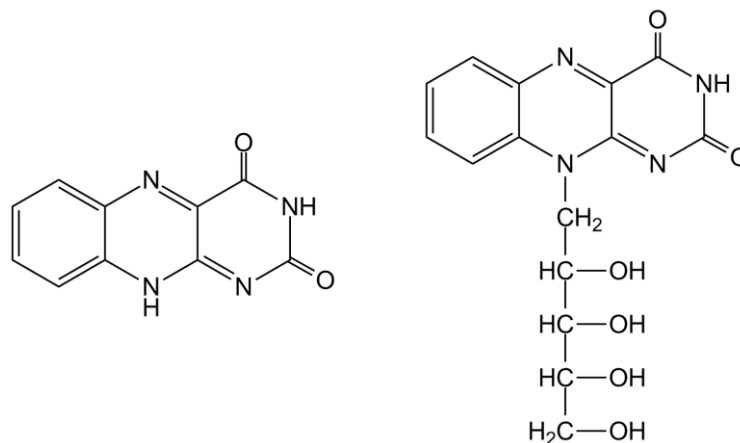
Významnými pterinovými barvivy jsou žlutý xantopterin a bílý leukopterin (obrázek č. 19), které jsou pigmenty motýlích křídel a některých druhů hmyzu (například vos). Xantopterin byl získán z křídel žluťásky, leukopterin je pigmentem křídel bělásků. Další žluté, oranžové a červené pteriny se nacházejí jako pigmenty některých korýšů, ryb, obojživelníků a plazů. Příkladem červených pterinů je erythropterin (obrázek č. 19), který se nachází v křídlech motýlů, hnědých biopterin (obrázek č. 19) a žlutých sépiopterin (obrázek č. 19), který je pigmentem sépií (Velíšek a Hajšlová, 2009; Wild flower finder, 2005-2018).



Obrázek 19 – Strukturní vzorce xantopterinu, leukopterinu, erythropterinu, biopterinu a sépiopterinu (Wild flower finder, 2005-2018)

11 Flaviny (izoalloxaziny)

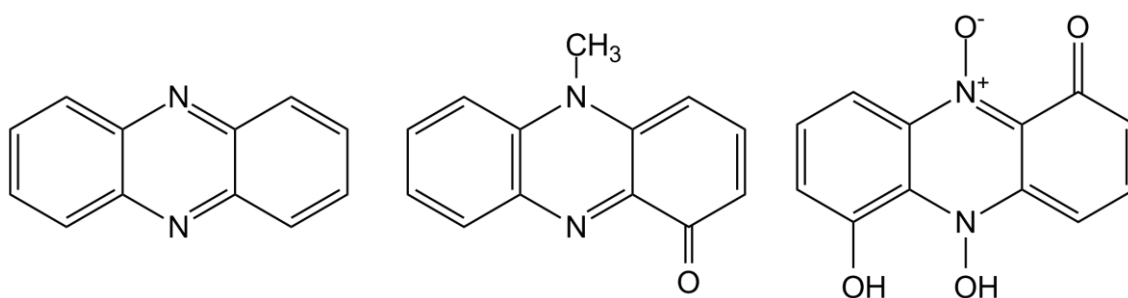
Tato barviva jsou odvozena od sloučeniny izoalloxazinu (obrázek č. 20). Izoalloxazin je žlutá látka se třemi kondenzovanými cykly s dusíkem v poloze 1, 3, 5, 10. Nejvýznamnější sloučeninou je riboflavin (obrázek č. 20), který je známý jako vitamín B2. Riboflavin se rovněž používá jako žluté potravinářské barvivo (Velíšek a Hajšlová, 2009).



Obrázek 20 – Strukturní vzorec izoalloxanzinu (vlevo) a riboflavinu (vpravo) (National center for biotechnology information, 2018; Wild flower finder, 2005-2018)

12 Fenaziny

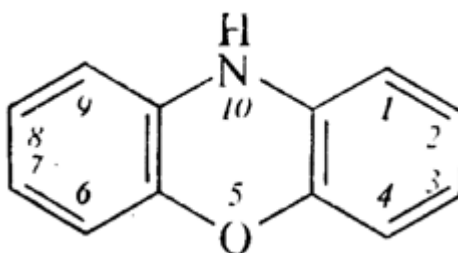
Pigmenty odvozené od fenazinu (obrázek č. 21) jsou příbuzné flavinovým pigmentům. Fenazin je sloučenina, která také obsahuje tři kondenzované cykly, ale má dusík jen v poloze 5 a 10. Tyto pigmenty se vyskytují u některých bakterií, především u bakterií náležejících do rodu *Pseudomonas* a *Streptomyces*. S výjimkou tmavě modrého pyokyanu (obrázek č. 21) a modrofialového jodinu (obrázek č. 21) má většina fenazinu žlutou barvu. Příležitostně se tyto pigmenty nacházejí i v živočišných tkáních v souvislosti s invazí příslušných mikrobů, například v infikovaných ranách (Velíšek a Hajšlová, 2009).



Obrázek 21 – Strukturní vzorec fenazinu (vlevo), pyokyanu (uprostřed) a jodinu (vpravo)
(National center for biotechnology information, 2018; Bařinová, 2013)

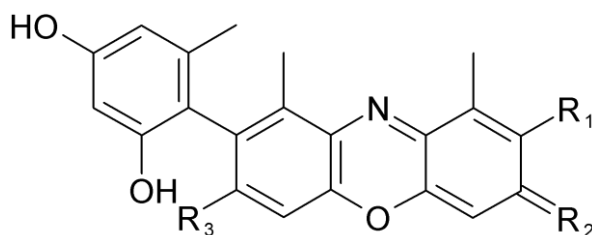
13 Fenoxaziny

Fenoxaziny jsou barviva odvozená od sloučeniny fenoxazinu (obrázek č. 22). Tato sloučenina má také tři kondenzované cykly jako fenazin, ale v pozici 5 má kyslík místo dusíku. Fenoxaziny se vyskytují hlavně u lišejníků, a to nejčastěji ve formě nebarevných prekurzorů. Barviva získávaná z lišejníků reakcí s amoniakem a oxidací vzduchem se od pradávna používala jako textilní barviva. Barvivem získávaným z lišejníku skalačka barvířská (*Rocella tinctoria*) je fialový lakmus, který se používal k barvení nápojů (Velíšek a Hajšlová, 2009).

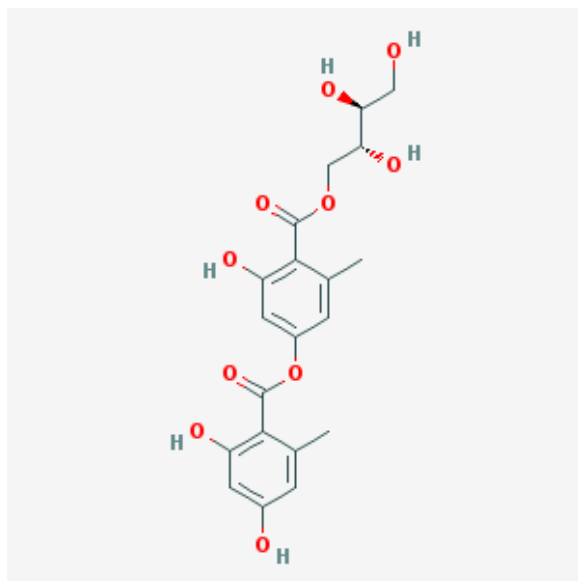


Obrázek 22 – Strukturální vzorec fenoxazinu (Velíšek a Hajšlová, 2009)

Důležitou skupinou fenoxazinů jsou tzv. orceinová barviva známá jako orchil. Dnes pocházejí zejména z Azorských a Kanárských ostrovů. Orchil je purpurový až červenofialový pigment získávaný z lišejníků rodu *Rocella* a *Orchella*. Základním pigmentem orchilu je purpurový orcein (obrázek č. 23). Je směsí různých hydroxy- a aminofenoxazinů. Jeho prekurzorem v lišejnících je erytrin (obrázek č. 24). Barvivo je málo rozpustné ve vodě, ale je dobře rozpustné v etanolu. Sulfonací orceinu se připravuje barvivo rozpustné ve vodě, které se používá pro barvení nealkoholických nápojů a cukrovinek (Velíšek a Hajšlová, 2009).

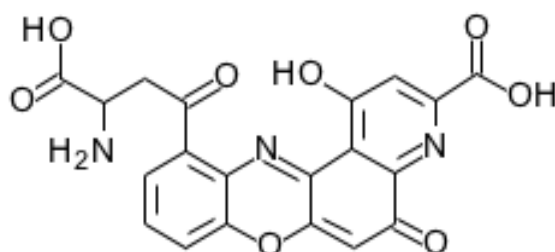


Obrázek 23 – Strukturální vzorec orceinu (Hoffmeier, 2007)



Obrázek 24 – Strukturní vzorec erytrinu (National center for biotechnology information, 2018)

Fenoxaziny jsou také žluté až hnědé a hnědočervené pigmenty vyskytující se u bezobratlých živočichů a některých obratlovců, například jako pigmenty očí registrující rozptýlené světlo. Významné jsou zejména pigmenty zvané ommochromy. Příkladem je žlutý pigment xantommatin (obrázek č. 25) obsahující vázanou kyselinu asparagovou (Velíšek a Hajšlová, 2009).



Obrázek 25 – Strukturní vzorec xantommatinu (National center for biotechnology information, 2018)

Závěr

V této práci jsem se věnovala tématu Přirozená barviva, konkrétně dusíkatým heterocyklickým sloučeninám. Uvedla jsem rozdělení přirozených barviv podle jejich struktury a následně jsem rozdělila dusíkaté heterocyklické sloučeniny do podskupin podle jejich chemické struktury. Dále jsem uvedla charakteristiku jednotlivých skupin dusíkatých heterocyklických sloučenin.

V další části jsem se zaměřila na možnosti stanovení a uvedla nemoci, které jsou spojeny s poruchou v metabolismu těchto barviv.

Dusíkaté heterocyklické sloučeniny jsou skupinou přirozených barviv, které se vyskytují všude kolem nás a hrají důležitou roli jako antioxidanty. Pyrrolová barviva se vyskytují v živočišných a rostlinných buňkách a vytváří tak charakteristické zbarvení. Metabolismus těchto barviv je velmi citlivý na vnější a vnitřní faktory. Jakákoliv menší změna může způsobit vážnou poruchu, například anémie, hyperbilirubinémie a další.

Indolová barviva se vyskytují především v rostlinách. Používají se k barvení tkanin a jako potravinářská barviva. Také patří mezi významné antioxidanty.

Izochinolinová, purinová, pterinová, flavinová, fenazinová a fenoxazinová barviva se vyskytují v rostlinách, lišejnících a v živočišných schránkách. Tyto barviva se používají k barvení potravin, nápojů, dávají se do léčiv či jsou významnými vitamíny.

Například izochinolinová barviva se používají k léčbě nádorových onemocnění. Flavínová barviva patří mezi vitamíny, které ovlivňují kvalitu pleti, zlepšují metabolismus a další. Purinová barviva jsou součástí nukleových kyselin, podílejí se na vzhledu rybích šupin atd. Mezi pterinová barviva patří významný vitamín rozpustný ve vodě, a to kyselina listová (B9). Ta hraje důležitou roli v prvním trimestru těhotenství, jelikož se podílí na správném vývoji nervové soustavy plodu. Fenazinová barviva patří mezi bakteriální pigmenty a fenoxazinová barviva našla využití v potravinářském průmyslu.

Bibliografie

- [1] AZEREDO, H., 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, Issue 44, p. 2365–2376.
- [2] BAŘINOVÁ, M., 2013. *Tvorba Iodininu u bakterie Acidithiobacillus thiooxidans*, Brno: MASARYKOVA UNIVERZITA, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, ÚSTAV BIOCHEMIE.
- [3] BROWN A TROXLER, 2018. Heme Degradation and Bilirubin Formation. *Bilirubin, Volume II: Metabolism*, p. 38.
- [4] BURTIS ET AL., 2006. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4. editor United States of America: St. Louis, Mo. : Elsevier Saunders.
- [5] CERBINO ET AL., 2015. Acute Intermittent Porphyria in Argentina: An Update. *Biomed Research International*, p. 8.
- [6] COTTON, S., 2011. *2,4,6-Tribromophenol (TBP), (and some other natural organobromine compounds, notably Tyrian Purple)*, Birmingham: University of Birmingham.
- [7] DOUMA, M., 2008. *Pigments from Animals and Plants*. [Online] Available at: <http://www.webexhibits.org/causesofcolor/7.html> [Přístup získán 28 červen 2017].
- [8] EMMEROVÁ, T., 2008. *Působení kademnatých iontů na chlorofyl a a b v thylakoidní membráně a v methanolovém extraktu*, Praha: Univerzita Karlova v Praze.
- [9] GANDÍA-HERRERO A GARCÍA-CARMONA, 2013. Biosynthesis of betalains: yellow and. *Trends in Plant Science*, červen, 18(6), pp. 334-343.
- [10] GAZZIN ET AL., 2016. A Novel Perspective on the Biology of Bilirubin in Health and Disease. *Trends in Molecular Medicine*, september, 22(9), p. 758–768.

- [11] HALEY, K., 2017. Congenital Haemolytic Anemia. *Medical Clinics of North America*, March, 101(2), pp. 361-374.
- [12] HOFFMEIER, K., 2007. *Chemical Structure of Orcein..* místo neznámé: autor neznámý
- [13] HÖRTENSTEINER A KRÄUTER, 2011. Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Srpen, 1807(8), pp. 977-988.
- [14] HRUDOVÁ, E., 2011. *Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.* [Online]
Available at: http://web2.mendelu.cz/af_291_sklad/frvs/hrudova/index.htm
[Přístup získán 27 červen 2017].
- [15] CHANDRASEKHAR ET AL., 2015. Differential partitioning of betacyanins and betaxanthins employing aqueous two phase extraction. *Journal of Food Engineering*, Leden, Issue 122, pp. 156-163.
- [16] CHEMSYNTHESIS TEAM, 2008-2018. *CHEMSYNTHESIS, CHEMICAL DATABASE.* [Online]
Available at: <http://www.chemsynthesis.com/about.html>
[Přístup získán 31 Květen 2018].
- [17] CHUNG ET AL., 2017. Erythropoietin signaling regulates heme biosynthesis. *eLife*, 29 Květen, Issue 6.
- [18] IKEDA-SAITO, M., 2013. A New Way to Degrade Heme. The Mycobacterium tuberculosis Enzyme MhuD Catalyzes Heme Degradation without Generating CO. *Journal of Biological Chemistry*, Issue 288, pp. 10101-10110.
- [19] JANZ ET AL., 2013. Anemia in the emergency department: evaluation and treatment.. *Emerg Med Pract.*, Listopad, pp. 1-15.
- [20] JIRÁSEK A VAVRO, 2008. *Nerostné suroviny a jejich využití.* Ostrava: Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR & Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava.

- [21] KHAN A PARVATAM, 2015. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, 20 červenec, Issue 117, pp. 267-295.
- [22] KOOLMAN, J., 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. 2. editor Stuttgart(Germany): Thieme.
- [23] KOZMÍK, V., 2012. *Heterocyklické sloučeniny*. [Online] Available at: http://old.vscht.cz/uoch/cz/download/Heterocyklicke_slouceniny.pdf [Přístup získán 28 červen 2017].
- [24] KUMAR A SOELL, 2000. Antisense HEMA1 RNA Expression Inhibits Heme and Chlorophyll Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 1 January, Issue 122, pp. 49-55.
- [25] KUNERT, J., 1999. K čemu potřebujeme myoglobin?. *Vesmír*, Únor, Issue 78, p. 72.
- [26] LI ET AL., 2016. Rapid and sensitive detection of hemoglobin with gold nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 14 červen, Issue 685, pp. 820-827.
- [27] MARANGONI, A. G., 2017. Chlorophyll Degradation in Green Tissues: Olives, Cabbage and Pickles.. *Kinetic Analysis of Food Systems.*, 17 Únor, pp. 55-63.
- [28] MARTINS ET AL., 2015. Heterocyclic Anticancer Compounds: Recent Advances and the Paradigm Shift towards the Use of Nanomedicine's Tool Box. *Molecules*, 16 Srpen, 20(9), pp. 16852-16891.
- [29] MASOPUST A PRŮŠA, 1999. *Patobiochemie metabolických drah*. 1. editor Praha: Univerzita karlova.
- [30] MCMURRAY, J., 2007. *Organická chemie*. Brno: Vutium.
- [31] MIGUEL, M. G., 2018. Betalains in Some Species of the Amaranthaceae. *Antioxidants*, 4 Duben, 7(4), p. 53.

- [32] MINAI-TEHRANI ET AL., 2017. Inhibition of pseudoperoxidase activity of human red blood cell hemoglobin by methocarbamol. *International Journal of Biological Macromolecules*, Leden, Issue 94, pp. 788-792.
- [33] MORTADA, I., 2009. [Online]
Available at: <https://mortada8.wordpress.com/category/human-anatomy-physiology/the-blood/>
[Přístup získán 22 Únor 2017].
- [34] MURRAY, R. K., 2012. *Harpenova ilustrovaná biochemie*. Praha: Galén, spol. s.r.o..
- [35] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018.
místo neznámé: autor neznámý
- [36] OROIAN A ESCRICHE, 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, Srpen, Issue 74, pp. 10-36.
- [37] PANINI, S. R., 2013. *Medical Biochemistry an illustrated review*. New York: Thieme.
- [38] PATHAK A MADAMWAR, 2010. Biosynthesis of Indigo Dye by Newly Isolated Naphthalene-Degrading Strain *Pseudomonas* sp. HOB1 and its Application in Dyeing Cotton Fabric. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, March, 160(6), p. 1616–1626.
- [39] PATOČKA A JEŘÁBKOVÁ, 2013. *Toxicology*. [Online]
Available at: www.toxicology.cz
[Přístup získán 30 Květen 2018].
- [40] PAUK ET AL., 2007. Characterization of natural organic colorants in historical and art objects by high-performance liquid chromatography. *JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE*, Prosinec, 37(23), pp. 3393-3410.
- [41] POLTURAK A AHARONI, 2018. “La Vie en Rose”: Biosynthesis, Sources, and. *Molecular Plant*, Leden, Svazek 11, pp. 7-22.
- [42] PROCHÁZKA ET AL., 1998. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia.

- [43] REINBOTHE ET AL., 2010. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends in Plant Science*, November, 15(11), pp. 614-624.
- [44] ROSENTHAL A GLEW, 2009. *Medical Biochemistry, Human metabolism in health and disease*. New York: Wiley.
- [45] ROUBAL, J., 2001. *Základy chemie přírodních látek*, Duchcov: Gymnázium v Duchcově,
- [46] SAKURABA A SCHELBERT, 2012. STAY-GREEN and Chlorophyll Catabolic Enzymes Interact at Light-Harvesting Complex II for Chlorophyll Detoxification during Leaf Senescence in Arabidopsis. *The Plant Cell*, February, 24(2).
- [47] SEGHAL A JASUJA, 2018. *Purines vs pyrimidines*. místo neznámé: autor neznámý
- [48] SCHUSTER, J., 2017. *University of Illinois Extension*. [Online] Available at: <http://extension.illinois.edu/focus/index.cfm?problem=chlorosis> [Přístup získán 27 červen 2017].
- [49] STEINGRUBER, E., 2004. Indigo and Indigo Colorants. *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 15 srpen.
- [50] STRACK ET AL., 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 27 Únor, 3(62), pp. 247-269.
- [51] SZOCSOVÁ, Z., 2010. *O škole*. [Online] Available at: http://www.oskole.sk/?id_cat=5&clanok=10077 [Přístup získán 28 červen 2017].
- [52] TOMEN, D., 2018. *Nootropicexpert*. [Online] Available at: <https://nootropicexpert.com/about/> [Přístup získán 31 Květen 2018].
- [53] TOTH, A., 2008. *Biomolekule myoglobine*. místo neznámé: autor neznámý

- [54] VANĚK, H., 2018. *Slide player*. [Online]
Available at: <http://slideplayer.cz/slide/3388020/>
[Přístup získán 31 Květen 2018].
- [55] VEJMELKOVÁ ET AL., 2015. *Ústav technologie vody a prostředí VŠCHT Praha*. [Online]
Available at:
http://tvp.vscht.cz/files/uzel/0018868/C_B0d4z3qEwpyk_KzM_JT89MjXfOyMkvyk-rzAEA.pdf?redirected
[Přístup získán 27 červen 2017].
- [56] VELÍŠEK A HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin*. 3. editor Tábor: Osis.
- [57] VELÍŠEK A HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin II*. 3. editor Tábor: OSSIS.
- [58] VÍTEK, L., 2009. *Bilirubin a interní choroby, Význam pro kliniku a praxi*.
Praha: Grada Publishing a.s..
- [59] WILD FLOWER FINDER, 2005-2018. *WILD FLOWER FINDER*. [Online]
Available at: <http://wildflowerfinder.org.uk/>
[Přístup získán 31 Květen 2018].