

Festina lente

Toto latinské úsloví ctili už naši předkové a znamená – *pospíchej pomalu*. Podívejme se na tuto zásadu z dnešního pohledu životního stylu, klesajících zásob ropy, znečišťování životního prostředí, kdy řešíme problémy, jako jsou náhrada částí ropných produktů v motorových palivech bio-složkami, produkce skleníkového oxidu uhličitého, nárůst dopravních nehod, materiálních škod, zranění a úmrtí při nich atd. Klíčem k systémovému řešení všech těchto zmíněných problémů je pomalejší rychlost v silniční dopravě.

Každý řidič u nás samozřejmě ví, že v obci a mimo ni má jezdit rychlostí 50 resp. 90 km/h, na dálnici pak maximálně 130 km/h. Zde předesílám, že třeba v Kanadě (a to je nějaká rozlehlá země) je „speed limit“ na dálnici jen 110 km/h a od tamních přátel vím, že policie toleruje maximální překročení rychlosti o hodnotu nejvýše 10 km/h, v opačném případě se udělají přísné pokuty v řádech stovek tamních dolarů a také povinné absolvování opakovacích víkendových kurzů z pravidel silničního provozu. Naopak v naší maličké česko-moravsko-slezské kotlině jsou dokonce naši vrcholní zastupitelé ochotni dlouhé hodiny diskutovat o tom, jestli by nebylo záhodno maximálně povolenou dálniční rychlost navýšit třeba na 160 km/hod, nebo toto omezení vůbec zrušit...

Analyzujeme výše uvedené problémy s využitím elementárních poznatků přírodních věd a položíme si následující otázky:

- Co určuje spotřebu paliva ve spalovacím motoru automobilu?
- Jaké je využití energie paliva při jízdě automobilem?
- Proč závisí produkce oxidu uhličitého na rychlosti a stylu jízdy řidiče?
- Uspokojí bio-paliva stále více spěchající populaci?

Na první otázku každý motorista jasně odpoví, že spotřebu paliva ve značné míře určuje rychlost vozidla. Ostatně údaje o tom obsahuje každý technický průkaz vozidla. Přitom málo kdo při řízení vozidla sleduje vedle rychloměru také otáčkoměr. Je snad každému jasné, že otáčky motoru jsou v přímém vztahu k rychlosti nasávání palivové směsi do válců motoru. Styl jízdy je tedy dalším parametrem, který může každý motorista dosti snadno ovlivnit. V této souvislosti je zajímavé, že japonská automobilka Nissan již vyvinula plynový pedál, který vytváří zpětný tlak na řidičovo chodidlo v případě, že bude na tento pedál šlapat příliš prudce. Tento tzv. ECO-Pedal se bude montovat od příštího roku a má snížit spotřebu pohonných hmot o 5–10 % v závislosti na jízdních podmínkách.

Jak vypadá závislost spotřeby paliva na rychlosti vozidla, vyplývá z jednoduchých fyzikálních zákonů. Automobil při svém rovnoměrném pohybu na rovné silnici musí překonávat:

- odporovou sílu vzduchu, úměrnou druhé mocnině rychlosti vozidla,

- odpor pneumatik, odvalujících se po vozovce, který je úměrný hmotnosti vozidla.

Při akceleraci pak k těmto silám přistupuje ještě překonávání setrvačné síly.

Je tedy zjevné, že tato závislost není lineární a s rostoucí rychlostí a hmotností vozidla dramaticky narůstá spotřeba paliva. A tak si můžeme jen povzdechnout, proč si lidé opatřují stále hmotnější a rychlejší automobily, se kterými pak neustále akcelerují a poté zase brzdí...

Využití energie, obsažené v palivu závisí jednak na jeho složení a samozřejmě na její přeměně na energii mechanickou. Z termodynamiky vyplývá, že obsahuje-li palivo kyslíkaté sloučeniny (třeba bio-složky), má při spalování nižší energetický obsah, tedy má nižší spalné teplo. Tím má ale také motor vozidla tudíž nižší výkon. Důležitá je však možná méně známá okolnost (i když znalce 2. věty termodynamické až tolik jistě nepřekvapí), že asi pouze jen jedna čtvrtina energie (v níže citovaném pramenu se uvádí 24 %), generovaná ve válcích běžného spalovacího motoru automobilu, se přenesla na pohyb vozidla. Přitom třeba při rychlosti automobilu 90 km/h se z této čtvrtiny 2/3 energie spotřebují na překonávání aerodynamického odporu a zbytek spotřebovává valivý odpor kol a mechanické ztráty energie v převodech. Co je ale dosti důležité, přibližně polovina energie obsažené v palivu (46 %) odejde s horkými spalinami výfukem do atmosféry, pětina této energie (21 %) představují tepelné ztráty motoru přes jeho plášť a chladič a další desetina (9 %) jsou mechanické ztráty energie přímo v motoru (kliková hřídel, pohyby pístů, ventilů atd.).

Každému chemikovi je jasné, že produkce oxidu uhličitého výfuky aut je v přímém vztahu ke spotřebě paliva a tedy závisí jak na rychlosti, tak stylu jízdy řidiče. Tento vztah lze samozřejmě nalézt v literatuře (např. *Fuels and Engines*, IFP, TECHNIP Ed., Paris 1999). Pro konstantní rychlost běžného osobního automobilu po rovině a za ideálních povětrnostních podmínek, při bezvětří, nalezneme následující příklad spotřeby a produkce oxidu uhličitého (snahou konstruktérů automobilů je dnes dosáhnout cílové hodnoty 120 CO₂ g/km):

rychlost [km/h]	spotřeba paliva [l/100 km]	produkce CO ₂ [g/km]
60	3,7	84
90	5,1	116
120	6,8	154
150	9,1	205

Povzdech v tomto případě navozují také vzpomínky na „úsporu paliva a skleníkového CO₂“ při rychlé jízdě našich vysoce postavených činitelů buď na svatbu do Mariánských Lázní, či na tenisový zápas Davis cupu do Brna...

Na poslední otázku můžeme odpovědět asi jen negativně. Má-li se postupně zvyšovat podíl bio-složek v motorových palivech, jak to výrobcům ukládá legislativa EU, nezbyvá, než si povzdechnout nad tím, že tyto přísady se nám kvůli naší pohodlnosti při rychlé jízdě autem přemění z velké části na neužitečné teplo, neboť také 76 % těchto složek spolu s palivem pouze neužitečně shoří. Je nadmíru jasné, že produkce zemědělských plodin pro bio-paliva 1. generace (ethanol z cukrové třtiny, resp. obilnin pro zážehové motory nebo bio-diesel pro vznětové motory) nutně omezí rozlohu orné půdy nezbytnou pro výrobu potravin. Určité naděje se sice vkládají do bio-paliv 2. generace (lignocelulosové odpady ze zemědělské výroby, rychle rostoucí energetické plodiny, dřevné štěpky a pod.), ovšem, podle zákona zachování hmoty se stopové prvky, nezbytné

pro růst biomasy, přesunou jinam, než kde fotosyntéza probíhá. Je tedy jasné, že legislativní snížení povolené maximální rychlosti a její důsledné vymáhání jednoznačně zajistí větší úsporu ropných paliv v dopravě, než přísady do paliv biologického původu.

Závěrem si tedy coby řidiči vezměme jednoduché předsevzetí, spěchejme pomalu! Snadno pak dosáhneme žádoucích úspor ropných paliv v dopravě, snížíme produkci skleníkového oxidu uhličitého, nemusíme mít pak starosti s výrobou bio-složek pro motorová paliva, ušetříme ornou půdu pro produkci potravin a třeba také nebudeme mít tolik materiálních škod, mrzáků a pozůstalých po dopravních nehodách na silnicích.

*Jiří Hanika
Ústav chemických procesů AV ČR, v. v. i.*

ZAHRADA

SOUČASNÉ TRENDY HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

VERONIKA VIDOVÁ^a, KAREL LEMR^a
a VLADIMÍR HAVLÍČEK^b

^a Katedra analytické chemie, PřF UP Olomouc, Tr. Svobody 8, 771 46 Olomouc, ^b Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
vlhavlic@biomed.cas.cz

Došlo 17.1.08, přijato 21.5.08.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, hmotnostní mikroskopie, analýza povrchů

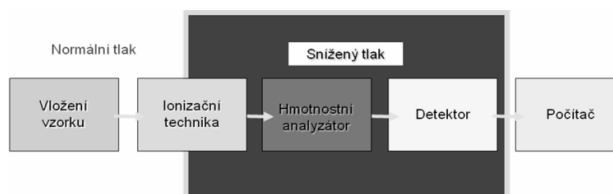
Hmotnostní spektrometrie je poměrně rozšířená moderní instrumentální technika, která je schopna analyzovat téměř jakýkoli materiál, ať už organický nebo anorganický. Metoda potřebuje minimální množství vzorku, který může mít opět téměř libovolnou formu (plazma, plyn, kapalina, tuhá látka) a umožňuje pracovat s čistými látkami i s velmi komplikovanými směsmi, jako je např. biologický materiál. Princip analýzy je založen na měření hmotnostních spekter, ze kterých je možno „přečíst“, často i velmi přesně, struktury měřených látek.

Hmotnostní spektrometrie rozhodně není doménou pouze vysoce specializovaných vědeckých laboratoří. S touto technikou se můžeme běžně setkat i přímo, např. během osobních bezpečnostních prohlídek na letištích, nebo zprostředkovaně, kdy je tato metoda použita např. v lékařství (jedná se třeba o diagnostiku nádorových onemocnění a metabolických poruch). Metoda je nezastupitelná pro kriminalisty (např. v souvislosti s identifikací drog, detekcí výbušnin, identifikací pachatelů zvláště nebezpečné trestné činnosti, apod.), hmotnostní spektrometrie je rozhodujícím nástrojem antidopingových kontrol, používá se v archeologii (při datování stáří předmětů) a geologii, v monitorování kvality životního prostředí, v toxikologii, chemii (zde třeba při sledování průběhu chemických reakcí), při kontrole kvality potravin, zemědělských produktů nebo předmětů denní potřeby obecně (dětské zboží, kosmetika, apod.). Hmotnostní spektrometry jsou součástí výbavy většiny vesmírných sond i některé speciální vojenské techniky. Farmaceutické firmy používají hmotnostní spektrometrii při hledání nových účinných léků „šitých“ na míru. Hmotnostní spektrometrie se používá i jako zobrazovací technika. Významnou úlohu hraje hmotnostní spektrometrie v otázkách národní bezpečnosti: technika dokáže odhalit a identifikovat látky, které mohou být zneužity při

terorismu a bioterorismu. Základní schéma obecného hmotnostního spektrometru ukazuje obr. 1.

Učebnicová definice říká, že hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která využívá separace urychlených ionizovaných částic (iontů) ve vakuu, a to podle jejich hmotnosti při jejich průchodu magnetickými a elektrickými poli. Hmotnostní spektrometr se skládá z pěti základních modulů. První z nich se váže ke vkládání vzorků (analyzovat lze téměř všechna skupenství). Druhý modul se týká ionizace vzorku, čili převedení analyzovaných elektroneutrálních molekul do nabitě formy. Vyrábíme ionty nesoucí kladný náboj (kationty) nebo záporný náboj (anionty) a způsobů, jak „výrobu“ provést, resp. jejich modifikací, existují desítky. Podobně je to se třetím modulem, tedy s hmotnostním analyzátozem. Metod analýzy hmotností iontů je celá řada, pro ilustraci jmenujme alespoň lineární iontovou past, iontový cyklotron, orbitrap a analyzátor z doby letu. To jsou moderní typy analyzátorů, které se v současnosti široce používají. Poslední dva moduly na obr. 1 pak zahrnují detekci iontů a zpracování získaných dat příslušnou výpočetní technikou. Všimněme si, že část celého procesu, zvláště analýza a detekce iontů, probíhá za vakua. A právě náklady na vakuovou techniku představují značný podíl z ceny celého přístroje. Relativně vysoká cena je snad jedinou nevýhodou hmotnostních spektrometrů.

Zařízení mohou být velmi malá a přenosná, ale jsou i typy spektrometrů, které měří několik metrů a váží řádově tuny. Složitost spektrometrů se řídí požadavky na kvalitu informace, kterou přístroj dává a samozřejmě platí, že čím je informace detailnější, tím je přístroj dražší. Takže lze pořídit přístroj za desítky milionů korun, ale třeba i za „pouhý“ milion korun. Jedno z těch dražších zařízení je instalováno v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd v Praze a stojí kolem 70 milionů korun (obr. 2). Jde o tzv. iontový cyklotron, jehož jádrem je supravodivý magnet o intenzitě pole 9,4 T. Srdcem tohoto spektrometru je cyklotronová cela, ve které jsou měřené ionty střídavě vybužovány radiofrekvenčními pulsy a následně detegovány. Každý z iontů je charakterizován svojí cyklotronovou frekvencí (té odpovídá hmotnost měřeného iontového druhu)



Obr. 1. Obecné schéma hmotnostního spektrometru



Obr. 2. Iontový cyklotron Bruker APEX-Q

a amplitudou detegovaného signálu (tomu zase odpovídá množství resp. počet analyzovaných iontů). Měření hmotností na tomto přístroji je extrémně přesné a dává přímou informaci o elementárním složení měřených iontů: víme tedy, z kterých prvků se měřená sloučenina skládají. Iontový cyklotron, podobně jako jiné typy hmotnostních analyzátorů, poskytuje tzv. kolizní nebo produktová spektra. Jde o speciální typy analýz, ze kterých lze získat i detailní strukturní informace o měřených látkách.

Hmotnostní spektrometrie byla vyvinuta počátkem 20. století a původně byla využívána zvláště ve fyzice a chemii, mj. byly pomocí této metody objeveny stabilní isotopy prvků. Po dlouhou dobu pak hmotnostní spektrometrie byla hlavní metodou analýzy ropných produktů a analýzy těkavých organických látek obecně. Během posledních dvaceti let se použití metody rozšířilo snad do všech oblastí přírodních věd, od geologie, přes fyziku, astronomii a chemii k biologii, k analýze životního prostředí, do farmacie a medicíny. Za vývoj technik hmotnostní spektrometrie byly uděleny celkem čtyři Nobelovy ceny za fyziku nebo chemii, ale využití této techniky bylo zásadní pro udělení i řady dalších Nobelových cen. Poslední Nobelova cena vyloženě za hmotnostní spektrometrii byla udělena Koichi Tanakovi a Johnu Fennovi v roce 2002. Bylo to za vynález ionizačních technik, které umožňují analyzovat i velmi velké a složité látky, jako jsou bílkoviny a nukleové kyseliny. Jednalo se o techniku desorpce a ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI) a ionizaci elektrosprejem (electrospray ionization, ESI). Objev těchto ionizačních technik dal vzniknout zcela novým odvětvím biologických věd, např. proteomice. Díky moderním hmotnostně spektrometrickým metodám lze nyní nejenom jednotlivé bílkoviny identifikovat, ale rovněž i zkoumat interakce mezi nimi a jinými biomolekulami, zjišťovat funkce jednotlivých bílkovin nebo jejich komplexů. Díky hmotnostní spektrometrii můžeme na molekulární úrovni zkoumat a následně ovlivňovat základní buněčné procesy.

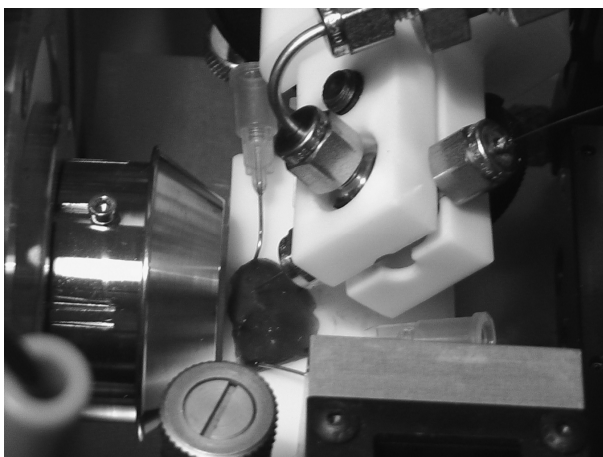
Proč právě hmotnostní spektrometrii?

Na rozdíl od jiných analytických přístupů tato metoda vyžaduje opravdu nepatrné množství měřené látky, např. 10^{-12} g. Je to nepředstavitelně malé množství, a proto se hmotnostní spektrometrie často používá ve stopové analýze čehokoli organického i anorganického. Další důležitá vlastnost této techniky tkví v její schopnosti „poradit si“ i s velmi komplikovanými směsmi látek a strukturní informace poskytnout rychle. Proto je hmotnostní spektrometrie v biologii metodou nezastupitelnou: umožňuje analyzovat i tak komplikované biologické matrice, kterými jsou lidská tkáň a tělní tekutina. Těmto biologickým aplikacím se věnují jen některá národní výzkumná pracoviště.

Hmotnostní spektrometrie ovšem zasahuje i do řady jiných oborů. Po České republice jsou „rozestaty“ stovky různých hmotnostních spektrometrů, ovšem málo o nich veřejnost ví. Navíc se dá očekávat další narůstající uplatnění hmotnostní spektrometrie, které plyne ze tří moderních trendů posledních několika let. Prvním je miniaturizace přístrojů, druhým je zavedení nových ionizačních technik, které pracují za atmosférického tlaku a běžné teploty (hovoříme o tzv. „ambient“ technikách) a třetím trendem je pak zavádění nových progresivních aplikací, jako je třeba hmotnostní mikroskopie.

Co se týče miniaturizace, zde výrobci směřují k přenosným spektrometrům, které v terénu budou schopny odhalit, zdali zkoumané objekty (včetně lidí) nepřišly do styku s trhavinami, drogami nebo jinými zakázanými látkami, zdali dovážené zemědělské produkty, např. víno, opravdu pochází z deklarované země původu a nebylo zakázaným způsobem upravováno, či detegovat chemické a biologické zbraně, ať již při vojenském nasazení nebo při ochraně civilistů před teroristickým útokem. V těchto případech obsluha spektrometr používá jako „černou skříňku“, tedy se moc nezajímá o procesy, které ve spektrometru probíhají. Spektrometr dává informaci, že buď je vše v pořádku, anebo ne. Pak je třeba, aby vzorek postoupil na další, detailnější analýzu.

Se zaváděním nových ionizačních technik, které pracují za atmosférického tlaku a teploty, se otevírají možnosti k obecné povrchové analýze, a to i živých objektů. Lze sledovat podaná léčiva, která se vylučují na povrchu lidského těla, a jejich farmakokinetiku, je snadné analyzovat povrchové molekuly na jednotlivých částech živých rostlin, apod. Průlomovou technikou se jeví tzv. desorpční elektrosprej (desorption electrospray, DESI), jehož principy a první aplikace se objevily v časopise Science v roce 2004. Následovala celá řada dalších technik, např. desorpční chemická ionizace za atmosférického tlaku (desorption atmospheric pressure chemical ionization, DAPCI), desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku (desorption atmospheric photoionization, DAPPI), extraktivní elektrosprej (extractive electrospray, EESI), přímá analýza v reálném čase (direct analysis in real time, DART), MALDI za atmosférického tlaku (atmospheric MALDI) a celá řada dalších. Všechny tyto metody mají jednu zajímavou vlastnost: vzorek je analyzován přímo, často bez nutnosti jakkoli vzorek předčišťovat nebo kon-



Obr. 3. Zařízení pro přímou analýzu tkáně technikou desorpčního elektrospreje

centrovat. Odpadá tím často časově náročná úprava vzorku, která byla nezbytná třeba před analýzou tělních tekutin a tkání (obr. 3).

Z nových aplikací hmotnostní spektrometrie poslední doby se nelze nezmínit o hmotnostní mikroskopii. V anglosaské literatuře se hovoří o technice „mass imaging“, která je v současnosti hodnocena americkou agenturou FDA (U.S. Food and Drug Administration) a očekává se, že během následujících pěti let bude uznána za standardní zobrazovací techniku. U hmotnostní mikroskopie jsou snímány minimálně dvourozměrné obrazy povrchu, přičemž tyto jsou získány počítačovou rekonstrukcí iontových druhů, které jsou ze zobrazovaného objektu desorbovány. Děje se tak rastrovacím způsobem, a to při prostorovém rozlišení zatím v řádu desítek až stovek mikrometrů podle typu primárního ionizujícího svazku, kterým může být laser (pak hovoříme o MALDI hmotnostní mikroskopii), svazek iontů (např. C_{60}) nebo svazek nabitých kapiček (DESI mikroskopie). Oproti ostatním zobrazovacím technikám hmotnostní mikroskopie nedává pouze odpověď typu „je tam nějaký objekt“, ale současně i informaci o chemické povaze příslušného zkoumaného objektu. Hmotnostní mikroskopie je tedy ideálním nástrojem pro identifikaci a charakterizaci tzv. biomarkerů, např. molekul charakterizujících třeba patologický stav. Můžeme hodnotit mj. nádorovou tkáň, případně subtypy tumorů na

základě souboru bílkovin nebo jiných specifických molekul, které jsou ve zdravých tkáních zastoupeny jinak. Pokud bychom hledali molekulární znaky nějakého infekčního onemocnění, lze přímo porovnávat tkáň zdravou a infikovanou. Můžeme se dívat, do jakých orgánů se deponuje podané léčivo a jak je metabolizováno. Můžeme sledovat, jaká je proteomická odezva na příslušný léčebný proces. Velkou budoucnost hmotnostní mikroskopie včas rozpoznal i průmysl, takže v současnosti není velká hmotnostně-spektrometrická firma, která by nenabízela jako hotový komerční produkt hmotnostní mikroskop, ať už na principu MALDI nebo zařízení užívající primární svazek desorbujících iontů. V odborné literatuře se začala objevovat i řada dalších speciálních aplikací, které komerční subjekty zatím nenabízejí. Jedná se zejména o možnosti 3D analýzy a dále o opravdovou mikroskopii v rámci jediné buňky.

Tyto speciální aplikace potvrzují obecný trend posledních 20 let ukazující, že hmotnostní spektrometrie se již dávno neprofiluje jako čistě analytická technika. Její aplikace zasahují do řady různých a nepříbuzných oborů a my se můžeme těšit, kterou novou vědní disciplínu hmotnostní spektrometrie otevře nebo jejíž vznik alespoň bude iniciovat. Není bez zajímavosti, že v průběhu své zhruba stoleté existence byla hmotnostní spektrometrie dvakrát označena vlastními předními odborníky oboru jako technika bez perspektivy, jako metoda, která již splnila svůj účel a spěje k zániku. Dynamický rozmach posledních let ukazuje, že skutečnost je zcela jiná.

Podporováno granty MŠMT (LC07017 a MSM6198959216) a institucionálním záměrem AVOZ50200510.

V. Vidová^a, K. Lemr^a, and V. Havlíček^b
(^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, ^b Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): Recent Trends in Mass Spectrometry

Mass spectrometry is an indispensable tool in modern analytical laboratories. It has also gained significant reputation in many areas of non-chemical activities. The paper summarizes the most recent analytical developments in the field. It puts emphasis on ambient ionization techniques, modern high-resolution analyzers and mass microscopy as an emerging optical/analytical tool.

METAGENOM – BOHATÝ ZDROJ NOVÝCH BIOMOLEKUL

PAVEL KOTRBA^a, ONDŘEJ UHLÍK^a,
KATEŘINA JEČNÁ^a, MARTINA MACKOVÁ^a
a TOMÁŠ MACEK^{a,b}

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6 - Dejvice; ^b Oddělení přírodních látek, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6 - Dejvice
pavel.kotrba@vscht.cz

Došlo 4.8.08, přijato 19.8.08.

Klíčová slova: metagenomika, nekultivatelné mikroorganismy, enzymy, antibiotika

Obsah

1. Úvod
2. Technologie metagenomiky
 - 2.1. Strategie izolace DNA
 - 2.2. Strategie přípravy knihoven metagenomů
 - 2.3. Strategie screeningu knihoven metagenomů
3. Užitečné enzymy a další biomolekuly nekultivatelných mikroorganismů
 - 3.1. Amylasy, celulasy a další hydrolasy polysacharidů
 - 3.2. Nitrilasy, nitrilhydratasy a amidasy
 - 3.3. Glyceroldehydratasa
 - 3.4. Esterasy
 - 3.5. Oxidoreduktasy
 - 3.6. Biosyntéza vitaminů, antibiotik a léčiv
4. Závěr

1. Úvod

Impuls, který nastartoval zájem o mikrobiální svět, lze datovat rokem 1673, kdy Antonie van Leeuwenhoek zveřejnil pro širší publikum svá pozorování mikroflóry vlastní ústní dutiny, prováděných pomocí podomácku vyrobeného mikroskopu opatřeného jednou čočkou. Zároveň popsal „*wee animacules*“, jak mikroorganismy nazval, jako živé, schopné aktivního pohybu. Dalším významným datem v historii mikrobiologie byl rok 1861, kdy Louis Pasteur vyvrátil teorii spontánního vzniku mikroorganismů z organické hmoty a zařadil tak mikroorganismy mezi buněčné formy života v souladu se závěrem Rudolfa Virchowa z roku 1858, totiž, že každá buňka vzniká z buňky již existující („*Omnia cellula e cellula*“). O 20 let později formuloval Robert Koch své 4 postuláty, jejichž podstatou

bylo paradigma čisté mikrobiální kultury jediné umožňující charakterizaci (v jeho případě potvrzení patogenity) konkrétního mikroorganismu¹. Vývoj mikrobiologie se pak podřídil těmto postulátům, mikrobiologie přitahovala exaktnost studia mikroorganismů v čistých kulturách a v roce 1923 Bergeyův trust vydávající *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* kategoricky vyhlásil, že klasifikovat lze pouze bakterie, které je možno kultivovat a získat v čisté kultuře. V roce 1931 S. A. Waksman optimisticky prohlásil, že již bylo nashromážděno dostatečné množství informací, které umožňují vytvořit jasnou představu o půdní mikroflóře (v *orig.* ...a large body of information has accumulated that enables us to construct a clear picture ... of ... the microscopic population of the soil)². Toto přesvědčení však dostalo povážlivých trhlin především v polovině 80. let minulého století.

Pochyby iniciovala zjištění zásadních rozdílů mezi počty jedinců mikrobiální populace v půdě a povrchových vodách stanovených kultivačními metodami a vyjadřovaných jako „jednotky tvořící kolonie“ a počty určenými přímým mikroskopickým počítáním³. Rozdíl je obzvláště dramatický v některých vodních ekosystémech, kde četnost bakteriální populace zjištěná kultivačně a počítáním živých buněk barvených akridinovou oranží dosahuje rozdílu až 6 řádů (cit.⁴). Z celkového počtu půdních bakterií je běžnými postupy kultivatelných 0,1–1 % (cit.⁵). V současné době je počet prokaryot na Zemi odhadován na $4 \cdot 10^{30}$ – $6 \cdot 10^{30}$, a součet množství organického uhlíku v prokaryotech ze všech složek životního prostředí je souměřitelný s množstvím uhlíku deponovaným v rostlinné biomase⁶. Vědomí kritického významu mikroorganismů v biogeochemických cyklech spolu s poznatky mezigenomových DNA-DNA hybridizačních studií, které ukázaly, že fylogenetická diverzita půdních bakterií je minimálně 100× vyšší, než jaká se předpokládala na základě tradičních kultivačních metod⁷, způsobily zásadní obrát směřem ke studiu nekultivatelných mikroorganismů. Pozornost začíná být věnována jak fylogenetické příslušnosti nekultivatelných, tak jejich předpokládané metabolické diverzitě. Dalším poznatkem, který významně ovlivnil názor na tradiční dogmata mikrobiologie, byl důkaz, že po dlouhou dobu nekultivatelný *Helicobacter pylori* způsobuje žaludeční vředy. Ačkoliv byl mikroskopicky zjištěn výskyt spirálových bakterií v gastrointestinálním traktu psů již v roce 1893 a u člověka v roce 1906 (cit.⁸) a korelace mezi výskytem těchto bakterií, vznikem gastritidy a tvorbou vředů byla popsána v roce 1938 (cit.⁹), nebyla příčinná souvislost mezi *H. pylori* a gastritidou akceptována do doby, než byla tato bakterie s odpovídajícími důsledky „kultivována“ v gastrointestinálním traktu dobrovolníka^{10,11}.

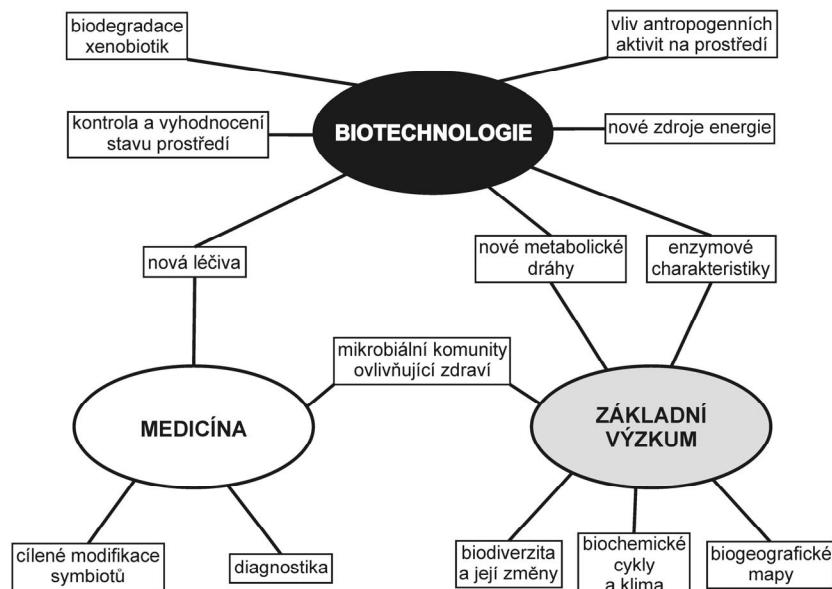
V roce 1985 rozšířily pokroky v molekulární genetice spektrum nástrojů pro studium mikroorganismů o analýzu

ribosomálních 5S a 16S rRNA izolovaných přímo z matrice environmentálních vzorků půdy nebo vody bez potřeby jejich kultivace^{12,13}. Porovnání nukleotidových sekvencí rRNA z různých taxonomických skupin (rRNA různých taxonů v průběhu evoluce akumulovaly ve variabilních částech specifické mutace, které lze použít jako molekulární fylogenetické znaky) umožnilo rozlišit i fylogenetickou příslušnost nekultivovatelných mikroorganismů a zviditelnit rozsáhlou diverzitu mikrobiálních komunit. Technologie PCR s primery umožňujícími amplifikovat takřka kompletní geny 16S rRNA pak vedla od poloviny 90. let k expanzi molekulárně genetické klasifikace mikroorganismů. Dodnes bylo takto popsáno např. okolo 100 základních bakteriálních taxonomických jednotek (kmenů, *phylum*, dle linnéovské klasifikace), z nichž pouze třetina má v současné době kultivovatelné zástupce¹⁴. Dostupnost sekvencí rRNA specifických pro určitou taxonomickou jednotku navíc znovu přivedla pozornost k mikroskopické analýze a využití fluorescenčně značených nukleotidových sond se ve spojení s fluorescenční mikroskopií stalo významným diagnostickým nástrojem pro studium mikrobiální diversity *in situ*^{15,16}.

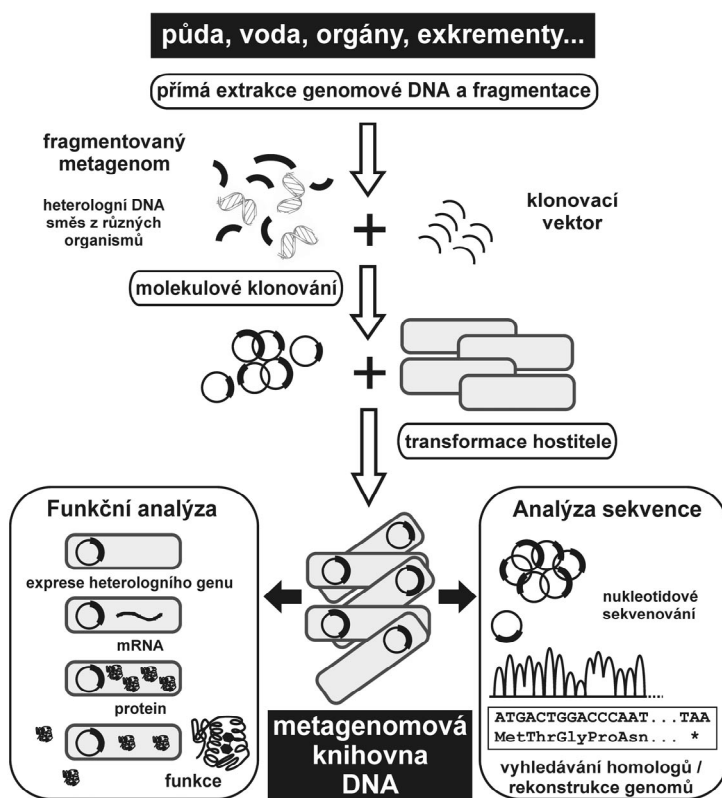
2. Technologie metagenomiky

Vedle teoretického studia mikrobiální diversity ekosystémů a katalogizace rRNA motivují zájem o „neviditelnou většinu“ mikroorganismů i čistě praktické důvody a poznatky o fyziologii a genetice nekultivovatelných mikroorganismů mají významný potenciál uplatnění v oblastech medicíny, ekologie a biotechnologií (obr. 1).

Termín nekultivovatelný mikroorganismus je zde užíván pro označení mikroorganismů, pro které zatím nebyly identifikovány fyzikální nebo biologické faktory umožňující jejich laboratorní kultivaci, ale i ty, o jejichž kultivaci zatím ani nebyl učiněn pokus. Mezi metodami navrženými ke studiu fyziologie a genetiky nekultivovatelných mikroorganismů si získal vedoucí pozici nový technologický přístup, metagenomika (syn. genomika populací, environmentální genomika), zahrnující extrakci celkové DNA určité populace (směs genomů), jejich fragmentaci, molekulové klonování fragmentů DNA (tvorbu knihovny tzv. metagenomu), stanovení a interpretaci jejich nukleotidové sekvence poskytující informace o genetickém potenciálu i diverzitě populace nebo funkční analýzu vedoucí k cílené identifikaci aktivit jejich produktů (obr. 2). Cílení metagenomické studie na vyhledání určité enzymové aktivity, biosyntetické dráhy nebo dráhy umožňující využití toxických látek ovlivňuje volbu prostředí (půda, voda, sedimenty, odpadní vody a kaly, prostředí s extrémními teplotními podmínkami, vysokou salinitou nebo kontaminované xenobiotiky), z něhož je metagenom izolován. V případě studií zaměřených na globální analýzu populací bývá metagenomická linie doplněna tradičnějšími molekulárně biologickými metodami umožňujícími analýzu diverzity pomocí DDGE a TGGE (denaturační a teplotní gradientová gelová elektroforéza DNA), hybridizační metody, RFLP (restriction fragment length polymorphism; metoda využívající polymorfismu v délce fragmentů po restriktivním štěpení DNA z různých mikroorganismů) a nebo značení metabolicky aktivních mikroorganismů metodou SIP (stable isotope probing; metoda založená na inkorporaci exogenně přidaných stabilních izotopů do biomolekul me-



Obr. 1. Možné aplikace metagenomiky



Obr. 2. Konstrukce a screening knihoven metagenomů

tabolicky aktivních mikroorganismů), které byly v Chemických listech diskutovány dříve¹⁷.

2.1. Strategie izolace DNA

Mikrobiální komunity se sestávají ze směsi archebakterií, bakterií a eukaryot s rozdílnými charakteristikami buněčných stěn, jež výrazně ovlivňuje jejich náchylnost k lyzi, která představuje první krok izolace DNA. Výtěžky DNA navíc ovlivňuje i skutečnost, že mikroorganismy v prostředí jsou často ve stavu hladovění, jsou fyzicky menší a obtížně lyzovatelné. Ačkoliv je dostupná celá řada komerčních souprav pro izolaci celkové DNA z environmentálních matic (např. z půdy), řada laboratorů si vyvinula vlastní techniky izolace pro zajištění stejnoměrné lyze různých zástupců mikrobiální komunity^{18,19}. Při použití přístupů přímé extrakce DNA *in situ* z environmentální matrice nebo nepřímé extrakce, již předchází izolace mikroorganismů z matrice, se ukazuje, že oba poskytují celkovou DNA pokrývající stejné spektrum diversity komunity, nicméně přímé metody poskytují běžně vyšší výtěžky²⁰. Nevýhodou přímých metod je koextrakce látek (např. huminových kyselin), které mohou působit inhibičně při následném molekulovém klonování. Vedle tradičních metod gelové filtrace byla pro odstranění

huminových látek nově zavedena technika pulzní elektroforézy využívající dvoufázový agarosový gel, kde jedna fáze obsahuje polyvinylpyrrolidon, inertní a netoxický polymer s vynikající schopností vázat fenolové látky, včetně huminových kyselin²¹.

V určitých případech, při vyhledávání genetických determinant specifických schopností v komunitě, je výhodné zařadit před extrakcí DNA prekulturní krok za podmínek, které preferují zástupce disponující cílovou vlastností^{22,23}. Je-li takovou vlastností např. schopnost utilizace určitých organických látek, pak lze využít strategie SIP a směsnou kulturu dotovat tímto substrátem obsahujícím těžší nuklid ¹³C a zaměřit extrakci DNA na izolaci „těžké“ DNA obsahující ¹³C inkorporovaný v důsledku utilizace značeného substrátu proliferaujícími zástupci komunity^{17,24,25}.

2.2. Strategie přípravy knihoven metagenomů

Při volbě mezi možnostmi vytvářet knihovny metagenomu z krátkých (tisíce párů bazí) nebo dlouhých (desítky tisíc párů bazí) fragmentů DNA je třeba zohlednit, zda je předmětem zájmu vyhledávání individuálních genů nebo celých operonů a biosyntetických drah. Často je i pro po-

souzení velikosti a diverzity komunit třeba vytvářet knihovny z rozsáhlejších fragmentů DNA, což usnadňuje i fylogenetickou klasifikaci fragmentu v případě, že obsahuje nebo je mu možno přiřadit fylogenetický marker (gen rRNA, *recA* a podobně). Takové knihovny velkých fragmentů metagenomů jsou vytvářeny s použitím kosmidů²⁰, umělých bakteriálních chromosomů (BAC; cit.²⁶) nebo fosmidů (vektory založené na F-plasmidu; cit.^{21,27}). Knihovny krátkých fragmentů jsou spíše než pro funkční analýzu genů vhodné jako zdroj informací o sekvenci DNA metagenomů^{28,29}.

2.3. Strategie screeningu knihoven metagenomů

Pro screening knihoven metagenomů existují dva přístupy: funkční analýza genů cílená na identifikaci určité vlastnosti nebo sekvenční přístup, tj. určení nukleotidové sekvence ideálně celého metagenomu a následná identifikace pravděpodobných genů, primárně *in silico* (obr. 2). Určitou limitací druhého přístupu je skutečnost, že identifikace genů je založena na porovnávání se sekvencemi genů nebo jejich produktů o známé funkci v databázích a nelze tak identifikovat skutečně „nové“ geny. Na druhou stranu poskytuje významnou informaci o genetické diverzitě a metabolickém potenciálu celé komunity a může přinést i řadu překvapivých zjištění. V mořské γ -proteobakterii byl tak například identifikován gen kódující bakteri-orhodopsin (lokalizovaný v blízkosti genu pro 16S rRNA) a následně byla potvrzena jeho funkce jako fotoreceptoru, který byl do té doby znám jen u zástupců říše *Archaea*^{30,31}. Význam sekvenčního přístupu roste s dostupností vysokokapacitních metod sekvenování DNA jako je 454 technologie³².

Přístup funkční analýzy genů, spočívající v identifikaci hostitele nesoucího fragment (klon) metagenomu vykazujícího určitou vlastnost, je nejčastěji využíván ve studiích cílených na biotechnologickou aplikaci („zkratku“ klon je v následujícím označován i hostitel nesoucí fragment metagenomu). Zásadním omezením funkčních analýz je, že „exotické“ geny metagenomu musí být exprimovány ve zvoleném hostiteli. Tím je nejčastěji *Escherichia coli*, přičemž bylo ukázáno, že na genetickém pozadí *E. coli* může být exprimováno jen 40 % genů z 32 testovaných genomů³³. Určité řešení nabízí použití alternativních hostitelů metagenomových knihoven půdních mikroorganismů. Používání jsou *Streptomyces lividans* a *Pseudomonas putida*³⁴, *Pseudomonas fluorescens*³⁵ a ukazuje se, že jako hostitele je možno využít i zástupce rodu *Rhizobium*^{36,37}.

Úspěch funkční analýzy závisí i na dostupnosti metody umožňující identifikaci hledané vlastnosti ve velkém množství klonů. Vedle klasických metod využívajících např. selekčního tlaku nebo komplementace defektu hostitele v dané vlastnosti roste význam molekulárně-genetických přístupů. Metoda SIGEX (substrate-induced gene-expression screening, tj. screening na substrátem indukovanou expresi [reportérového] genu; obr. 3a) využí-

vá pro rychlý screening klonů s indukovatelnými katabolickými geny tzv. operonovou past, jejíž podstatou je vytváření genetických fúzí fragmentů metagenomů s tzv. reportérovým genem *gfp* pro zelený fluoreskující protein³⁸. Klony metagenomu jsou pak inkubovány v přítomnosti cílového induktoru (substrátu) a pozitivní zástupci jsou identifikováni průtokovou cytometrií v uspořádání FACS (fluorescence activated cell sorting, tj. třídění buněk aktivované fluorescencí). Pro identifikaci klonů produkujících efektní mezibuněčné signalizace, jako je quorum sensing, byl v systému METREX (metabolite-regulated expression, tj. systém exprese [reportérového] genu] regulovaná metabolitem; obr. 3b) vyvinut hostitel nesoucí *gfp* pod kontrolou promotoru genů *lux* pro bakteriální luciferasu a produkující odpovídající transkripční regulátor LuxR, jehož aktivita je závislá na přítomnosti signálních molekul^{39,40}.

3. Užitečné enzymy a další biomolekuly nekultivovatelných mikroorganismů

Metagenomika poskytuje dříve nepostižitelnou výpočtovou ekologickou významu specifických mikroorganismů v rámci složitých komunit, tím, že umožňuje přiřadit potenciální funkce určitému mikroorganismu, osvětlit mechanismy katabolismu xenobiotik a nebo dešifrovat roli nekultivovatelných symbiotů, parazitů nebo patogenů v těle hostitele^{41,42}. Neméně významným výstupem metagenomických studií je identifikace nových enzymů s výhodnými vlastnostmi nebo drah biosyntézy nových antibiotik. Metagenom se stává také zdrojem materiálů pro konstrukci zcela nových genů postupem tzv. metagenomického mísení genů (angl. metagenomic DNA shuffling), jehož podstatou je kombinování vhodných částí kódujících sekvencí různého původu, za vzniku umělých genů kódujících protein požadovaných vlastností. Genetické modifikace produkčních mikroorganismů pak umožňují využít potenciálu metagenomiky v biotechnologické praxi.

3.1. Amylasy, celulasy a další hydrolasy polysacharidů

Ze 14 doposud identifikovaných amylytických klonů⁴³ jsou z biotechnologického hlediska nejvýznamnější 4, z nichž první, získaný z půdní bakterie, produkuje amylasu AmyM s teplotním optimem 42 °C, stabilní v alkalickém prostředí s pH optimem 9, tedy vlastností požadovanou pro použití v pracích prostředcích⁴⁴. Rozsáhlý screening 2000 metagenomových knihoven z podmořských biotopů umožnil firmě Diversa Co. (San Diego, CA, USA) identifikovat tři klony produkující termostabilní kyselou amylasu BD5031, BD5064 a BD5063, z nichž poslední vykazovala optimální aktivitu při pH 4,5 a teplotě 105 °C, bez nároku na přítomnost stabilizujících Ca^{2+} (cit.³⁵). Tento enzym však byl v aktivní formě v hostiteli produkován s nízkou účinností. Řešení poskytla technologie metagenomického mísení genů a ze sekundární knihovny připravené rekombinací krátkých fragmentů kódujících oblastí tří identifikova-

ných α -amylas byl získán chimerní gen pro amylasu BD5088, kterou lze, při zachování katalytických charakteristik enzymu BD5063, produkovat s vysokými výtěžky³⁵. Enzym BD5088 by tak v procesu sacharifikace kyselých extraktů kukuřičného škrobu mohl nahradit standardně používaný preparát α -amylasy z *Bacillus licheniformis* termostabilní pouze v oblastech blízkých neutrálnímu pH a v přítomnosti Ca^{2+} .

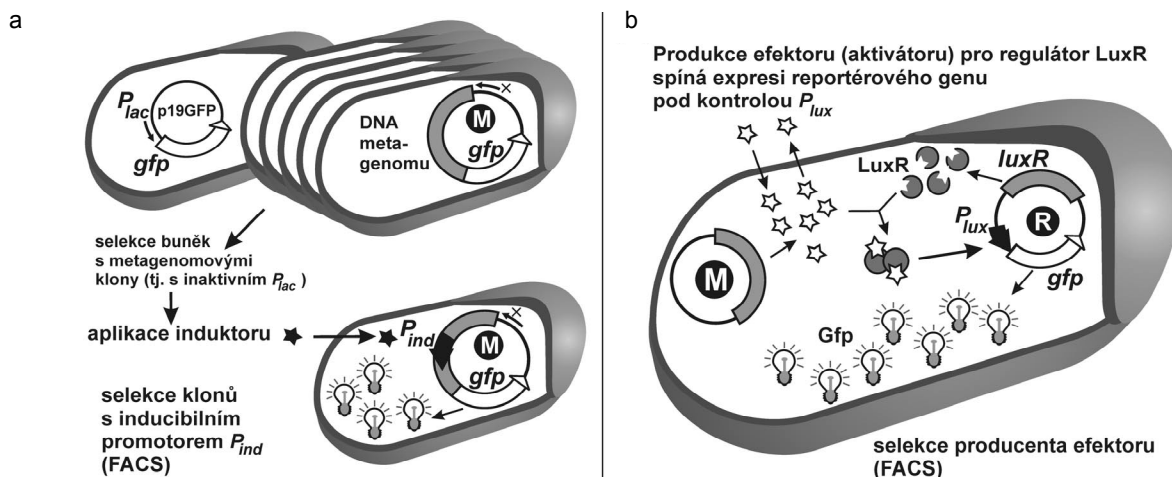
Ačkoliv se vyhledávání celulas v metagenomech zaměřuje především na celulas z termofilních nebo anaerobních mikroorganismů, často s krokem předkultivace na karboxymethylcelulose nebo lignocelulose^{45–47}, lze v aerobní mezofilní půdní mikroflóře nalézt enzymy tolerující extrémní podmínky. Voget a spol.⁴⁸ izolovali celulasu CelE5A zachovávající si minimálně 60 % aktivity v širokém rozsahu pH 5,5 až 9,0, dlouhodobě stabilní při 40 °C a aktivní i v přítomnosti 3 M NaCl. Díky těmto vlastnostem může CelE5A nalézt uplatnění v biotechnologickém zpracování lignocelulosových materiálů.

Kompletní enzymová hydrolýza lignocelulosové biomasy vyžaduje hydrolýzu hemicelulos, jejíž součástí jsou i xylany a hledány jsou proto i vhodné xylanasy⁴³. Z metagenomů odpadní jímky byly izolovány xylanasa Xyn8, zajímavá svou aktivitou při nízkých teplotách⁴⁹ a z mikroflóry zaživacího traktu mýry a termita xylanasy XYL6805, 6806, 6807 a XYL6419, které nevykazovaly významnou sekvenční homologii se známými xylanasami

a představují tak novou rodinu těchto enzymů⁵⁰. Ačkoliv se po dlouhou dobu zdálo, že agarasy, schopné hydrolyzovat agar, jsou charakteristické jen pro mořskou mikroflóru, byla tato aktivita reprezentovaná 12 metagenomovými klony potvrzena i u zástupců suchozemské půdní mikroflóry⁵¹.

3.2. Nitrilasy, nitrilhydratasy a amidasy

Chemická hydrolýza nitrilů na odpovídající karboxylové kyseliny a jejich amidy vyžaduje přítomnost silné kyseliny a vysoké teploty a běžně poskytuje nízké výtěžky. Nitrilasy jsou v bakteriálních genomech kódovány poměrně vzácně a do zavedení metagenomiky bylo známo jen asi 20 zástupců⁴³. V rozsáhlém projektu firmy Diversa Co. (San Diego, CA, USA) testujícím metagenomy ze stovek biotopů bylo identifikováno 337 genů kódujících nitrilasy, z nich charakterizované vykazují stereoselektivitu, která může nalézt uplatnění při syntéze specifických enantiomerů hydroxykarboxylových kyselin^{52–54}. Nitrilhydratasy konvertující nitrily na amidy karboxylových kyselin nalézají využití při syntézách nikotinamidu a akrylamidu a metagenomika odhalila 12 nových nitrildehydogenas z půdních mikroorganismů⁵⁵. Amidasy jsou využívány při syntézách β -laktamových antibiotik a z nekultivovatelné půdní bakterie byla získána penicilinacylasa, využitelná při produkci semisyntetických penicilinů⁵⁶.



Obr. 3. Molekulárně-genetické přístupy při funkční analýze knihoven metagenomů; (a) Operonová past v plasmidu p19GFP (metoda SIGEX; cit.³⁸). V hostiteli nesoucím samotný plasmid p19GFP je transkripce genu *gfp* kódujícího zelený fluoreskující protein GFP kontrolována *lac* promotorem, což umožňuje eliminaci hostitele bez heterologního fragmentu DNA. Fúzí *gfp* s fragmentem DNA metagenomu obsahujícím indukovatelné katabolické geny pod kontrolou promotoru P_{ind} je v plasmidu M vytvořen operon, jehož exprese je spínána v přítomnosti odpovídajícího exogenního induktoru (P_{lac} je neaktivní:×). (b) Buněčný sensor pro identifikaci genů biosyntézy efektorů mezibuněčné komunikace (systém METREX; cit.^{39,40}). V hostiteli klonu fragmentu metagenomu (M) transformovaném reportérovým plasmidem R, který nese *gfp* pod kontrolou promotoru genů *lux* (P_{lux}) pro luciferasu a konstitutivní gen *luxR* pro odpovídající transkripční regulátor LuxR z *Vibrio fischeri*, bude exprese *gfp* spínána v případě, že klon produkuje aktivátor LuxR. Pokud je hostitel vystaven stimulu exogenního aktivátoru (*N*-acyl homoserin laktón), lze jej využít i pro identifikaci negativních efektorů LuxR. Klony produkujících GFP jsou jako selektovány pomocí průtokové cytometrie FACS (fluorescence activated cell sorting).

3.3. Glyceroldehydratasa

V biotechnologiích využívajících fermentaci glukosy na 1,3-propandiol, který je surovinou např. pro výrobu polyesteru nebo polyuretanu, je limitujícím krokem přeměna glycerolu na 3-hydroxypropanal, katalyzovaná glycerol dehydratasou. Screening metagenomových knihoven z několika biotopů umožnil identifikovat klon *E. coli* BI21/pAK5.1 produkující glyceroldehydratasu, která se vyznačovala významnou rezistencí k inhibici aktivity glycerolem a konečným metabolitem 1,3-propandiolem (cit.⁵⁷).

3.4. Esterasy

Doposud bylo v metagenomech identifikováno okolo 80 esteraz⁴³, z nichž však jen několik bylo biochemicky charakterizováno. Z podmorské solné lokality byla izolována řada enantioselektivních esteraz aktivních v oblasti alkalického pH a za vysokých tlaků, mezi nimi jedna z doposud největších popsaných esteraz, esterasa O.16, homotrimer o 325 kDa (cit.⁵⁸). Podobnou molekulovou hmotnost má i homooktamerní esterasa EstA3 o 336 kDa izolovaná z biofilmu pod hladinou pitné vody, která je jako jediný známý enzym schopna hydrolyzovat jinak nereaktivní sekundární ester 7-[3-oktylkarboxy-(3-hydroxy-3-methyl-butyloxy)]-kumarin (cit.²³).

3.5. Oxidoreduktasy

Možnosti využití bakteriálních polyhydroxyalkanoátů (PHA) jako suroviny pro výrobu odbouratelných plastů i náhrad fosilních paliv iniciovala i zájem o metabolismus těchto látek v nekultivovatelných mikroorganismech. Screening knihovny metagenomu půdních mikroorganismů cílený na D-3-hydroxybutyrát dehydrogenasovou aktivitu přinesl 34 pozitivních klonů s vysokou diverzitou v předpovězené primární struktuře enzymu a méně než 35% identitou se známými proteiny³⁷. NAD(P)H-dependentní alkoholdehydrogenasy (ADH) nalézají díky své enantioselektivitě uplatnění při syntézách řady karbonylových sloučenin, hydroxykyselin, aminokyselin a chirálních alkoholů, které není možné připravit chemickou cestou. Z metagenomových knihoven mikroflóry říčních sedimentů a půdy bylo izolováno 48 klonů schopných konvertovat C2 až C4 polyoly na odpovídající karbonylové sloučeniny^{59,60}, zatím bez charakterizované selektivity. Žádná z 11 identifikovaných alkoholdehydrogenas nevykazuje sekvenční homologii ke známým zástupcům⁶¹ NAD(P)H-dependentních ADH a jedná se tak o zcela nové enzymy^{59,60}. Významnou enantioselektivitu vykazuje monooxygenasa SmoA, jejíž gen byl izolován z půdního metagenomu⁶² a která konvertuje styren a jeho chlorované deriváty na odpovídající (S)-epoxydy s výtěžky >99 %.

3.6. Biosyntéza vitaminů, antibiotik a léčiv

Metagenomický přístup byl aplikován při vyhledávání biosyntetických drah biotinu a vitamínu C. Z metagenomové knihovny půdní mikroflóry testované v *E. coli* s auxotrofií na biotin bylo identifikováno 7 klonů s operony kódujícími biosyntetickou dráhu biotinu⁶³. Z nekultivovatelných půdních bakterií byly izolovány geny kódující dvě 2,5-diketo-D-glukonát reduktasy, C a D, jež jsou součástí biosyntetické dráhy vitamínu C. Tyto enzymy se vyznačují vysokou katalytickou účinností a enzym D i termostabilitou s maximem aktivity zachovaným při 45 °C (cit.⁶⁴).

Standardní inhibiční test s *Mycobacterium* sp. umožnil mezi klony půdních metagenomů identifikovat zástupce produkujícího antibiotikum terragin A (hostitel *S. lividans*; cit.⁶⁵) a 11 klonů produkujících antibiotika N-acyltyrosinové řady (hostitel *E. coli*; cit.⁶⁶). Pomocí inhibičního testu s *Bacillus subtilis* byl z půdního metagenomu selektován klon produkující zcela nové antibiotikum, indol derivatizovaný isokyanidovou skupinou na C3 (hostitel *E. coli*, cit.⁶⁷), pro jehož biosyntézu se využívá jako prekurzor tyrosin a ribulosa-5-fosfát⁶⁸. Antibakteriální účinky na *Bacillus* sp. má i sekundární amid kyseliny palmitové, palmytoylputrescin, produkovaný klonem metagenomu symbiotů tropických rostlin čeledi *Bromeliaceae* s *E. coli* jako hostitelem⁶⁹. Identifikovaná palmytoylputrescinsyntetasa Pps s vysokou substrátovou specifitou pak představuje zcela nový enzym, který nevykazuje příbuznost k žádným ze známých N-acetyltransferas. Charakteristické zbarvení umožnilo identifikovat klony produkující turbomyciny A a B (cit.⁷⁰) a violacein (cit.⁷¹). V půdních metagenomech byly identifikovány i biosyntetické dráhy indirubinu (cit.⁷²), který je používán při terapiích u pacientů trpících leukémií.

4. Závěr

Metagenomika nejen poněkud pozměnila pohled na koncept genomu, ale především umožňuje překonat bariéru, která mikrobiologům nedovolovala komplexní poznání struktury a funkčního potenciálu komunit z exotických i běžných prostředí a vede k řešení medicínských, ekologických a biotechnologických problémů (obr. 1). Sekvenční přístup analýzy metagenomů přináší rychlým tempem množství informací o nových genech, funkční analýzy umožnily identifikovat řadu nových enzymů, antibiotik a jiných biomolekul pocházejících z nejrůznějších biotopů (obr. 2). Využití potenciálu, který technologie metagenomiky nabízí, kriticky závisí na analýze metagenomových knihoven. Pro sekvenční přístup přestane být, díky stálému zdokonalování vysokokapacitních metod, nukleotidové sekvenování limitujícím faktorem. Rozlišení a složení individuálních genomů bude záviset na vývoji softwaro-

vých nástrojů bioinformatiky⁷³ a dostupnosti DNA čipů, které navíc umožní rozlišit klony exprimující informaci metagenomu od klonů obsahujících neaktivní pseudogeny⁷⁴. Lze očekávat, že pro předpověď funkce genového produktu bude využito pokroků ve stanovení homologií proteinů, které bude stále více založeno na porovnávání modelovaných terciárních struktur a analýzy přestanou být omezeny na (často málo průkazné) homologie v primárních strukturách proteinů. Funkční analýzy budou vyžadovat řadu dalších inovací v oblasti vysokokapacitního screeningu knihoven metagenomů (obr. 3), ale hlavní limitací zůstávají vhodní hostitelé s genetickým pozadím umožňujícím expresi často exotických heterologních genů. Významným příslibem pro funkční analýzy a cílenou přípravu genů a proteinů „na míru“ je přístup metagenomického mísení genů na úrovni sekundárních knihoven připravených spojováním různých částí genů z celých metagenomů⁷⁵.

Při pohledu na obrovský potenciál metagenomiky a jeho současné využití v biotechnologické praxi je zarážející, že jen zlomek výsledků je kryt patenty a jen velmi malé množství nově objevených enzymů nebo biosyntetických drah nalezlo reálné uplatnění⁴³. Je vysoce pravděpodobné, že díky extenzivnímu přístupu, jímž je současná metagenomika charakteristická, obsahují již stávající knihovny metagenomů geny kódující nové enzymové aktivity a metabolické funkce. Určitým dluhem metagenomiky s ohledem na biotechnologické aplikace tedy zůstává zvýšení podílu skutečných a prakticky zajímavých novinek ze světa nekultivovaných mikroorganismů. To předpokládá vhodně položenou otázku (a selekční metodu) vycházející z „poptávky“ po určité biomolekule, tj. enzymu výhodných vlastností nebo biosyntetické dráhy cenné látky, a tedy úzkou spoluprací mezi výzkumem a průmyslem nebo klinickou praxí.

Tento referát vznikl za podpory grantů NPV II č. 2B0 8031 a MŠMT ČR č. MSM 6046137305.

LITERATURA

1. Paustian T., Roberts G.: *The Microbial World - Through The Microscope: A Look At All Things Small*. On-line verze na <http://www.microbiologytext.com/> (staženo 9.5. 2008).
2. Waksman S. A., Starkey R. L.: *The Soil And The Microbe*. John Wiley, New York 1931.
3. Staley J. T., Konopka A.: *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321 (1985).
4. Grimes D. J., Atwell R. W., Brayton P. R., Palmer L. M., Rollins D. M., Roszak D. B., Singleton F. L., Tamplin M. L., Colwell R. R.: *Microbiol. Sci.* 3, 324 (1986).
5. Torsvik V., Ovreas L.: *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240 (2002).
6. Whitman W. B., Coleman D. C., Wiebe W. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6478 (1998).
7. Torsvik V., Goksoyr J., Daae F. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782 (1990).
8. Buckley M. J. M., O'Morain C. A.: *Br. Med. Bull.* 54, 7 (1998).
9. Doenges J. L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 38, 536 (1938).
10. Marshall B. J., Armstrong J. A., McGeachie D. B., Glancy R. J.: *Med. J. Aust.* 142, 436 (1985).
11. Marshall B. J., McGeachie D. B., Rogers P. A., Glancy R. J.: *Med. J. Aust.* 142, 439 (1985).
12. Pace N. R., Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J.: *Adv. Microb. Ecol.* 9, 1 (1986).
13. Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J., Pace N. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1379 (1985).
14. informace N. Pace, <http://pacelab.colorado.edu/coursesnew.html> (staženo 9.5. 2008).
15. DeLong E. F., Wickham G. S., Pace N. R.: *Science* 243, 1360 (1989).
16. Giovannoni S. J., DeLong E. F., Olsen G. J., Pace N. R.: *J. Bacteriol.* 170, 720 (1988).
17. Uhlík O., Ječná K., Macková M., Leigh M.B., Demnerová K., Macek T.: *Chem. Listy* 102, 474 (2008).
18. Frostegard A., Courtois S., Ramisse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5409 (1999).
19. Miller D. N., Bryant J. E., Madsen E. L., Ghiorse W. C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715 (1999).
20. Courtois S., Cappellano C. M., Ball M., Francou F. X., Normand P., Helynck G., Martinez A., Kolvek S. J., Hopke J., Osburne M. S., August P. R., Nalin R., Guérineau M., Jeannin P., Simonet P., Pernodet J. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 49 (2003).
21. Quaiser A., Ochsenreiter T., Klenk H. P., Kletzin A., Treusch A. H., Meurer G., Eck J., Sensen C. W., Schleper C.: *Environ. Microbiol.* 4, 603 (2002).
22. Daniel R.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 470 (2005).
23. Elend C., Schmeisser C., Leggewie C., Babiak P., Carballeira J. D., Steele H. L., Raymond J. L., Jaeger K. E., Streit W. R.: *Appl Environ Microbiol* 72, 3637 (2006).
24. Radajewski S. McDonald I. R., Murrell J. C.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 296 (2003).
25. Uhlík O., Jecna K., Leigh M. B., Mackova M., Macek T.: *Sci. Total. Environ.* doi:10.1016/j.scitotenv.2008.05.012, v tisku (2008).
26. Rondon M. R., August P. R., Bettermann A. D., Brady S. F., Grossman T. H., Liles M. R., Loiacono K. A., Lynch B. A., MacNeil I. A., Minor C., Tiong C. L., Gilman M., Osburne M. S., Clardy J., Handelsman J., Goodman R. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2541 (2000).
27. Treusch A. H., Kletzin A., Raddatz G., Ochsenreiter T., Quaiser A., Meurer G., Schuster S. C., Schleper C.: *Environ. Microbiol.* 6, 970 (2004).
28. Venter J. C., Remington K., Heidelberg J. F., Halpern A. L., Rusch D., Eisen J. A., Wu D., Paulsen I., Nelson K. E., Nelson W., Fouts D. E., Levy S., Knap A. H., Lomas M. W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y. H., Smith H. O.: *Science* 304, 66

- (2004).
29. Banfield J. F., Verberkmoes N. C., Hettich R. L., Thelen M. P.: *Omic* 9, 301 (2005).
 30. Beja O., Aravind L., Koonin E. V., Suzuki M. T., Hadd A., Nguyen L. P., Jovanovich S. B., Gates C. M., Feldman R. A., Spudich J. L., Spudich E. N., DeLong E. F.: *Science* 289, 1902 (2000).
 31. Beja O., Spudich E. N., Spudich J. L., Leclerc M., DeLong E. F.: *Nature* 411, 786 (2001).
 32. <http://www.454.com/enabling-technology/index.asp> (staženo 9.5. 2008).
 33. Gabor E. M., Alkema W. B. L., Janssen D. B.: *Environ. Microbiol.* 6, 879 (2004).
 34. Martinez A., Kolvek S. J., Yip C. L., Hopke J., Brown K. A., MacNeil I. A., Osburne M. S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2452 (2004).
 35. Richardson T. H., Tan X., Frey G., Callen W., Cabell M., LamD., Macomber J., Short J. M., Robertson D. E., Miller C.: *J. Biol. Chem.* 277, 26501 (2002).
 36. Li Y., Wexler M., Richardson D. J., Bond P. L., Johnston A. W.: *Environ. Microbiol.* 7, 1927 (2005).
 37. Wang C., Meek D. J., Panchal P., Boruvka N., Archibald F. S., Driscoll B. T., Charles T. C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 384 (2006).
 38. Uchiyama T., Abe T., Ikemura T., Watanabe K.: *Nat. Biotechnol.* 23, 88 (2005).
 39. Andersen J. B., Heydorn A., Hentzer M., Eberl L., Geisenberger O., Christensen B. B., Molin S., Givskov M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 575 (2001).
 40. Williamson L. L., Borlee B. R., Schloss P. D., Guan C., Allen H. K., Handelsman J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6335 (2005).
 41. Hondelsman J.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 58, 669 (2004).
 42. Frank D. N., Pace N. R.: *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24, 4 (2008).
 43. Schmeisser C., Steele H., Streit W. R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 955 (2007).
 44. Yun J., Kang S., Park S., Yoon H., Kim M. J., Heu S., Ryu S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7229 (2004).
 45. Rhee J. K., Ahn D. G., Kim Y. G., Oh J. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 817 (2005).
 46. Grant S., Sorokin D. Y., Grant W. D., Jones B. E., Heaphy S.: *Extremophiles* 8, 421 (2004).
 47. Healy F. G., Ray R. M., Aldrich H. C., Wilkie A. C., Ingram L. O., Shanmugam K. T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 667 (1995).
 48. Voget S., Steele H. L., Streit W. R.: *J. Biotechnol.* 126, 26 (2006).
 49. Lee C. C., Kibblewhite-Accinelli R. E., Wagschal K., Robertson G. H., Wong D. W.: *Extremophiles* 10, 295 (2006).
 50. Brennan Y., Callen W. N., Christoffersen L., Dupree P., Goubet F., Healey S., Hernández M., Keller M., Li K., Palackal N., Sittenfeld A., Tamayo G., Wells S., Hazlewood G. P., Mathur E. J., Short J. M., Robertson D. E., Steer B. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3609 (2004).
 51. Voget S., Leggewie C., Uesbeck A., Raasch C., Jaeger K. E., Streit W. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6235 (2003).
 52. DeSantis G., Zhu Z., Greenberg W. A., Wong K., Chaplin J., Hanson S. R., Farwell B., Nicholson L. W., Rand C. L., Weiner D. P., Robertson D. E., Burk M. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9024 (2002).
 53. Robertson D. E., Chaplin J. A., DeSantis G., Podar M., Madden M., Chi E., Richardson T., Milan A., Miller M., Weiner D. P., Wong K., McQuaid J., Farwell B., Preston L. A., Tan X., Snead M. A., Keller M., Mathur E., Kretz P. L., Burk M. J., Short J. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2429 (2004).
 54. Podar M., Eads J. R., Richardson T. H.: *BMC Evol. Biol.* 5, 42 (2005).
 55. Liebeton K., Eck J.: *Eng. Life. Sci.* 4, 557 (2004).
 56. Gabor E. M., de Vries E. J., Janssen D. B.: *Environ. Microbiol.* 6, 948 (2004).
 57. Knietsch A., Bowien S., Whited G., Gottschalk G., Daniel R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3048 (2003).
 58. Ferrer M., Golyshina O. V., Chernikova T. N., Khachane A. N., Martins Dos Santos V. A., Yakimov M. M., Timmis K. N., Golyshin P. N.: *Chem. Biol.* 12, 895 (2005).
 59. Knietsch A., Waschkowitz T., Bowien S., Henne A., Daniel R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1408 (2003).
 60. Knietsch A., Waschkowitz T., Bowien S., Henne A., Daniel R.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 5, 46 (2003).
 61. Kotrbova-Kozak A., Sajdok J., Kotrba P.: *Chem. Listy* 101, 372 (2007).
 62. van Hellemond E. W., Janssen D. B., Fraaije M. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5832 (2007).
 63. Entcheva P., Liebl W., Johann A., Hartsch T., Streit W. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 89 (2001).
 64. Eschenfeldt W. H., Stols L., Rosenbaum H., Khambatta Z. S., Quate-Randall E., Wu S., Kilgore D. C., Trent J. D., Donnelly M. I.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4206 (2001).
 65. Wang G. Y., Graziani E., Waters B., Pan W., Li X., McDermott J., Meurer G., Saxena G., Andersen R. J., Davies J.: *Org. Lett.* 2, 2401 (2000).
 66. Brady S. F., Clardy J.: *Org. Lett.* 5, 121 (2003).
 67. Brady S. F., Clardy J.: *Abgrew. Chem. Int. Ed.* 44, 7063 (2005).
 68. Brady S. F., Clardy J.: *Abgrew. Chem. Int. Ed.* 44, 7045 (2005).
 69. Brady S. F., Clardy J.: *J. Nat. Prod.* 67, 1283 (2004).
 70. Gillespie D. E., Brady S. F., Bettermann A. D., Cianciotto N. P., Liles M. R., Rondon M. R., Clardy J., Goodman R. M., Handelsman J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4301 (2002).
 71. Brady S. F., Chao C. J., Handelsman J., Clardy J.: *Org. Lett.* 3, 1981 (2001).
 72. Lim H. K., Chung E. J., Kim J. C., Choi G. J., Jang K. S., Chung Y. R., Cho K. Y., Lee S. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7768 (2005).
 73. Foerstner K. U., von Mering C., Bork P.: *Philos.*

- Trans. R. Soc. London, Ser. B 361, 519 (2006).
74. Sebat J. L., Colwell F. S., Crawford R. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4927 (2003).
75. Boubakri H., Beuf M., Simonet P., Vogel T. M.: *Gene* 375, 87 (2007).

P. Kotrba^a, O. Uhlík^a, K. Ječná^a, M. Macková^a, and T. Macek^{a,b} (^a *Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague;* ^b *Department of Natural Products, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic*): **Metagenome – a Rich Source of Novel Biomolecules**

The finding that a vast majority of microbial species cannot be readily grown in a pure culture or has not yet been cultivated and their genetic and metabolic potentials remain unknown, caused a revolution in the microbiolo-

gists' view of microbial world. The methodology of studying microbes has experienced a significant transformation. Metagenomics, developed over the past decade, involves isolation of DNA covering genomes of a microbial community (metagenome) directly from environmental matrices, construction of the library of metagenome fragments and sequence-based or functional screening of metagenomic clones. This allows to elucidate genomes of uncultured microorganisms, to illuminate their genetic diversity, to understand their ecological significance and to provide novel useful enzymes and biomolecules. A brief view of recent advances in metagenomic strategies is provided and examples of novel enzymes and biomolecules of potential biotechnological significance are given. In spite of a large amount of information provided by metagenomics, only a limited number of genes and enzymes are currently used in biotechnological processes. The identification of novel biocatalysts and their implementation in viable production processes is a future challenge.

VŠCHT Praha přijme pracovníka na pozici technika-laboranta/laborantky pro Ústav analytické chemie.

Požadavky: středoškolské vzdělání, praxe v oboru

Nástup: 1.12.2008 nebo 1.1.2009

Velikost úvazku: 40 hodin týdně

Příhlašku včetně životopisu s přehledem dosavadní pracovní činnosti zašlete do 30. 11. 2008 na adresu: pavla.vlekova@vscht.cz

Kontakt: prof. RNDr. Štěpán Urban, CSc., tel. 220 444 267, Stepan.Urban@vscht.cz

MOŽNOSTI VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PŘI ANALÝZE ROPNÝCH VZORKŮ

JOSEF CHUDOBA^a a GUSTAV ŠEBOR^b

^a Centrální laboratoře a ^b Ústav technologie ropy a alternativních paliv, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
josef.chudoba@vscht.cz

Došlo 25.8.06, přepracováno 10.1.08, přijato 1.2.08.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, analýza, ropné frakce a produkty

Obsah

1. Úvod
2. Přehled hmotnostně-spektrometrických technik
3. Hmotnostně-spektrometrické metody
4. Hmotnostně-spektrometrické metody spojené se separací
 - 4.1. Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)
 - 4.2. Úplná vícerozměrná plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GCxGC/MS)
 - 4.3. Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS)
5. Závěr

1. Úvod

Získání informací o chemickém složení ropných frakcí a produktů jejich zpracování je nezbytným předpokladem pro řízení a optimalizaci rafinérských procesů. Vedle toho jsou informace o chemickém složení využívány také při posuzování kvality ropných produktů a při hodnocení jejich vlivu na životní prostředí. Ropné frakce a produkty představují složité víc složkové směsi. S rostoucím bodem varu frakce se zvyšuje počet možných isomerních uhlovodíků a také obsah sirných, dusíkatých a kyslíkatých sloučenin. Stanovit jednotlivé složky takovýchto složitých směsí není možné. V praxi se proto individuální složení uhlovodíkových směsí (tzv. detailní analýza) stanovuje pouze u lehkých ropných frakcí (s bodem varu přibližně do 250 °C). U výševroucích ropných frakcí se pak provádí tzv. skupinová analýza, jejímž výsledkem je zastoupení skupin chemicky příbuzných, resp. strukturně podobných sloučenin, např. nasycených uhlovodíků, mono-, di- a polyaromátů a polárních látek. Pro skupinovou analýzu výše-

vroucích ropných vzorků jsou používány různé techniky kapalinové chromatografie a ze spektrálních metod se pak pro tyto účely uplatnila také hmotnostní spektrometrie. V předchozím příspěvku¹ publikovaném v tomto časopise byl uveden přehled prací zabývajících se využitím hmotnostní spektrometrie při analýze různých typů ropných vzorků. Od té doby došlo k významnému vývoji v oblasti instrumentálního vybavení, který přinesl nové možnosti i pro analýzu ropných vzorků. Tato práce uvádí přehled hmotnostně-spektrometrických technik a shrnuje možnosti jejich využití v ropné analytice.

2. Přehled hmotnostně-spektrometrických technik

Hmotnostní spektrometrie je úzce spjata s ropným průmyslem. Jedny z prvních komerčně vyráběných hmotnostních spektrometrů byly již za 2. světové války využívány k analýze benzinových frakcí^{2,3}.

Při MS analýze jsou molekuly sloučenin přítomných v analyzovaném vzorku ionizovány vlivem dodané energie za vzniku nabitých částic, iontů. Ty jsou následně separovány podle své hmotnosti, resp. podílu hmotnosti a náboje iontu (m/z), a detegovány. Hmotnostní spektrum vzorku představuje distribuci všech detegovaných iontů v podobě histogramu, který je normalizován podle intenzity iontu s největším zastoupením.

Ionizačních technik využívaných v hmotnostní spektrometrii je celá řada a lze je rozdělit na tzv. tvrdé a měkké. Jako tvrdé ionizační techniky jsou v odborné literatuře označovány ionizace vysokou energií, která je dostatečná nejen k vytvoření iontu z neutrální molekuly, ale rovněž k jeho dalšímu štěpení za vzniku nových iontových fragmentů a neutrálních molekul. Typickým zástupcem tvrdých ionizačních technik je ionizace elektrony (electron impact – EI) s vysokou energií elektronů (~70 eV). Jde dnes o nejpoužívanější ionizační techniku, která je standardně využívána k identifikaci organických látek (pro tyto účely jsou k dispozici obsáhlé knihovny spekter).

Měkké ionizační techniky poskytují intenzivní molekulové popř. pseudomolekulové ionty a minimum fragmentů, což má za následek značné zjednodušení hmotnostního spektra. Ze spektra je tak možné získat informaci o molekulové hmotnosti látky (v případě tvrdých ionizačních technik nemusí být molekulový ion vždy zachován). Při analýze ropných vzorků se z těchto technik uplatňují především ionizace polem (field ionization – FI)^{4–9} a chemická ionizace (chemical ionization – CI)^{10,11}, dříve používaná ionizace elektrony s nízkou energií (~10 eV) je dnes na ústupu.

Nevýhodou všech výše uvedených ionizačních technik je skutečnost, že ionizace probíhají v plynné fázi,

Tabulka I
Srovnání parametrů různých typů hmotnostních spektrometrů¹⁵

Typ spektrometru	Rozlišení ^a	Přesnost při měření hmoty ^b	Nejvyšší limit m/z	Dynamický rozsah	Tlak v analyzátoru [Torr]
Kvadrupól	10^3	0,1 %	10^4	10^5	10^{-5}
Iontová past	10^3 – 10^4	0,1 %	10^5	10^5	10^{-3}
TOF	10^3 – 10^4	0,01–0,1 %	10^6	10^5	10^{-7}
Dvojitý sektor	10^3 – 10^5	5 ppm	10^4	10^7	10^{-7}
FTICR	10^6	1 ppm	10^4	10^5	10^{-9}

^a Uvedeno pro $m/z = 1000$; ^b relativní chyba u $m/z = 1000$

a jsou proto vhodné pouze pro teplotně stálé vzorky, které lze převést do plynného stavu. U ropných vzorků je jejich použití omezené a nelze je aplikovat např. na nejtěžší ropné frakce, tj. vakuové zbytky (s bodem varu vyšším než 700 °C).

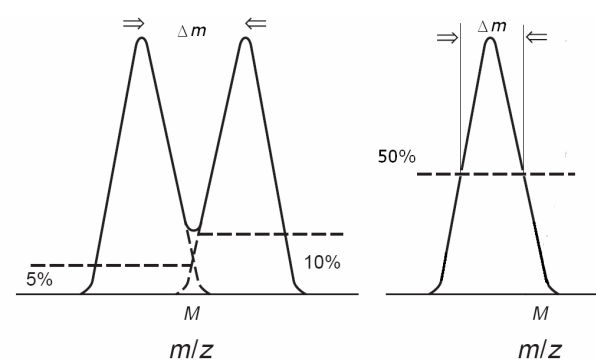
S rozvojem spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS) se lze setkat také s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) a s ionizací elektrospřejem (ESI), které selektivně ionizují převážně polární látky obsahující v molekule heteroatom. U ropných vzorků jde především o dusík nebo kyslík. Těmito ionizačními technikami lze analyzovat i teplotně nestálé nebo málo těkavé analyty. Mezi další ionizační techniky, vhodné i pro analýzu ropných zbytků, lze zařadit např. desorpci polem (field desorption – FD) nebo MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization); přehled jejich využití při analýze ropných vzorků je uveden např. v pracích^{12–14}.

V hmotnostní spektrometrii ropných frakcí se dále pro všechny používané ionizační techniky využívají nízkoroz-

lišující nebo vysokorozlišující měření. V praxi jsou při nízkorozlišujících měřeních získávána hmotnostní spektra pouze s nominálními hodnotami hmotnosti iontů resp. čísla m/z . V případě vysokorozlišujících experimentů jsou hodnoty m/z měřeny obvykle s přesností na desetinná místa. Při analýzách uhlovodíkových směsí lze pak pomocí vysokého rozlišení rozdělit ionty uhlovodíků a ionty polárních látek o stejné nominální hmotnosti. Rozlišení (R), při kterém se snímají hmotnostní spektra, je definováno jako podíl hmotnosti iontu, pro který je rozlišení uvažováno, a rozdílu hmotností dvou blízkých iontů – $R = M/\Delta m$. Rozdíl Δm je při měření rozlišení vyjádřován pomocí šířky píku iontu o hmotnosti M v tzv. kontinuálním (necentrovaném) hmotnostním spektru. V případě použití magnetických sektorových spektrometrů se používá termín „10 % valley“ nebo „5 % valley“. Vzhledem ke tvaru píku iontu, který se blíží trojúhelníku, je možné měřit šířku píku v 5 % resp. 10 % jeho výšky. U ostatních typů spektrometrů, kdy tvar píků odpovídá spíše Lorentzově křivce, se obvykle využívá měření šířky píku v polovině jeho výšky tzv. „full width at half maximum“ – FWHM. Oba způsoby měření rozlišení jsou zobrazeny na obr. 1.

Například pro rozlišení molekulových iontů naftalenů se čtyřmi uhlíky v postranních řetězcích ($C_{14}H_{16}$ – přesná hodnota molekulové hmotnosti 184,1252) a dibenzothiofenu ($C_{12}H_8S$ – přesná hodnota molekulové hmotnosti 184,0347) je nutné rozlišení přibližně 2000. Pro rozlišení stejného hmotnostního rozdílu (0,0905) pro látky s vyšší nominální hmotností je nutné použít odpovídající vyšší rozlišení. Přehled typů hmotnostních spektrometrů včetně jejich rozlišovací schopnosti (rozlišení, kterého mohou dosáhnout) je uveden v tab. I.

V oblasti ropné analytiky se v současné době využívá samotná hmotnostní spektrometrie a také hmotnostní spektrometrie v kombinaci s některou ze separačních metod – s plynovou chromatografií (GC/MS), kapalinovou chromatografií (LC/MS) nebo s některými vícerozměrnými chromatografickými technikami (např. GCxGC).



Obr. 1. Způsoby měření rozlišení při hmotnostně-spektrometrické analýze – definice 5 % a 10 % valley (vlevo) a FWHM (vpravo)

3. Hmotnostně-spektrometrické metody

Hmotnostně-spektrometrické metody bez spojení se separační technikou patří mezi nejstarší a většina z nich používá ionizaci elektrony (EI+) s vysokou energií (70 eV). Pro analýzu aromatických uhlovodíků lze využít také EI+ techniky s nízkou energií elektronů (~10 eV)^{16,17}.

Hmotnostní spektrometr je spojen s nástřikovým systémem, který umožňuje dávkování ropného vzorku do iontového zdroje spektrometru. Nástřikové systémy se skládají z vyhřívaného skleněného reservoáru, ve kterém je vzorek odpařen a kapilárou přepuštěn do iontového zdroje. Reservoár je skleněný, protože při kontaktu par vzorku s horkým kovovým povrchem existuje nebezpečí průběhu katalytických reakcí, které by měnily složení analyzovaného vzorku. V praxi se používá nejčastěji nástřikový systém AGHIS (all glass heated inlet system)^{18,19}. Vý-

hodou systému AGHIS je jeho univerzálnost, lze ho použít prakticky pro všechny typy ropných vzorků, nevýhodou je jeho vyšší pořizovací cena a náročná údržba. Jako alternativní nástřikový systém byl zkonstruován např. tzv. „dynamic batch inlet system“ (DBIS)¹⁸. Má však jen omezené použití limitované teplotou zplynění vzorku. V praxi bývá nejčastěji používán pro analýzu středních ropných destilátů, tj. frakcí vřoucích do cca 400 °C.

Pro výševroucí ropné frakce (vakuové destiláty) se jako alternativa k AGHIS používá také přímé dávkování vzorku sondou označované jako „direct-insertion probe“²⁰. Při jejím použití je vzorek dávkován do mikrozkušavky umístěné ve vyhřívaném držáku sondy. Sonda je pak přes vakuový zámek zavedena přímo do iontového zdroje spektrometru. V evakuovaném zdroji je mikrozkušavka rychle ohřata, vzorek odpařen a následně ionizován. Zlepšení přímého vstupu představuje systém označovaný jako Mini-

Tabulka II

Přehled hmotnostně-spektrometrických metod skupinové analýzy ropných vzorků – ionizační technika EI+ (70 eV)

MS metoda	Předúprava vzorku	Destilační rozmezí vzorku [°C] ^a	Rozlišení	Počet stanovovaných uhlovodíkových skupin	Počet stanovovaných skupin sírných látek	Rok zavedení, (poslední revize)	Lit.
ASTM D2425	separace na nasycený a aromatický podíl kapalinovou adsorpční chromatografií	205–340	nízké	12	0	(2004)	24
ASTM D2786	separace na nasycený a aromatický podíl kapalinovou adsorpční chromatografií – analýza nasyceného podílu	205–540	nízké	7	0	(1996)	22
ASTM D3239	separace na nasycený a aromatický podíl kapalinovou adsorpční chromatografií – analýza aromatického podílu	205–540	nízké	19	3	(1996)	23
Robinson	není vyžadována	90–540	nízké	23	3	1971	28
HC-22	není vyžadována	180–530	vysoké (5000)	18	4	1985 (1996)	25
HC-33	není vyžadována	180–530	vysoké (10 000)	18	15	1990	26
Fisher	není vyžadována	180–530	vysoké (10 000)	18	4	1974	27
D2425 M	není vyžadována	180–360	vysoké (3000)	12	2	1983 (2002)	28, 29

^a 5 % a 95 % bod destilační křivky

AGHIS²⁰. Vzorek je i v tomto případě do iontového zdroje spektrometru dávkován pomocí sondy přímého vstupu, ale před ionizačním prostorem zdroje je umístěn vyhřívaný mikrozásobník s přepouštěcí mikrokapilárou ústící do ionizačního prostoru.

Někdy se jako nástřikový systém využívá také plynový chromatograf s kapilární kolonou²¹. Na té sice dochází k separaci vzorku, ale při aplikaci samotných MS metod se získává zpět spektrum neseparovaného vzorku kombinací hmotnostních spekter měřených po celý průběh eluce vzorku.

Popsané systémy dávkování vzorku v kombinaci především s EI+ ionizační technikou s energií elektronů 70 eV se uplatňují při semikvantitativní skupinové analýze ropných vzorků. Využívá se při ní skutečnosti, že chemicky příbuzné a strukturně podobné látky vykazují podobná spektra s charakteristickými fragmenty; např. nasycené uhlovodíky mají fragmenty m/z 57, 71, 85, 99 atd., alkylbenzeny pak m/z 91, 105, 119, 131 atd.

Suma intenzit fragmentů charakteristických pro danou skupinu látek je úměrná koncentraci této skupiny v analyzovaném vzorku. Složení vzorku je pak získáno maticovým výpočtem vycházejícím z intenzit charakteristických iontů stanovených z hmotnostního spektra a definované matice kalibračních koeficientů. V současné době je k dispozici několik ASTM metod^{22–24} založených na tomto principu. Vedle těchto standardizovaných metod pak existuje celá řada dalších postupů, které byly vyvinuty převážně laboratořemi ropných koncentrátů, např. metoda HC-22 (cit.²⁵), HC-33 (cit.²⁶) a další^{27–30}; jejich přehled je uveden v tab. II.

Prakticky všechny publikované metody zahrnují i kalibrační data, která byla získána jak proměřením jednotlivých skupin sloučenin různých typů ropných vzorků, tak i celé řady standardních uhlovodíků. Při použití těchto kalibračních dat je však třeba zohlednit použité přístrojové vybavení i charakter analyzovaného vzorku. I když podle závěrů prací zabývajících se touto problematikou je většina nástřikových systémů zaměnitelná^{18,21} bez výrazného vlivu na výsledky analýzy, pro jednotlivé typy hmotnostních spektrometrů tato skutečnost neplatí³¹. Proto se v praxi provádí kontrola a případně i oprava kalibračních dat proměřením a porovnáním složení referenčních vzorků s definovaným nebo známým složením (pro tyto účely se využívá srovnání s výsledky získanými nezávislými analytickými metodami, především chromatografickými).

Hmotnostně-spektrometrická skupinová analýza je v rafinérské praxi používána hlavně k relativnímu porovnání složení studovaných vzorků, v současné době především středních a vakuových destilátů^{32–34}. Její výhodou oproti zavedeným chromatografickým postupům je především rychlost a skutečnost, že poskytuje i více informací o složení analyzovaného vzorku. Hlavní omezení použití této skupinové analýzy představuje přítomnost některých vzájemně interferujících skupin sloučenin. Typickým příkladem jsou např. alkeny a cykloalkany, které nelze díky stejné fragmentaci ve směsném hmotnostním spektru od sebe oddělit. Limitovány jsou MS metody zpravidla i ob-

sahem sirných, dusíkatých a kyslíkatých látek v analyzovaném vzorku, které mají na výsledek stanovení rušivý vliv. Pokud se týká dalších měkkých ionizačních technik, především FI a CI, ty jsou dnes většinou aplikovány, jak bude diskutováno dále, ve spojení s některou ze separačních chromatografických metod.

4. Hmotnostně-spektrometrické metody spojené se separací

4.1. Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

Plynová chromatografie s EI+ hmotnostně-spektrometrickou detekční koncovkou je v ropném průmyslu používána zejména pro detailní kvalitativní analýzu lehkých ropných frakcí a kvantitativní analýzu určitých látek (aditiva, sirné látky apod.). Detailní analýzy jsou využívány především pro vývoj GC aplikací ke stanovení oktanového čísla a pro provádění skupinových analýz benzinů^{35,36} – *n*-alkany, isoalkany, alkeny, cykloalkany a aromáty (PIONA analýzy). V odborné literatuře lze nalézt také práce zaměřené na detailní analýzu tryskového petroleje³⁷. Pro lehké ropné frakce jsou rovněž zaváděny postupy používající rychlou plynovou chromatografii s úzkými (0,1 mm) kapilárními kolonami v kombinaci s odpovídajícím rychle skenujícím detektorem, v současné době kvadrupólem a nízkorozlišujícím TOF detektorem^{38,39}. Pro výševroucí ropné frakce se využití GC/MS omezuje na skupinovou analýzu a kvantitativní analýzu vybraných komponent, např. dusíkatých^{40,41}, sirných^{11,42,43} a kyslíkatých sloučenin⁴⁴. Pro vakuové destiláty se využívá vysokoteplotní plynová chromatografie (HTGC)^{45,46} v kombinaci s vhodným způsobem dávkování vzorku – nástřik vzorku přímo na kolonu (on-column) nebo použití teplotně programovatelného (PTV) nástřikového členu⁴⁷. Provedeny byly rovněž GC/MS simulované destilace různých ropných frakcí⁴⁸.

Skupinová analýza středních destilátů ve spojení s GC/MS dnes převážně používá měkké ionizační techniky. Jejich výhodou proti EI+ ionizaci je zjednodušení kvalitativní analýzy, hmotnostní spektra obsahují pouze molekulové popř. pseudomolekulové ionty. Pro kvantitativní analýzu je však velkou nevýhodou skutečnost, že odezva MS detektoru není pro všechny přítomné složky univerzální. V praxi jsou proto faktory odezvy pro skupiny látek aproximovány faktorem odezvy vybrané základní látky ve skupině. Aplikace pro úplnou skupinovou analýzu motorových naft včetně stanovení cyklických uhlovodíků vyvinula Bricker^{4,5} s využitím kvadrupolového hmotnostního filtru a FI ionizace. Využití vysokorozlišujícího TOF detektoru ve spojení GC/FIMS pro analýzu středních destilátů uvádí např. Quin⁶. Metodu skupinové analýzy středních a výševroucích ropných frakcí s využitím chemické ionizace oxidem dusnatým v kombinaci s elektrickým výbojem (toward discharge nitric oxide chemical ionization – TD-NOCI) prezentovali Dzidic a spol.¹⁰

4.2. Úplná vícerozměrná plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GCxGC/MS)

Podstatou úplné (comprehensive) vícerozměrné plynové chromatografie je separace analyzovaného vzorku na dvou kolonách, nepolární a polární, spojených modulátorem. Nejprve je vzorek separován podle bodu varu na nepolární, obvykle dlouhé, kapilární GC koloně. Separace poté pokračuje na velmi krátké, většinou polární koloně, kde jsou látky během několika sekund děleny izotermně podle své polarit. Separace na první koloně je v pravidelných intervalech přerušována rychlou kryofokusací modulátorem, který vzorek eluovaný z první kolony převádí na druhou vyhřátou kolonu. Součástí GCxGC instrumentace musí být i odpovídající detektor s velmi rychlou odezvou. Ve většině případů je spojována s FID nebo rychlým nízkorozlišujícím MS TOF detektorem^{49,50}. Existuje však již i spojení GCxGC se sirmým chemiluminescenčním (SCD)^{51,52}, atomovým emisním (AED)⁵³ nebo dusíkatým chemiluminescenčním (NCD) detektorem pro selektivní detekci sirmých, resp. dusíkatých látek⁵⁴. Základy GCxGC techniky včetně možností jejího využití pro analýzu ropných vzorků jsou popsány např. v přehledových referátech Blomberga a spol.⁵⁵, Philipse a spol.⁵⁶ nebo Muhlena a spol.⁵⁷. V ropném průmyslu je GCxGC chromatografie využívána převážně k detailní a skupinové analýze frakcí s b.v. přibližně do 400 °C, tj. benzinů a středních destilátů. Typickými aplikacemi jsou analýza aromátů a kyslíkatých sloučenin v automobilových benzinech⁵⁷, analýza leteckých petrolejů⁵⁸, motorových naft a dalších středně-vroucích ropných frakcí např. lehkých cyklových olejů^{38,59}. Velkou nevýhodou

GCxGC techniky je zatím jednak její vysoká cena, a dále také pouze omezené použití pro výše uvedené typy ropných vzorků³⁸.

4.3. Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS)

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie je dnes reprezentováno především dvěma nejrozšířenějšími ionizačními technikami – elektrosprejem (ESI) a chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI). V odborné literatuře se lze rovněž setkat s EI nebo FI ionizací ve spojení s nekonečným pásem (moving belt interface) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Pro charakterizaci chemického složení nasycených, resp. aromatických podílů vakuových destilátů využili toto spojení např. Hsu a spol. a to v kombinaci s ionizací polem⁸, resp. EI+ ionizací s nízkou energií elektronů a vysokým rozlišením¹⁶. Další, dnes již méně rozšířenou ionizační techniku, představuje ionizace termosprejem (TSP)⁶⁰.

ESI a APCI ionizační techniky jsou dnes spojovány ve většině případů s přímým dávkováním vzorku rozpuštěným ve vhodném rozpouštědle (tzv. direct infusion). Obě ionizační techniky ionizují převážně polární látky (v ropných vzorcích dusíkaté a kyslíkaté). Za určitých podmínek lze ionizovat také polyaromáty^{61,62} nebo sirmé látky^{63,64}. Odezvy různých dusíkatých látek při použití ESI porovnávali např. Qian a spol.^{65,66}, kteří potvrdili selektivní detekci především zásaditých dusíkatých látek v pozitivním módu (ESI+). Pro naftenové kyseliny doporučuje Hsu⁶⁷ využití negativní APCI s acetonitrem jako mobilní fázi. Sirmé sloučeniny ve složitě směsi látek selektivně ionizoval elektrosprejem po přidávku roztoku solí palladia Rudzinski⁶³.

Tabulka III

Přehled využití ionizačních technik ESI a APCI při analýze vysokovroucích ropných frakcí

Typ analyzovaných sloučenin	Důvod jejich monitorování	Ionizační technika	Lit.
PAH	ochrana životního prostředí	ESI (Ag ⁺ sůl)	61, 62
Sirmé látky	ochrana životního prostředí, problematika katalyzátorů	ESI (Pd ²⁺ sůl) ESI	63 64
Metalporfyriny	ochrana katalyzátorů	APCI	69
Dusíkaté látky – neutrální a kyselé	korozí rafinérských zařízení, problematika katalyzátorů, studium stability ropných produktů při skladování	ESI–	70
Dusíkaté látky – bazické	deaktivace některých katalyzátorů	ESI+	65,66
Naftenové kyseliny	korozí rafinérských zařízení, geochemický význam – migrace a biodegradace rop	APCI– ESI–	67 71

Přestože Roussis a Proux⁶¹ prokázali ionizaci aromatických uhlovodíků ve vysokovroucích ropných frakcích v přítomnosti stříbrných iontů při ESI ionizaci, praktické využití pro získání distribuce jejich molekulových hmot komplikovala složitá interpretace spekter kvůli tvorbě vícenásobně nabitých iontů.

Nevýhodou ESI proti APCI při analýzách ropných vzorků je především nekompatibilita s chromatografií s normálním uspořádáním fázi⁶⁸. Aplikace ionizačních technik APCI a ESI při analýze vysokovroucích ropných frakcí jsou shrnuty v tab. III.

Jedno z prvních použití ESI techniky v hmotnostní spektrometrii ropných vzorků publikovali Zhan a spol.⁷², kteří ji použili pro analýzu aditiv v leteckém petroleji. Většina dalších prací publikovaných v této oblasti je spjata s ultravysokorozlišujícími spektrometry iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FTICR). První využití FTICR při analýze ropných vzorků představuje práce Miyabayashiho a spol.⁷³ při analýze zbytků z arabských rop.

Vysoká rozlišovací schopnost FTICR přístrojů umožňuje identifikovat elementární složení vzniklých iontů a rozdělit ionizované sloučeniny do skupin např. podle počtu atomů kyslíků (jednosytné a vicesytné naftenové kyseliny). S využitím ESI+ se podařilo identifikovat až 3000 dusíkatých látek⁶⁵ ve vzorcích vysokovroucích ropných frakcí a s ESI– pak až 3000 kyslíkatých látek⁷¹. Nedávno byla použita ultravysokorozlišující FTICR MS ke studiu hydrogenační rafinace, resp. hydrokrakování atmosférických⁷⁴ i vakuových destilátů⁷⁵ a při geochemických studiích^{76–78}. Přehledný referát o možnostech využití FTICR publikoval např. Marshal⁷⁹ nebo Rodgers a spol.⁸⁰.

Vedle prací, ve kterých jsou prototypové a komerční FTICR hmotnostní spektrometry využity v rámci různých analytických studií, se v odborné literatuře stále častěji objevují práce s využitím ostatních komerčních nízko- a vysokorozlišujících spektrometrů. Typickými aplikacemi jsou „fingerprinty“ ropných zbytků⁸¹, charakterizace různých paliv – posouzení rozdílů mezi palivy daných přítomností barviv, aditiv a ostatních polárních látek⁸², analýza aditiv⁸³, inhibitorů koroze v automobilových benzinech, mazivostních přísad v motorových naftách a polárních komponent bionaft⁸⁴.

5. Závěr

Článek shrnuje současné možnosti využití hmotnostní spektrometrie v ropné analytice. Semikvantitativní metody skupinové analýzy ropných vzorků používají převážně EI+ ionizační techniku s vysokou energií ionizujících elektronů (70 eV). Hmotnostní spektrometry jsou spojeny se speciálně konstruovanými nástřikovými systémy, které umožňují přímé dávkování vzorku do iontového zdroje spektrometru. Matematickým zpracováním změřeného směšného spektra lze získat skupinové složení analyzovaného vzorku. Aplikace MS metod bez spojení se separací jsou rychlé a jejich výsledky jsou srovnatelné s výsledky získanými při použití chromatografických po-

stupů. V rafinérské praxi jsou tyto MS metody používány především pro relativní srovnávání skupinového složení středních a vakuových destilátů.

Hmotnostní spektrometrie je rovněž využívána ve spojení s některou ze separačních technik. Ve většině případů jde o spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrony (EI+) nebo ionizací polem (FI). Mimo kvadrupólové hmotnostní spektrometry se ve stále větší míře uplatňuje MS TOF detektor, a to především pro skupinové analýzy středních ropných destilátů (motorové nafty a letecké petroleje). Nově jsou rovněž aplikovány rychlá plynová chromatografie nebo vysokoteplotní plynová chromatografie pro výševroucí ropné frakce.

Pro dosažení vyšší účinnosti separace jsou používány vícerozměrné separační techniky ve spojení s nízko-rozlišujícími rychle skenujícími TOF detektory. Uplatňují se při detailní charakterizaci leteckých petrolejů a motorových naft. Vzhledem ke skutečnosti, že odezva prakticky všech MS detektorů není univerzální, je při skupinové analýze stále častěji používáno paralelní zapojení detektorů s univerzální odezvou např. FID, nebo SCD pro selektivní detekci sirných látek.

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie je dnes používáno především s APCI a ESI ionizačními technikami, které selektivně ionizují dusíkaté nebo kyslíkaté sloučeniny. K identifikaci těchto sloučenin ve výše vroucích ropných frakcích je však zapotřebí ultravysokého rozlišení, kterého je možné dosáhnout pouze na FTICR MS spektrometrech. Spojení LC/MS v kombinaci s běžnými nízko- a vysokorozlišujícími komerčními spektrometry je používáno zatím především pro získání fingerprintů ropných frakcí a identifikaci vybraných aditiv a dalších látek používaných v motorových palivech a mazacích olejích.

Seznam zkratk

AED	atomový emisní detektor
AGHIS	(all glass heated inlet system) – nástřikový systém hmotnostního spektrometru pro analýzu ropných frakcí
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APCI+	kladná chemická ionizace za atmosférického tlaku
APCI–	záporná chemická ionizace za atmosférického tlaku
ASTM	American Society for Testing Materials
CI	chemická ionizace
DBIS	(dynamic batch inlet system) – nástřikový systém hmotnostního spektrometru pro analýzu ropných frakcí
EI+	kladná ionizace elektrony
ESI	ionizace elektrosprejem
ESI+	kladná ionizace elektrosprejem
ESI–	záporná ionizace elektrosprejem
FAST GC	rychlá plynová chromatografie
FI	ionizace polem

FD	desorpce polem
FTICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC x GC	úplná vícerozměrná plynová chromatografie
HTGC	vysokoteplotní plynová chromatografie
NCD	dusíkatý chemiluminescenční detektor
PIONA	(paraffins, isoparaffins, olefins, naphthenes, aromatics) – skupinová analýza lehkých ropných frakcí
PTV	teplotně programovatelné zplynění vzorku – nástřiková technika v GC
SCD	sírný chemiluminescenční detektor
TSP	termosprejová ionizace
TD-NOCI	chemické ionizace oxidem dusnatým v kombinaci s elektrickým výbojem

Práce byla realizována v rámci projektu MŠMT ČR č. MSM 6046137304.

LITERATURA

- Mitera J., Šebor G.: Chem. Listy 77, 449 (1983).
- Brown R.: Anal. Chem. 23, 430 (1951).
- Lumpkin H. E., Thomas B. W., Elliot A.: Anal. Chem. 24, 1389 (1952).
- Bricker Y., Ring Z., Iacchelli A., McLean N., Rahimi P. M., Fairbridge C.: Energy Fuels 15, 23 (2001).
- Bricker Y., Ring Z., Iacchelli A., McLean N., Fairbridge C.: Energy Fuels 15, 966 (2001).
- Qian K., Dechent J. G.: Anal. Chem. 74, 3977 (2002).
- Wang F. Ch., Qian K., Green L.A.: Anal. Chem. 77, 2777 (2005).
- Liang Z., Hsu C. S.: Energy Fuels 12, 637 (1998).
- Rio J. C., Philp P. R.: Org. Geochem. 30, 279, (1999).
- Dzidic I., Petersen H. A., Wadsworth P. A., Hart H. V.: Anal. Chem. 64, 2227 (1992).
- Dzidic I., Balicki M. D., Rhodes I. A. L., Hart H. V.: J. Chromatogr. Sci. 26, 236 (1988).
- Sheu E. Y.: Energy Fuels 16, 74 (2002).
- Qian K., Edwards E. K., Siskin M.: Energy Fuels 15, 949 (2001).
- Hsu C. S.: *Analytical Advances for Hydrocarbon Research*, kap. 16. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2003.
- Hsu C. S.: *Analytical Advances for Hydrocarbon Research*, str. 320. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2003.
- Hsu C. S., McLean M. A., Qian K., Aczel T., Blum S. C., Olmstead W. N., Kaplan L. H., Robbins W. K., Schulz W. W.: Energy Fuels 5, 395 (1991).
- Chasey K. L., Aczel T.: Energy Fuels 5, 386 (1991).
- Roussis S. G., Cameron A. S.: Energy Fuels 11, 879 (1997).
- Lumpkin H. E., Taylor G. R.: Anal. Chem. 33, 476 (1961).
- Fafet A., Bonnard J., Priget F.: Oil Gas Sci. Technol. 54, 453 (1999).
- Roussis S. G., Fitzgerald W. P.: Energy Fuels 15, 477 (2001).
- ASTM D2786-96: *Standard Test Method for Hydrocarbon Types Analysis of Gas-Oil Saturates Fractions by High Ionizing Voltage Mass Spectrometry* (2006).
- ASTM D3239-96: *Standard Test Method for Hydrocarbon Types Analysis of Gas-Oil Aromatics Fractions by High Ionizing Voltage Mass Spectrometry* (2006).
- ASTM D2425-04: *Standard Test Method for Hydrocarbon Types in Middle Distillates by Mass Spectrometry* (2004).
- Teeter R. M.: Mass Spectrom. Rev. 4, 123 (1985).
- Bouquet M., Brument J.: Fuel Sci. Technol. Int. 8, 961 (1990).
- Robinson C. J., Cook G. L.: Anal. Chem. 43, 1425 (1971).
- Fisher I.P., Fischer P.: Talanta 21, 867 (1974).
- Castex H., Boulet R., Juguin J., Lepinasse A.: Rev. IFP 38, 523 (1983).
- Fafet A., Bonnard J., Priget F.: Oil Gas Sci. Technol. 54, 439 (1999).
- Ashe R. T.: Energy Fuels 5, 356 (1999).
- Li Y., Deng X., Yu W.: Fuel 77, 277 (1998).
- Pillon L. Z.: Petrol. Sci. Technol. 20, 223 (2002).
- Kramer D. C., Ziemer J. N., Cheng M. T., Fry C. E., Reynolds R. N., Lok B. K., Sztenderowicz M. L.: *66th NLGI Annual Meeting: Influence of Group II & III Base Oil Composition on VI And Oxidation Stability.*, paper No. 9907 (Kress R., ed.), Tucson, Arizona, October 24–27, 1999.
- Hsu C. S.: *Analytical Advances for Hydrocarbon Research*, kap. 6, 7. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2003.
- Beens J., Brinkman U. A. Th.: Trends Anal. Chem. 19, 260 (2000).
- Lai W.-C., Song C.: Fuel 74, 1436 (1995).
- Duersen M.: *PhD práce*, Technische Universiteit, Eindhoven 2002.
- Veriotti T., Sacks R.: Anal. Chem. 72, 3063 (2000).
- Mushrush G. W., Beal E. J., Hardy D. R., Hughes J. M.: Fuel Process. Technol. 61, 197 (1999).
- Laredo G. C., Leyva S., Alvarez R., Mares M. T., Castillo J., Cano L. J.: Fuel 81, 1341 (2002).
- Garcia L. C., Becchi M., Grenier-Loustalot M. F., Paysse O., Szymanski R.: Anal. Chem. 74, 3849 (2002).
- Depauw A. G., Froment G. F.: J. Chromatogr., A 761, 231 (1997).
- Clemente J. S., Prasad N. G. N., MacKinnon M. D., Fedorak P. M.: Chemosphere 50, 1265 (2003).
- Gallegos E. J., Fetzer J. C., Carlson R. M., Pena M. M.: Energy Fuels 5, 376 (1991).
- Roehner R. M., Fletcher J. V., Hanson F. V.: Energy Fuels 16, 211 (2002).
- Gerstel: *Sample Introduction Techniques for Capillary Gas Chromatography*, Gerstel Application Note, Version 3.0 11/98, 1998.
- Roussis S. G., Fitzgerald P. W.: Anal. Chem. 72, 1400 (2000).

49. Edam R., Blomberg J., Janssen H. G., Schoenmakers P. J.: *J. Chromatogr., A* 1026, 12 (2005).
50. Marriott P. J., Morrison P. D., Shellie R. A., Dunn M. S., Sari E., Ryan D.: *LC GC Eur.* 12, 1 (2003).
51. Hua R., Li Y., Liu W., Zheng J., Wei H., Wang J., Lu X., Kong. H., Xu G.: *J. Chromatogr., A* 1019, 101 (2003).
52. Hua R., Wang J., Kong H., Liu X., Lu X., Xu G.: *J. Sep. Sci.* 27, 691 (2004).
53. Stee L. P., Beens J., Vreuls R. J. J., Brinkmann U. A. T.: *J. Chromatogr., A* 1019, 89 (2003).
54. Wang F. Y.-C., Robbins W. K., Greaney M. A.: *J. Sep. Sci.* 27, 468 (2004).
55. Blomberg J., Schoenmakers P. J., Brinkman U. A. Th.: *J. Chromatogr., A* 972, 137 (2002).
56. Philips J. B., Xu J.: *J. Chromatogr., A* 703, 327 (1995).
57. Muhlen C., Zini A. C., Caramao E. B., Marriott P. J.: *J. Chromatogr., A* 1105, 39 (2006).
58. Fraga C. G., Prazen B. J., Synovec R. E.: *Anal. Chem.* 72, 4154 (2000).
59. Vendevure C., Guerrero R. R., Bertoncini F., Duval L., Thiebaut D., Hennion M.-C.: *J. Chromatogr., A* 1026, 21 (2005).
60. Hsu Ch. S., Qian K.: *Energy Fuels* 7, 268 (1993).
61. Roussis S. G., Proulx R.: *Anal. Chem.* 74, 1408 (2002).
62. Berkel G. J., Asano K. G.: *Anal. Chem.* 66, 2096 (1994).
63. Rudzinski W. E., Sassman S. A., Watkins L. M.: *Am. Chem. Soc., Div. Petrol. Chem., Prepr.* 45, 564 (2000).
64. Müller H., Andersson J. T.: *Anal. Chem.* 77, 2536 (2005).
65. Qian K., Edwards K. E., Diehl J. H., Green L. A.: *Energy Fuels* 18, 1784 (2004).
66. Qian K., Rodgers R. P., Hendrickson C. L., Emmett M. R., Marshall A. G.: *Energy Fuels* 15, 492 (2001).
67. Hsu C. S., Dechert G. J., Robbins W. K., Fekuda E. K.: *Energy Fuels* 14, 217 (2000).
68. Hsu C. S.: *Analytical Advances for Hydrocarbon Research*, str. 301, Kluwer Academic/Plenum Publishers, NewYork 2003.
69. Rodgers R. P., Hendrickson C. L., Emmett M. R., Marshall A. G., Greanday M. G., Qian K.: *Can. J. Chem.* 79, 546 (2001).
70. Hughey C. A., Rodgers R. P., Marshall A. G., Qian K., Robbins W. K.: *Org. Geochem.* 33, 743 (2002).
71. Qian K., Robbins W. K.: *Energy Fuels* 15, 1505 (2001).
72. Zhan D., Fenn J. B.: *Int. J. Mass Spectrom.* 194, 197 (2000).
73. Miyabayashi K., Teranishi T., Naitto Y., Tsujimmito K., Miyalke M.: *Chem. Lett.* 29, 172 (2000).
74. Hughey C. A., Hendrickson C. L., Rodgers R. P., Marshall A. G.: *Energy Fuels* 15, 1186 (2001).
75. Wu Z., Rodgers R. P., Marshall A. G.: *Energy Fuels* 19, 1072 (2005).
76. Hughey Ch. A., Rodgers R. P., Marshall A. G.: *Anal. Chem.* 74, 4145 (2002).
77. Tomczyk N. A., Winans R. E., Shinn J. H., Robinson R. C.: *Energy Fuels* 15, 1498 (2001).
78. Rodgers R. P., Klein G. C., Stanford L. A., Kim S., Marshall A. G.: *Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem., Prepr.* 49, 483 (2004).
79. Marshall A. G., Rodgers R. P.: *Acc. Chem. Res.* 37, 53 (2004).
80. Rodgers R. P., Schlaub T. M., Marshall A. G.: *Anal. Chem.* 77, 20A (2005).
81. Eide I., Zahlse K.: *Energy Fuels* 19, 964 (2005).
82. Rostad C. E.: *Energy Fuels* 19, 922 (2005).
83. Hsu C. S.: *Analytical Advances For Hydrocarbon Research*, kap. 12. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New-York 2003.
84. Holčápek M., Jandera P., Fischer J., Prokeš B.: *J. Chromatogr., A* 858, 13 (1999).

J. Chudoba^a and G. Šebor^b (^aLaboratory of Mass Spectrometry, ^bDepartment of Petroleum Technology and Petrochemistry, Institute of Chemical Technology, Prague): **Mass Spectrometry in Analysis of Petroleum**

The present work summarizes current trends in application of mass spectrometry (MS) to petroleum analysis. Various MS ionization techniques are currently used for monitoring composition of petroleum. For group analyses of middle and vacuum petroleum fractions, electron impact (70 eV EI+) ionization is used in spectrometers connected to special batch inlet systems. For middle petroleum fractions, combinations of MS with gas chromatography or comprehensive multidimensional gas chromatography are intensively studied. In addition to quadrupole and sector mass spectrometers, TOF MS detectors are also used as the soft ionization techniques like field (FI) or chemical ionization (CI). For quantitative analysis, FID or selective detectors for sulfur and nitrogen compounds are preferred due to their universal response. For qualitative analyses, MS is mostly used. Liquid chromatography is combined with electrospray ionization or atmospheric pressure CI especially for nitrogen and oxygen compounds. For higher-boiling fractions, Fourier transform ion cyclotron resonance spectrometers are used due to their ultrahigh resolution which makes it possible to distinguish polar compounds and hydrocarbons.

PRINCIPY A VYUŽITÍ KOMETOVÉ ANALÝZY PŘI DETEKCI POŠKOZENÍ DNA

MIROSLAV DVOŘÁK
a MILENA MATEJOVIČOVÁ

Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno
eaglestar2@hotmail.com, matejovic@med.muni.cz

Došlo 23.7.07, přepracováno 10.12.07, přijato 10.1.08.

Klíčová slova: poškození DNA, kometová analýza, gelová elektroforéza

Obsah

1. Úvod
2. Princip a metody kometové analýzy
3. Vizualizace a hodnocení komet
4. Aplikace
 - 4.1. Ekologický monitoring
 - 4.2. Genotoxicita, oxidativní stres a protektivní účinky antioxidantů
 - 4.3. Biomonitoring
 - 4.4. Klinický skrínig a diagnostika
 - 4.5. Detekce apoptózy
5. Závěr

1. Úvod

Kometová analýza (comet assay) neboli gelová elektroforéza jednotlivých buněk (SCGE – single cell gel electrophoresis) je mikroelektroforetická metoda pro zjištění poškození DNA a to v jednotlivých buňkách. Poprvé byla publikována v roce 1984 (cit.¹), ale své kořeny má již v 70. letech 20. století². Od té doby prošla tato metoda mnoha úpravami a zdokonaleními. V současné době se používají dvě základní modifikace kometové analýzy – alkalická SCGE³ a neutrální SCGE⁴. Obě modifikace vychází z původní práce Ostlinga a Johansona z roku 1984 (cit.¹). Alkalická SCGE, při níž dochází k separaci obou vláken DNA, je využívána pro detekci především zlomů jednořetězcových (SSB – single strand breaks); neutrální SCGE pak pro zlomy dvouřetězcové (DSB – double strand breaks). Ke zlomům dochází v důsledku přerušení fosfodiesterové vazby mezi dvěma sousedními deoxynukleotidy. Dvouřetězcové zlomy se dělí na posunuté, které vznikají na obou řetězcích v různých, ale blízkých místech, a na zarovnané, jež vznikají protilehle. Při vzniku zlomů v řetězcích DNA figurují tzv. AP místa (apurinové/

apyrimidinové místo, místo bez dusíkaté báze). AP místa jsou alkalilabilní a při vysokém pH jsou přeměněna na zlomy v řetězcích.

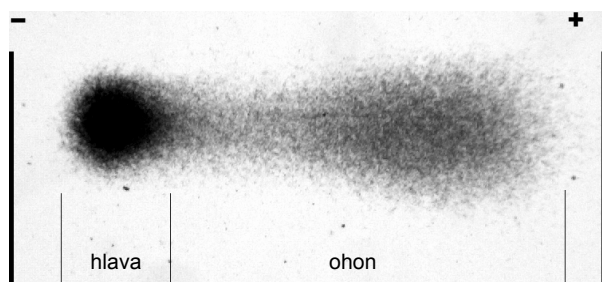
Pro kometovou analýzu lze použít dělicí se i nedělicí se buňky v pokusech *in vivo* nebo *in vitro*. Ačkoli je tato metoda používána většinou pro posouzení poškození DNA živočišných buněk, lze ji aplikovat i na buňky rostlinné. Rostlinné buňky však, na rozdíl od živočišných, mají kolem sebe buněčnou stěnu, která tvoří překážku pro analýzu komet. Dnes je kometová analýza používána v mnoha různých aplikacích a oborech. Pomocí SCGE jsou například testovány farmakologické látky, protektivní účinky mnoha přírodních látek, zatížení prostředí kontaminacemi, účinnost či toxicita kosmetických přípravků. Dále je možné využít kometovou analýzu při klinické diagnostice různých patologických stavů.

2. Princip a metody kometové analýzy

Detekce zlomů molekuly DNA a jejich kvantifikace v jednotlivých buňkách byla poprvé použita v práci Rydberga a Johansona (1978, cit.²). Buňky byly imobilizovány v agaróze na mikroskopických sklíčkách a lyzovány v mírně alkalickém roztoku, tak aby DNA byla částečně relaxovaná. Po neutralizaci byly buňky obarveny akridinovou oranží. Poměr zelené (dvouřetězcová DNA) a červené (jednořetězcová DNA) fluorescence byl poté změněn fotometricky. Citlivost detekce poškození DNA v jednotlivých buňkách byla zvýšena použitím elektroforézy¹. Postup byl podobný jako u předcházející metody, ale buňky byly navíc vystaveny elektroforéze. Výsledný obrazec vlivem migrace poškozené DNA připomínal kometu (obr. 1), odtud kometová analýza. V této podobě se však metoda neujala. Obecně přijata byla až její modifikace z roku 1988 (cit.³), jež byla provedena v alkalických podmínkách. Alkalické podmínky ještě více zvýšily citlivost této metody.

I když se jednotlivé protokoly používané při kometové analýze v mnoha detailech liší, lze postup zobecnit. Mikroskopická sklíčka jsou potažena na jedné straně normální agarózou. Po zpolymerování agarózy na podložních sklíčkách je suspenze analyzovaných buněk v nosném médiu (např. PBS) smíchána s nízkotající agarózou (LMPA – low melting point agarose). LMPA má oproti normální agaróze sníženou teplotu tuhnutí. Zatímco normální agaróza vytváří gel za teplot kolem 50 °C, LMPA je za fyziologických teplot ještě tekutá. To umožňuje přidání zkoumaných buněk do prochládlého roztoku agarózy a snižuje se tak riziko poškození buněk vysokou teplotou.

Buňky s gelem jsou naneseny na podložní sklíčko, přikryty krycím sklíčkem a uloženy do chladu, tak aby LMPA s buňkami ztuhla. Skla jsou vložena do lyzačního roztoku. Složení roztoku není mezi jednotlivými laborato-



Obr. 1. Buňka HL-60 inkubovaná s alkaloidem chelerytrinem ($3 \mu\text{g ml}^{-1}$) 60 minut a obarvená stříbřením; na obrázku je vyznačena pozice a polarita elektrod při elektroforéze

řemi jednotné, převážně obsahuje soli a různé detergenty. Působením lyzačního roztoku jsou z buněk odstraněny membrány, cytoplazma a většina nukleárních proteinů, DNA zůstává ve formě tzv. nukleoidu. Nukleoid je tvořen superhelixovou DNA připojenou k nukleární matrix.

Při alkalické, nebo alkalicko-neutrální modifikaci jsou skla po ukončení inkubace buněk v lyzačním roztoku vkládána do alkalického denaturačního roztoku. Denaturace se provádí při pokojové teplotě za tmy, obvykle 20 minut. Protože denaturovaná DNA, tj. zbařená struktura superhelixu, je velmi citlivá k poškozením, je nutné chránit gely po denuraci před expozicí na denním světle nebo bílém zářivkovém světle, které by mohlo způsobit zlomy a poškození bázi denaturované DNA. Pro další práci s gely se používá pouze žluté světlo.

Po denuraci se provádí elektroforéza, buď v alkalickém elektrodovém pufru, většinou s pH 12–13, nebo při alkalicko-neutrální modifikaci metody v elektrodovém pufru obvykle s pH 7–8. Při aplikaci neutrální modifikace metody je krok alkalické denaturace vynechán a elektroforéza následuje hned po lýze v neutrálním elektrodovém pufru v horizontální elektroforetické vaně. Skla s nukleoidy imobilizovanými v agaróze se umístí do elektroforetické vany naplněné vychlazeným pufrům a elektroforéza probíhá při konstantním napětí. Podmínky elektroforézy se přizpůsobují typu použitých buněk nebo tkáně.

Superhelixová DNA je relativně pevně agregována a v elektrickém poli se příliš nepohybuje. Jednořetězcový zlom však stačí na relaxaci superhelixového vinutí⁵. S relaxovanými smyčkami se pohybují i malé fragmenty DNA vzniklé poškozením DNA. Negativní náboj molekuly DNA pak při elektroforéze způsobuje migraci relaxované a fragmentované DNA k anodě. Tento krok je na rozdíl od postupů v molekulární biologii a genetice poměrně krátký, obvykle 15–20 minut. Skla jsou poté z elektroforetického tanku vyjmuta, opláchnuta v deionizované vodě a zafixována (např. ethanol, trichloroctovou kyselinou). Charakter migrace poškozené DNA je po jejím obarvení patrný jako ohon za hlavou komety. Čím větší je počet zlomů, tím větší je množství DNA v ohonu. Množ-

ství DNA v ohonu odráží úroveň jejího poškození, jež je primárně určeno koncentrací zkoumané látky, délkou expozice poškozujícím agens či dávkou záření. Bez elektroforézy je poškození DNA prezentováno pouze jako tzv. halo (halo analýza)⁶. Při tomto postupu je měřen pouze průměr výsledného hala kolem nukleoidu a tato metoda je méně citlivá než SCGE. Toho lze využít v případech, kdy fragmenty vznikající při poškození (degradaci) DNA jsou příliš malé a použitím elektroforézy by je nebylo možné identifikovat (např. sledování apoptózy, viz níže).

Mikroskopická sklička používaná při kometové analýze jsou většinou standardní, například pouze se zabroušeným jedním koncem. Použití těchto skel má výhodu po finanční stránce, ale nevýhodu představuje samovolná separace gelu od skla. Na časté problémy týkající se samovolného oddělování agarózy od podložního skla neexistuje jednoduché řešení. Dle naší zkušenosti je na vině vlhkost prostředí, to potvrzují i jiní autoři⁷, občas nestejnoměrné pokrytí agarózou a především neopatrné zacházení se skly.

Jak již bylo uvedeno, alkalická SCGE se primárně používá k detekci jednořetězcových zlomů. V alkalickém prostředí dochází k narušení ne vazebných interakcí mezi dusíkatými bázemi DNA a tedy k oddělení obou vláken dvojité šroubovice. Zlomy na jednom řetězci se projeví uvolněním fragmentů jednovláknové DNA, detegovatelných kometovou analýzou. Naopak, při neutrálním pH nedochází k porušení souvislosti řetězce dvojité šroubovice a jednořetězcové zlomy se neprojeví. Avšak dle Collinse není k detekci jednořetězcových zlomů vysoké pH nezbytně nutné⁸.

Pro detekci pouze DSB, bez interferencí ze strany SSB je nutné upravit neutrální protokol tak, aby byla nukleární matrix co nejvíce narušena. Toho lze dosáhnout inkubací s proteasou při vyšších teplotách ($50 \text{ }^\circ\text{C}$)⁹.

Při přípravě rostlinných buněk pro kometovou analýzu lze použít dvou odlišných postupů. Za prvé enzymovým rozložením stěny, přičemž je získán protoplast (rostlinná buňka bez buněčné stěny), nebo za druhé nakrájením rostlinného materiálu a získáním suspenze jednotlivých jader. DNA je při prvním postupu více poškozená, avšak izolaci protoplastu lze využít při testování nepřímého efektu genotoxických látek¹⁰. DNA v jádře totiž není v přímém kontaktu s agens a kolem jádra se stále nachází cytoplazma s metabolickým aparátem, který je i nadále v určité míře schopen metabolizovat látky.

Kometová analýza není určena pouze pro detekci a měření řetězcových zlomů. Použitím enzymů je možné rozpoznat konkrétnější typy poškození DNA. To činí SCGE metodu mnohem specifičtější. Štěpením endonukleasou III lze odhalit oxidované pyrimidiny¹¹, formamidopyrimidin-DNA-glykosylasa deteguje oxidované puriny, především 8-oxoguanin¹², T4 endonukleasa je zaměřena na cyklobutanové pyrimidinové dimery¹³ a AlkA glykosylasa na alkylation poškozené báze¹⁴.

Kometová analýza sama o sobě ukazuje pouze na celkové poškození DNA. V kombinaci s metodou FISH je však možné v kometě nalézt přímo chromosom, části chromosomu (centromera, telomery, raménka) nebo samotné geny.

V mnoha postupech se používají i chemikálie, které mají vliv na výsledek v negativním slova smyslu. Například, detergent Triton X-100, používaný pro lyzační roztok podle některých protokolů, významně redukuje účinnost proteinasy K (cit.¹⁵).

Jak alkalická, tak neutrální metoda může detegovat podobně nízké úrovně poškození molekuly DNA¹⁶. Alkalicko-neutrální kombinaci metody lze využít pro prodloužení užitečného rozsahu kometové analýzy¹⁷.

Z hlediska realizace má kometová analýza řadu výhod. Je to především snadnost provedení bez nutnosti speciálního vybavení, rychlost, relativně malé náklady, citlivost, potřeba malého množství vzorku a v případě použití specifických enzymů též určitou selektivitu.

Nevýhodou je nesnadná interpretace výsledků, jelikož mezi poškozením DNA (indikovaným ohonem komety) a biologickým dopadem tohoto poškození neexistuje přímý vztah¹⁸.

3. Vizualizace a hodnocení komet

Vizualizaci komet je možné provést fluorescenčními barvivy. Jsou to např. ethidium bromid, propidium jodid, akridinová oranž, DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) nebo YOYO-1[®]. SCGE je někdy prezentována jen jako fluorescenční mikroskopická technika. Detekce komet je však možná i po obarvení stříbrem, resp. metodou stříbrnění spočívající v redukci kationtu Ag⁺ dusičnanu stříbrného. Barvení dusičnanem stříbrným je levnější a není potřeba speciální fluorescenční mikroskop. Barvení je trvalé a hodnocení je možné kdykoliv opakovat. Mezi barvením stříbrem a často používaným propidium jodidem není podstatný rozdíl v citlivosti¹⁹. Nevýhodou je nespecifické barvení a občasné přebarvení pozadí. Fluorescenční barvení je naproti tomu selektivnější (snadné odlišení pozadí a komety), ale může při něm docházet k tzv. „fadingu“, tedy mizení (blednutí) obarvení a to i při použití stabilizujících prostředků. To může spolu se změnou intenzity světla excitační lampy ovlivnit výsledné hodnoty²⁰. Při barvení stříbrem se navíc vyhneme kontaktu s mutagenními chemikáliemi, používanými běžně pro fluorescenční barvení (ethidium bromid, propidium jodid).

Samotné vyhodnocování komet lze provádět manuálně (tzv. „visual scoring“), nebo speciálním počítačovým softwarem. Scoring je rozdělení komet do několika kategorií podle míry poškození, obvykle 0–4 (cit.⁸). Manuální kategorizace komet je však obtížně reprodukovatelná a snadno ovlivnitelná mnoha faktory. Softwarová analýza do jisté míry eliminuje obtíže při manuálním hodnocení. Dle zkušeností naší laboratoře jsou pak rozdíly mezi měřeními stejných vzorků různými pracovníky i mezi výstupy jednotlivých programů v celkovém hodnocení zanedbatelné. Navíc program ukládá všechny naměřené hodnoty a lze je snadno transportovat do mnoha kancelářských aplikací. Komerční programy také automaticky rozpoznávají hlavu a ohon komety. Nevýhodou samozřejmě je, že tyto komerční programy jsou velmi drahé. Na internetu se však

vyskytují zdarma (freeware) na stáhnutí aplikace speciálně určené k hodnocení komet. Tyto freeware programy jsou však většinou schopny pouze samotného hodnocení komet, je tedy potřeba další program pro ukládání snímků z mikroskopu. Dále tyto programy postrádají určité funkce zautomatizování některých úkonů usnadňujících práci (rozlišení hlavy a ohonu, sledování počtu vyhodnocených komet atd.), rovněž nenabízejí funkci selektivního odstranění artefaktů na pozadí vyhodnocovaných objektů, se kterými se setkáváme zvláště při barvení stříbrem.

Manuální hodnocení je oproti poměrně zdlouhavému vyhodnocování speciálním softwarem (např. při hodnocení procentuálního zastoupení DNA v ohonu) rychlejší a dle některých autorů stejně citlivé a vzájemně zaměnitelné^{21,22}. Technika vyhodnocování záleží zřejmě na preferencích a v případě speciálního programu na jeho dostupnosti. Nelze však pominout fakt, že manuální hodnocení je poněkud subjektivní záležitostí.

V hodnocení komet se používá mnoho parametrů. Mezi nejpoužívanější patří však dva: délka ohonu (tail length) a procentuální zastoupení DNA v ohonu (tail % DNA), případně v hlavě (head % DNA). Doporučeným parametrem k hodnocení je procentuální zastoupení DNA v ohonu, jež lze pokládat za dostatečně robustní^{8,23}. Tento parametr je ze všech nejméně ovlivnitelný mnoha vnějšími faktory a má nejširší možný rozsah (teoreticky 0 až 100 % DNA v ohonu). Procentuální zastoupení DNA v ohonu je také zřejmě nejlepším parametrem při interlaboratorním srovnávání výsledků²⁴. Délka ohonu nebo méně často procentuální zastoupení DNA však může v některých případech dosáhnout pozadí a je potom nutné citlivost metody upravit (např. změna napětí nebo časových parametrů elektroforézy).

Hodnocení může být ovlivněno i tím, v jakém bodě buněčného cyklu se buňka nachází a jaký typ metody je pro kometovou analýzu použit. Buňky v S-fázi obsahují replikační struktury, jejichž odpověď na agens je jiná než u nereplikující se DNA. Při alkalické SCGE se tyto struktury chovají jako SSB a zvyšují migraci. Naopak při neutrální SCGE replikační struktury migraci DNA brání²³.

4. Aplikace

4.1. Ekologický monitoring

Ekologický monitoring metodou SCGE lze provádět na biosenzorech ze zamořeného prostředí. Ve vodném prostředí je oblíbeným organismem pro testy kontaminací například slávka jedlá (*Mytilus edulis*)²⁵, na souši žížala obecná (*Lumbricus terrestris*)²⁶. U těchto organismů z kontaminovaných oblastí bylo nalezeno významné zvýšení poškození DNA. Avšak ani v případě zjištění nepatrného rozdílu mezi zkoumanou a kontrolní skupinou nelze vyloučit toxický vliv chemických látek na danou populaci. Stres způsobený chemikáliemi může totiž zvýšit vnímavost organismů ke změnám různých faktorů prostředí²⁷.

Při ekologickém monitoringu kometovou analýzou

nelze však zapomínat na mezidruhové rozdíly. Určitá dávka agens kontaminujícího prostředí se u jednoho druhu projeví jako signifikantní poškození DNA, u druhého však nikoliv²⁸.

4.2. Genotoxicita, oxidativní stres a protektivní účinky antioxidantů

Metodou SCGE jsou testovány na genotoxicitu mnohá na trh uváděná farmaka a další chemické sloučeniny²⁹. Mezi testovaná farmaka mimo jiné patří i očkovací látky³⁰. Výhoda kometové analýzy zde spočívá především ve snadné aplikaci na téměř jakoukoliv tkáň. Například Sasaki a spol.³¹ v jedné studii sledoval vliv chemických látek na několik orgánů současně.

Je známo, že významné poškození DNA může být zapříčiněno mimo jiné oxidativním stresem. Zvýšený oxidativní stres se projevuje např. i při fyzické námaze. Po zátěži je migrace DNA větší, avšak po určité době dochází k adaptivní odpovědi a buňky jsou vůči oxidativnímu stresu chráněny lépe³². Metoda analýzy komet je vhodná i pro testování účinků antioxidantů, jak přírodních, tak i syntetických. Mezi významné antioxidanty patří vitamin C, v hojné míře zastoupený v ovoci a zelenině. Suplementace vitamínu C v podobě ovoce kiwi vedla u zkoumaného vzorku k menšímu oxidativnímu poškození a buňky byly mnohem odolnější vůči účinku peroxidu vodíku *in vitro*³³. Antioxidanty mají za určitých podmínek i prooxidační vlastnosti, které lze pomocí kometové analýzy zkoumat³⁴. Například kyselina kávová, obecně považovaná za antioxidant, je v přítomnosti iontů mědi poměrně silným prooxidantem. Tyto ionty jsou přítomny v chromatinu v blízkosti bází. Reakcí polyfenolů a iontů mědi dochází k redukci těchto iontů a při následné reoxidaci jsou produkovány reaktivní kyslíkové radikály a dochází k poškození DNA. Navíc koncentrace iontů mědi při různých nádorových onemocněních vzrůstá, z toho lze vyvodit, že za protektivními vlastnostmi kyseliny kávové nestojí antioxidantní aktivita, ale spíše prooxidativní³⁵.

Krátkodobé studie na sledování vlivu antioxidantů však poskytly nejednoznačné údaje. Vysvětlení lze nalézt v některých studiích, kde bylo zjištěno, že pokles oxidativního poškození molekuly DNA trval pouze několik hodin po podání přípravku. V mnoha studiích, které potvrdily pozitivní vliv antioxidantů, nebylo ke kontrole použito placebo, čímž vznikla možnost ovlivnění závěrů falešně pozitivními výsledky způsobenými opakujícími se vlivy³⁶. V poslední době se ukazuje, že účinky antioxidantů jsou při podávání v přirozené formě s potravou výraznější než v případě suplementace pouze jednotlivými antioxidanty³⁷. Tyto „nahé“ antioxidanty mohou být v průběhu vstřebávání inaktivovány (degradovány). Jiný může být i účinek na samotné buňky (laboratorní kultury) a celý organismus. Za nejdiskutovanější je možné považovat používání vitamínu E. Vedle vitaminových preparátů je vitamin E často přidáván do mnoha kosmetických přípravků, např. pleťových či opalovacích krémů. Bylo však zjištěno, že exogenně poda-

ný vitamin E může u fibroblastů po ozáření UVA podporovat poškození DNA³⁸.

Protektivní účinky lze pomocí SCGE sledovat i u kosmetických přípravků chránících před slunečním zářením. UVA záření ve slunečním světle způsobuje genotoxické změny. Ochrana proti záření UVA je v mnoha přípravcích nedostatečná. Tyto přípravky by měly být fotostabilní a měly by být určeny pro širší spektrum UV záření (UVB+UVA)³⁹.

4.3. Biomonitoring

Velkého rozšíření se dočkala kometová analýza genotoxických chemikálií či záření v oblasti monitoringu pracovního i životního prostředí. V těchto případech bývá nalezen významný rozdíl mezi zkoumanou a kontrolní skupinou, ale je častá interindividuální i intraindividuální variabilita⁸.

V mnohých pracovních profesích je lidský organismus vystaven nepříznivým účinkům toxických látek. Standardními testy je v některých případech nemožné nalézt významné poškození buněk. Například u pracovníků vystavených v pracovním prostředí působení styrenu nebyl standardní analýzou spermatu nalezen rozdíl mezi exponovanou a kontrolní skupinou. Avšak kometovou analýzou byl statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami nalezen⁴⁰. To názorně ukazuje vysokou citlivost kometové analýzy.

Poškození DNA vlivem agens přítomného na pracovišti lze demonstrovat i na příkladu pracovníků z truhlářské dílny, kteří v kometovém testu vykazovali větší celkové poškození DNA než kontrolní skupina⁴¹. Podle autorů lze poškození DNA spojit s expozicí pracovníků prachu vznikajícímu při opracování dřeva. Svou roli však mohla sehrát i lepidla a laky, používané při výrobě nábytku. Také vystavení lidského organismu některým chemikáliím používaných v zemědělství (pesticidy, fungicidy) výrazně poškozuje DNA⁴².

Významným agens poškozujícím zdraví je azbest. Výsledkem kometové analýzy u osob vystavených působení azbestu bylo zjištění, že poškození DNA bylo závislé na době trvání expozice a poškození bylo především ve formě oxidovaných pyrimidinů a alkylovaných bází⁴³. Poškození DNA mohlo být způsobené buď akumulací neopravených poškození nebo perzistencí azbestových vláken v těle vyšetřovaných subjektů.

Metodou SCGE je možné sledovat vliv radioaktivního záření na organismus i po několika letech. Běloruské děti vlivem havárie jaderné elektrárny v Černobylu vykazují zvýšené poškození DNA měřené v leukocytech než děti z italského města Pisa⁴⁴. Svoji nezanedbatelnou roli však zde může hrát i výživa (méně kvalitní a kontaminované potraviny). Zdrojem radioaktivního záření a tudíž poškození DNA jsou i území využívaná jako jaderné střelnice⁴⁵. I v tomto případě se kometová analýza ukázala jako vysoce citlivá.

SCGE byla použita i při výzkumu možnosti detekce poškození DNA kouřením⁴⁶. Mezi kuřáky a nekuřáky ne-

byl metodou kometové analýzy zjištěn významný rozdíl. Snad proto, že jako vzorek sloužily buňky krve. Pro takovou analýzu jsou vhodnější buňky, které jsou v přímém kontaktu s agens, v tomto případě epitelální buňky dýchacího traktu. V kontrastu s tímto pozorováním však některé studie na krevních buňkách potvrdily nepříznivý efekt kouření na strukturu DNA⁴⁷.

4.4. Klinický skrining a diagnostika

Výzkum spermií pacientů, kteří podstoupili IVF (*in vitro* fertilization) nebo ICSI (intracytoplasmic sperm injection) ukázal, že větší úspěšnost oplození a menší počet spontánních abortů koreloval s menším poškozením DNA, které bylo stanoveno kometovou analýzou⁴⁸. Při vystavení spermií účinkům rentgenového záření a peroxidu vodíku bylo kometovou analýzou zjištěno výrazné poškození. U fertálních mužů jsou však spermie vůči mutagennímu poškození odolnější než u neplodných mužů⁴⁹. Se zvyšujícím se důrazem na zvolení co nejlepších spermií (především u ICSI) může být schopnost zjištění kvality vzorků spermatu více než relevantní. Pomocí SCGE a difuzní analýzy (viz kap. 4.5. Detekce apoptózy) bylo též zjištěno, že integrita DNA spermií klesá se vzrůstajícím věkem, abnormalitou spermií, pohyblivostí spermií a naopak je vyšší se vzrůstající koncentrací spermií a vyšším zastoupením apoptotických buněk^{48,50}.

I když výsledky kometové analýzy poškození DNA spermií korelují s výsledky dalších metod používaných k analýze spermatu⁵¹, je SCGE v současné době na tomto poli pouze okrajovou metodou. Měření kometovou analýzou je vlivem nejednotné metodiky prozatím přijímáno pouze jako nestandardní metoda⁵².

SCGE může pomoci při včasných diagnózách závažných onemocnění jako při *xeroderma pigmentosum* (XP)⁵³. XP je onemocnění, jehož podstatou je ve většině případů porucha excizní reparace poškození DNA vyvolaného UV zářením. S poruchou excize nedochází u buněk subjektů po UV ozáření k takovému nárůstu délky ohonu jako u referenčních (zdravých) vzorků. Obdobně lze kometovou analýzu použít pro diagnostiku trichothiodystrofie, která se také, podobně jako XP, vyznačuje fotosenzitivitou a poruchou excizní reparace (cca v 50 % případů)⁵⁴. Použití kometové analýzy na lymfocyty žen, u nichž docházelo k opakujícím se potratům, ukázalo větší migraci DNA než u kontrolních skupin (pacientek bez opakujících se abortů a jejich manželů, ale i manželů postižených pacientek)⁵⁵. Integrita DNA u těchto pacientek koreluje se schopností donosit plod. Faktory ovlivňujícími úspěšnost donošení jsou však i stres, výživa apod.

SCGE lze také využít při výzkumu rakoviny, např. studiem reparační kapacity DNA a její interindividuální variability^{56,57}, nebo jako diagnostický nástroj a prognostický ukazatel karcinomu⁴⁹.

4.5. Detekce apoptózy

Apoptózu neboli programovanou smrt buňky je pomocí SCGE nesnadné identifikovat. Za apoptotické buňky jsou někdy považovány komety s malou hlavou a většinou DNA v ohonu (vějířovitě rozšířeném). Tyto komety však mohou vzniknout i po působení vysoké dávky gamma záření⁵⁸ nebo inkubací s velkou, avšak subletální dávkou peroxidu vodíku⁸. Proč nelze takovéto komety označit za apoptotické? V prvním případě byly buňky zpracovány bezprostředně po ozáření, takže apoptóza nebyla možná. Ve druhém případě lze po určité době vidět vymizení „apoptotických“ komet díky opravě poškození, avšak apoptóza je děj nevratný. Při apoptóze je navíc genetická informace degradována na úroveň nukleosomu (nukleosom je brán jako základní jednotka chromatinu, skládá se z několika druhů histonových proteinů a části DNA o průměrné délce cca 200 bp). Takto malé fragmenty by při jednotlivých krocích SCGE byly zcela jistě ztraceny^{8,58}. Pro detekci apoptózy lze díky fragmentaci použít detekci žebříčku DNA gelovou elektroforézou nebo metody difuzní analýzy^{59,60}. Tato metoda je velice podobná předchůdkyním SCGE. K pohybu vysoce degradovaných fragmentů DNA neslouží elektrický proud elektroforézy, ale prostá difuze. K difuzi při neutrálních či slabě alkalických podmínkách dojde pouze u buněk s velmi degradovanou DNA.

Difuzní analýza může být užitečná při monitoringu účinnosti léčby rakoviny, zkoumání vlivu výživy, stárnutí nebo environmentálních faktorů na organismy⁶⁰.

5. Závěr

Kometová analýza je vysoce citlivá metoda pro měření (detekci) poškození DNA. Je také atraktivní i pro svou jednoduchost a rychlost provedení. Velké rozšíření v současné době má však i své stinné stránky. I když se jedná o metodu velice univerzální, nelze ji aplikovat obecně bez toho, aniž by bylo podrobněji známo kupříkladu pozadí a faktory degradace DNA. Příkladem je studie zaměřená na použití kometové analýzy při odhadu času úmrtí ve forenzní praxi⁶¹. Je známo, že degradaci DNA ovlivňuje nemálo vnitřních i vnějších faktorů. Například snížení teploty o 20 °C vede k 10 až 25 násobnému snížení rychlosti chemických reakcí, např. degradaci bází⁶². Labilní struktura DNA s degradovanými bázemi je pak snadno fragmentována. V různých tkáních je vlivem množství autolytických enzymů, odlišnou odolností buněk vůči degradaci nebo jiným vlastnostem prostředí, DNA degradována nestejně⁶³. Dalším vnitřním faktorem může být heterogenní odpověď buněk různých jedinců. Z uvedených důvodů je velmi pravděpodobné, že standardizace testu kometové analýzy pro forenzní potřeby, tak aby spolehlivě určovala čas od úmrtí na základě analýzy vzorku z nekontrolovaného prostředí, je obtížná, ne-li nemožná.

Závěrem je nutné si uvědomit, že výzkumy jsou často prováděny na buněčných liniích izolovaných od vlivu a možností mnohobuněčného organismu. Odpověď u organismu pak může být odlišně modulována. Rovněž nelze, podobně jako v jiných oblastech výzkumu, srovnávat výsledky pokusů provedených na lidských nebo zvířecích buňkách. Některé chemické látky mají větší genotoxický vliv na lidské buňky než na buňky zvířecí⁶⁴. V neposlední řadě je v odpovědích (poškození) různých druhů buněk velká variabilita. Například keratinocyty a fibroblasty, v daném kontextu tedy buňky jednoho orgánu (kůže), jsou dávkami UV záření poškozovány odlišně⁶⁵.

Oblasti využití této metody se rok od roku rychle rozšiřují. Na tom, zda se kometová analýza stane skutečně běžnou metodou, bude mít vliv především standardizace metodiky SCGE a hlubší pochopení principů metody samotné^{8,58}. Pokusy o standardizaci metodiky SCGE byly provedeny skupinou výzkumníků v rámci mezilaboratorní spolupráce. Výsledky této studie dokládají dobrou reprodukovatelnost dat získaných s použitím kometové analýzy⁶⁶.

Kometová analýza, i přes nesporné kvality, by však v žádném případě neměla být metodou jedinou, např. při klinických testech toxicity látek, ale součástí baterie testů (lze však předpokládat, že tomu tak skutečně je).

Tato práce byla podpořena prostředky z grantu FRVŠ 1418/2006.

Použité zkratky

AP místa	apurinové/apyrimidinové místo, místo bez dusíkaté báze
DSB	double strand break(s), dvouřetězcový(é) zlom(y)
LMPA	low melting point agarose, agaróza tající při nízké teplotě
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
SCGE	single cell gel electrophoresis, gelová elektroforéza jednotlivých buněk
SSB	single strand break(s), jednořetězcový(é) zlom(y)
XP	xeroderma pigmentosum

LITERATURA

- Ostling O., Johanson K. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 291 (1984).
- Rydberg B., Johanson K. J., v knize: *DNA Repair Mechanisms* (Hanawalt P. C., Friedberg E. C., Fox C. F., ed.), 465–468. Academic Press, New York 1978.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L.: *Exp. Cell Res.* 175, 184 (1988).
- Olive P. L., Banáth J. P.: *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 349 (1993).
- Collins A. R., Dušinská M., v knize: *Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols* (Armstrong D., ed.), kap. 17. Humana Press, Totowa 2002.
- Roti Roti J. L., Wright W. D.: *Cytometry* 8, 461 (1987).
- Olive P. L., Banáth J. P.: *Nat. Protoc.* 1, 23 (2006).
- Collins A. R.: *Mol. Biotechnol.* 26, 249 (2004).
- Olive P. L., Wlodek D., Banáth J. P.: *Cancer Res.* 51, 4671 (1991).
- Žnidar I., Camloh M., Vilhar B., Ravnikar M., Logar, R. M.: *VI International Comet assay workshop, Warszawa 22–24 September 2005*, Book of abstracts, str. 19.
- Collins A. R., Duthie S. J., Dobson V. L.: *Carcinogenesis* 14, 1733 (1993).
- Dušinská M., Collins A. J.: *Altern. Lab. Anim.* 24, 405 (1996).
- Collins A. R., Mitchell D. L., Zunino A., de Wit J., Busch D.: *Environ. Mol. Mutagen.* 29, 152 (1997).
- Collins A. R., Dušinská M., Horská A.: *Acta Biochim. Pol.* 48, 611 (2001).
- Singh N. P.: *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 455, 111 (2000).
- Collins A. R., Dobson V. L., Dušinská M., Kennedy G., Štetina R.: *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 375, 183 (1997).
- Angelis K. J., Dušinská M., Collins A. R.: *Electrophoresis* 20, 1923 (1999).
- Olive P. L., Durand R. E.: *Cytometry, A* 66A, 1 (2005).
- Nadin S. B., Vargas-Roig L. M., Ciocca, D. R.: *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1183 (2001).
- Olive P. L.: *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 395 (1999).
- Kobayashi H., Sugiyama C., Morikawa Y., Hayashi M., Sofuni T.: *MMS Commun.* 3, 103 (1995).
- Møller P.: *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* 612, 84 (2006).
- Olive P. L., v knize: *In Situ Detection of DNA Damage. Methods and Protocols* (Didenko, V. V., ed.), kap. 14. Humana Press, Totowa 2002.
- Kumaravel T. S., Jha A. N.: *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 605, 7 (2006).
- Dixon D. R., Pruski A. M., Dixon L. R. J., Jha A. N.: *Mutagenesis* 17, 495 (2002).
- Verschaeve L., Gilles J.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 112 (1995).
- Rocher B., Le Goff J., Peluhet L., Briand M., Manduzio H., Gallois J., Devier M. H., Geffard O., Gricourt L., Augagneur S., Budzinski H., Pottier D., André V., Lebailly P., Cachot J.: *Aquat. Toxicol.* 79, 65 (2006).
- Fourie F., Reinecke S. A., Reinecke A. J.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 361 (2007).
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R. R.: *Mutagenesis* 18, 45 (2003).
- Genghini R., Tiranti I., Bressán E., Zamorano-Ponce E., Fernández J., Dulout F.: *Mutagenesis* 21, 213 (2006).
- Sasaki Y. F., Sekihashi K., Izumiyama F., Nishidate E., Saga A., Ishida K., Tsuda S.: *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 629 (2000).

32. Hartmann A.: Eur. J. Gen. Mol. Toxicol., staženo z <http://www.swan.ac.uk/cget/ejgt1.htm>, staženo 11.12.2007.
33. Collins A. R.: *Agrofood* 15, 23 (2004).
34. Yen G.-C., Duh P.-D., Tsai H.-L.: *Food Chem.* 79, 307 (2002).
35. Bhat S. H., Azmi A. S., Hadi S. M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218, 249 (2007).
36. Møller P., Loft S.: *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 303 (2002).
37. Møller P., Loft S.: *Free Radical Biol. Med.* 41, 388 (2006).
38. Nocentini S., Guggiari M., Rouillard D., Surgis S.: *Photochem. Photobiol.* 73, 370 (2001).
39. Marrot L., Belaidi J.-P., Meunier J.-R.: *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 571, 175 (2005).
40. Migliore L., Naccarati A., Zanello A., Scarpato R., Bramanti L., Mariani M.: *Hum. Reprod.* 17, 2912 (2002).
41. Palus J., Dziubałtowska E., Rydzyński K.: *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 444, 61 (1999).
42. Bian Q., Xu L. C., Wang S. L., Xia Y. K., Tan L. F., Chen J. F., Song L., Chang H. C., Wang X. R.: *Occup. Environ. Med.* 61, 999 (2004).
43. Dušinská M., Collins A., Kažimírová A., Barančoková M., Harrington V., Volkovová K., Staruchová M., Horská A., Wsóllová L., Kočan A., Petřík J., Machata M., Ratcliffe B., Kyrtopoulos S.: *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 553, 91 (2004).
44. Frenzilli G., Bosco E., Antonelli A., Panasiuk G., Barale R.: *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 491, 139 (2001).
45. Chenal C., Legue F., Nourgalieva K.: *Sci. Total Environ.* 369, 91 (2006).
46. Hoffmann H., Speit G.: *VI International Comet assay workshop, Warszawa 22–24 September 2005*. Book of abstracts, str. 39.
47. Frenzilli G., Betti C., Davini T., Desideri M., Fornai E., Giannessi L., Maggiorelli F., Paoletti P., Barale R.: *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 375, 117 (1997).
48. Morris I. D., Ilott S., Dixon L., Brison D. R.: *Hum. Reprod.* 17, 990 (2002).
49. McKelvey-Martin V. J., Melia N., Walsh I. K., Johnston S. R., Hughes C. M., Lewis S. E. M., Thompson W.: *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 375, 93 (1997).
50. Singh N. P., Muller C. H., Berger R. E.: *Fertil. Steril.* 80, 1420 (2003).
51. O'Brien J., Zini A.: *Urology* 65, 16 (2005).
52. Evenson D. P., Wixon R.: *Theriogenology* 65, 979 (2006).
53. Green M. H. L., Lowe J. E., Harcourt S. A., Akinluyi P., Rowe T., Cole J., Anstey A. V., Arlett C. F.: *Mutat. Res., DNA Repair* 273, 137 (1992).
54. Alapetite C., Benoit A., Moustacchi E., Sarasin A.: *J. Invest. Dermatol.* 108, 154 (1997).
55. Baltaci V., Aygün N., Akyol D., Karakaya A. E., Şardaş S.: *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 417, 47 (1998).
56. Poplawski T., Arabski M., Kozłowska D., Blasinska-Morawiec M., Morawiec Z., Morawiec-Bajda A., Klupińska G., Jeziorski A., Chojnacki J., Blasiak J.: *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 601, 83 (2006).
57. Langie S. A. S., Knaapen A. M., Brauers K. J. J., van Berlo D., van Schooten F.-J., Godschalk R. W. L.: *Mutagenesis* 21, 153 (2006).
58. Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y. F.: *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206 (2000).
59. Vasquez M., Tice R. R.: *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (S28), 53 (1997).
60. Singh N. P.: *Exp. Cell Res.* 256, 328 (2000).
61. Johnson L. A., Ferris J. A. J.: *Forensic Sci. Int.* 126, 43 (2002).
62. Höss M., Jaruga P., Zastawny T. H., Dizdaroglu M., Pääbo S.: *Nucleic Acids Res.* 24, 1304 (1996).
63. Bär W., Kratzer A., Mächler M., Schmid W.: *Forensic Sci. Int.* 39, 59 (1988).
64. Pool-Zobel B. L., Leucht U.: *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 375, 105 (1997).
65. Chazal M., Roux E., Alapetite C., Roulin C., Moustacchi E., Douki T., Baudouin C., Charveron M., Basset-Séguin N.: *Photochem. Photobiol.* 79, 286 (2004).
66. ESCODD (European standards committee on oxidative DNA damage), Medik C. M., Collins A.: *FASEB J.* 19, 82 (2005).

M. Dvořák and M. Matejovičová (*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno*): **Principles and Applications of the Comet Assay in Detection of DNA Damage**

This review provides a brief information on principles and possible applications of the comet assay method, known as single cell gel electrophoresis, allowing to analyse DNA damage.

This method developed in the mid-seventies was widely used in the early eighties of the last century. Several modifications of the comet assay approach made this method an attractive tool in various fields such as molecular biology research, quality control, clinical diagnosis, and monitoring of environmental pollution.

SOUČASNÝ STAV A PERSPEKTIVY VYUŽITÍ ROSTLINNÝCH OLEJŮ

JAN ŠMIDRKAL^a, VLADIMÍR FILIP^a, ZDENĚK BĚLOHLAV^b, PETR ZÁMOSTNÝ^b a VLADIMÍR HÖNIG^c

^a Ústav technologie mléka a tuků, ^b Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c Katedra chemie, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6
jan.smidrkal@vscht.cz.

Došlo 6.5.08, přijato 19.9.08.

Klíčová slova: triacylglyceroly, řepkový olej, methylestery, ethylen, alkeny

Obsah

1. Úvod
2. Využití v potravinářském průmyslu
3. Využití v chemickém průmyslu
4. Využití v průmyslu paliv
5. Perspektivy využití rostlinných olejů
6. Závěr

1. Úvod

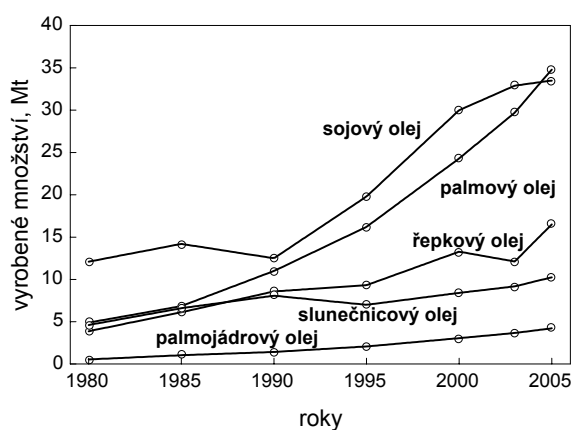
Rostlinné oleje a produkty jejich zpracování jsou součástí našeho každodenního života. Jsou obsaženy v průmyslově vyráběných potravinách (margariny a oleje na smažení), vyrábí se z nich mýdla, kosmetické prostředky, nátěrové hmoty, v poslední době i tolik diskutované pohonné hmoty (bionafta) a uvažuje se i o jejich použití jako suroviny pro výrobu uhlovodíků pro chemický průmysl.

Pro nepotravinářské, průmyslové účely přicházejí v úvahu pouze tři rostlinné oleje – palmový, sojový a řepkový^{1,2} (obr. 1). V České republice zcela dominuje produkce řepkového oleje (obr. 2). Ostatních olejů se produkuje výrazně méně, jsou dražší a zpracovávají se převážně pro účely výživy. Ročně se ve světě vyrábí 115 Mt rostlinných olejů, a pokud se připočte 22 Mt hovězího a ovčímho loje, sádla a mléčného tuku, dosahuje celková světová produkce olejů a tuků 137 Mt.

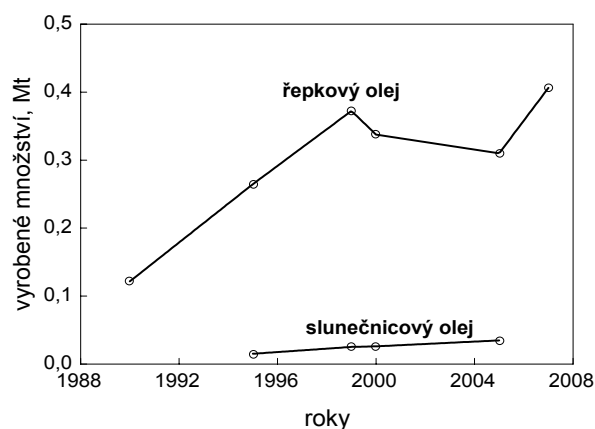
Většina produkovaných olejů se podle údajů z roku 2004 (cit.³) spotřebuje ve světě v potravinářství jako jedlé oleje, margariny a další potraviny (106,2 Mt), malá část na krmiva pro hospodářská zvířata (6,5 Mt) a zbytek (18,4 Mt) zpracuje chemický průmysl pro nepotravinářské účely (obr. 3).

Rostlinné oleje jsou podle chemického složení triacylglyceroly (obsahují mastné kyseliny vázané na glycerol, jak se nepřesně uvádí v „tukařské“ literatuře). Složení mastných kyselin⁴ v různých typech rostlinných olejů a pro porovnání i v živočišných tucích je uvedeno v tabulce I. Mastné kyseliny se uvádějí zkratkami, ve kterých prvé číslo znamená počet uhlíkových atomů a druhé počet dvojných vazeb – např. zkratka C18:1 značí kyselinu olejovou. Složení olejů kolísá, např. obsah kyseliny C18:1 v řepkovém oleji kolísá v rozmezí 45–61 %, proto jsou pro přehlednost v tabulce I uvedeny pouze střední hodnoty obsahu mastných kyselin.

Rostlinné oleje se získávají buď z dužnin plodů (palmový, olivový) nebo ze semen (řepkový, slunečnicový), případně z bobů (sojový olej). Oleje z dužnin se získávají lisováním, které je nutné provést přímo v místě pro-



Obr. 1. Celosvětový vývoj produkce olejů



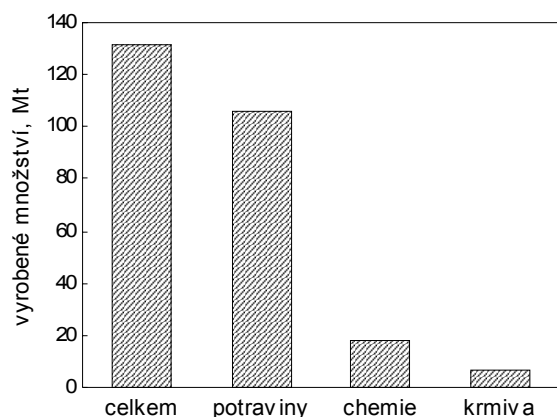
Obr. 2. Vývoj produkce rostlinných olejů v České republice

Tabulka I

Obsah mastných kyselin v některých rostlinných olejích a živočišných tucích⁴

Olej (tuk)	Obsah mastné kyseliny [%]														
	6:0	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	20:0	22:0	16:1	18:1	20:1	22:1	18:2	18:3
Palmový		<0,4	<0,2	<0,4	1	45	8	0,5		<0,6	38			10	<0,5
Sojový				0,2	<0,5	10	4	0,5	0,4	<1	21	0,5	<0,3	56	8
Řepkový					<0,2	4,5	1,5	0,5	<0,5	0,5	56	2	<2	21	10
Slunečnicový						6,5	5	0,5	<0,5	0,5	24	<0,5	<0,5	63	<0,3
Palmojádrový	<0,8	4	4	47	16	9	2,5				15			2,5	
Kokosový	<0,6	8	6	47	18	9	2,5	0,1			7	<0,2		2	<0,5
Olivový						11,5	2,5	<0,6		1,5	74	0,2		9,5	<1,5
Hovězí lůj					3	26	20			3,5	40			4,5	0,5
Skopový lůj			<0,6	5,6	27	32				1,5	32			1,6	0,2

Pozn.: Není uveden obsah minoritních kyselin a u majoritních kyselin jsou uváděny průměrné hodnoty

Obr. 3. Spotřeba rostlinných olejů v roce 2004 (cit.³)

dukce, u palmového oleje dokonce přímo v blízkosti plantáže. Důvodem je velmi nízká údržnost (trvanlivost) plodů s dužninou. Naproti tomu olejnatá semena a boby lze skladovat a přepravovat v globálním měřítku. Surovárn y jsou proto lokalizovány v přímé návaznosti především na námořní a říční dopravu. Celosvětově se pro výrobu olejů používají dvě technologie: lisování na kontinuálních šnekových lisech a extrakce uhlovodíky (obvykle frakcí C6). Celosvětově se ve velkých objemech pracuje v kombinaci technologií lisování s následnou rozpouštědlovou extrakcí, kdy je možné získat ze semen až 98 % obsaženého oleje. Lokální výrobci používají většinou technologii lisování a získají tak ze semen maximálně 85 % obsaženého oleje. Ze surových rostlinných olejů se přímo v surovárkách odstraňují veškeré přítomné heterolipidy, především fosfolipidy. Takto upravené surové oleje již představují směs triacylglycerolů a volných mastných kyselin. Obsah vol-

ných mastných kyselin kolísá: např. u řepky obvykle v rozmezí 0,5–1,0 hm. %, ale tropické oleje obsahují běžně 2–5 hm. %. Pro potravinářské účely se oleje musí dále rafinovat, aby rafinovaný olej získal světle žlutou barvu a z hlediska chuti a vůně byl zcela neutrální. Pro výrobu methylesterů mastných kyselin pro palivářské účely je rovněž nutno surové oleje alespoň částečně rafinovat.

2. Využití v potravinářském průmyslu

Rafinované rostlinné oleje se již pouze vitaminizují (obvykle vitamínem A a E). Oleje a tuky nejsou oxidačně stabilní, podléhají zvýšené autooxidaci vzdušným kyslíkem úměrně obsahu polyenových mastných kyselin. Proto jsou oleje s vyšším obsahem polyenových mastných kyselin (sojový nebo slunečnicový olej) určeny pro studenou kuchyni (salátové oleje). Oleje s nižším obsahem polyenových kyselin (palmový, bezerukový řepkový olej, tj. olej, který neobsahuje kyselinu erukovou) jsou vhodné i pro smažení. Na trhu jsou vedle olejů jednodruhových oleje směsné, které mají podle výživových doporučení vyváženější obsah esenciálních mastných kyselin. Rostlinné oleje dále slouží pro výrobu řady tukových potravin, jako jsou majonézy, tukové násady margarínů a pokrmových tuků. Fritovací oleje, které se vyrábějí obvykle na bázi palmového oleje, musí obsahovat pouze malé množství polyenových mastných kyselin, aby se snížila rychlost oxidace oleje při fritování.

Pro produkci margarínů a pokrmových tuků je vedle kapalných rostlinných olejů nutné vyrobit tuhé tuky – tzv. strukturální tuky, které finálnímu tukovému výrobku propůjčí požadovanou konzistenci. Dominující technologií ve výrobě strukturálních tuků až do konce 20. století byla parciální katalytická hydrogenace kapalných olejů (ztužování). Při hydrogenaci probíhá též isomerizace nenasycených mastných kyselin, původní přírodní *cis*-isomery isomerují

na termodynamicky stabilnější *trans*-isomery. Takto ztužené oleje obsahovaly až 50–60 % *trans*-isomerů nenasyčených mastných kyselin.

Protože dnes je již bezpečně prokázáno, že *trans*-isomery nenasyčených mastných kyselin negativně ovlivňují hladinu triglyceridů a cholesterolu v krevním séru (zvyšují obsah triacylglycerolů, zvyšují obsah celkového cholesterolu a LDL cholesterolu a naopak snižují obsah HDL cholesterolu) a podílejí se tudíž negativním způsobem na rozvoji nemocí srdce a cév, ustoupilo se po roce 2000 ve výrobě margarínů a pokrmových tuků od používání parciálně ztužených olejů a tuků. V USA se přistoupilo od roku 2006 k povinnému označování *trans*-isomerů mastných kyselin v potravinách obsahujících tuky. Z tohoto důvodu byly vyvinuty nové technologie výroby strukturních tuků, které se dnes vyrábějí výhradně cestou transesterifikace vhodných směsí triacylglycerolů, včetně tuků plně nasyčených. Velmi obecně platí, že *trans*-isomery nenasyčených mastných kyselin byly nahrazeny ve strukturách triacylglycerolů nasyčenými mastnými kyselinami. Smísením strukturního tuku s rostlinným olejem ve vhodném poměru se získávají tukové násady pro výrobu margarínů (emulgovaných tuků) a pokrmových tuků („shorteningů“). Margaríny se vyrábí emulgací tukové násady s vodnou fází. Získá se emulze, která se následně na válcích chladí, čímž se dosáhne postupné krystalizace triacylglycerolů strukturního tuku. Krystalky tuku následně asociují za vzniku prostorové krystalické sítě a tak se dosáhne požadované konzistence finálního výrobku.

3. Využití v chemickém průmyslu

Rostlinné oleje jsou potenciální náhradou ropy jako základní suroviny pro chemický průmysl, neboť rostlinné oleje jsou jediné obnovitelné suroviny obsahující dlouhé uhlovodíkové řetězce.

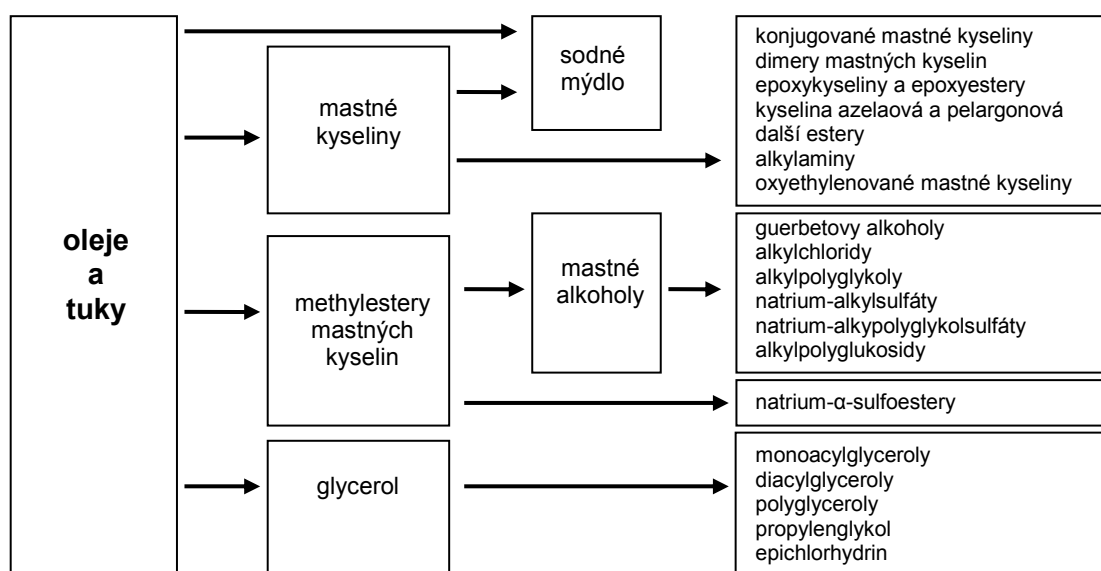
Výroba mastných kyselin a alkoholů

Triacylglyceroly jsou výchozí surovinou pro výrobu řady sloučenin (obr. 4). Hydrolyzou triacylglycerolů (štěpením tuků) se získávají mastné kyseliny. Bazicky katalyzovanou methanolýzou se vyrábějí methylestery, které se hydrogenují na mastné alkoholy. Alkalickou hydrolyzou (zmýdelňováním) hovězího loje se vyrábí sodné mýdlo.

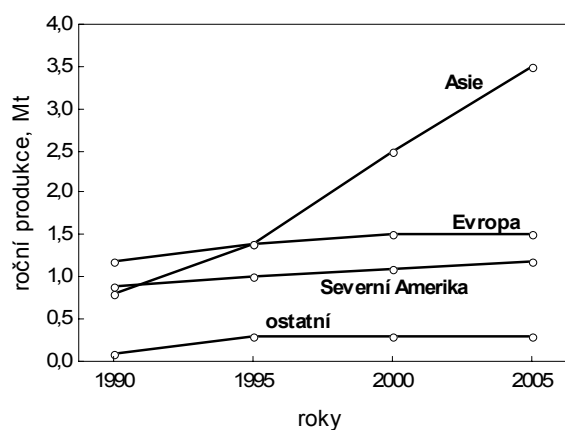
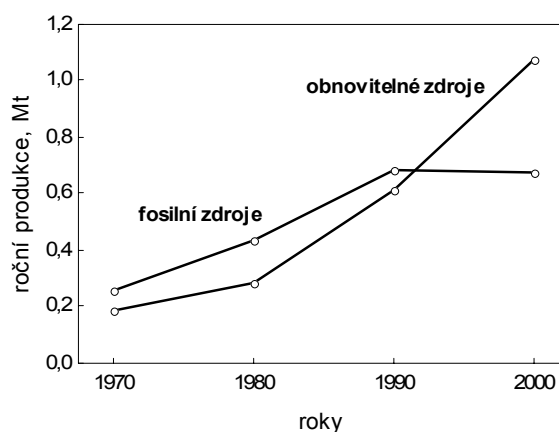
Výroba mastných kyselin⁵ v posledních letech roste zejména v Asii (obr. 5), kde je zdrojem pro jejich výrobu palmový olej. Výroba mastných alkoholů z ropy stagnuje, naopak výroba mastných alkoholů⁵ z triacylglycerolů rychle roste (obr. 6). Výroba mýdla celosvětově rovněž roste, ročně se vyrobí celkem 10 Mt mýdla ročně, ale spotřeba toaletního mýdla v Evropě klesá. Celková spotřeba triacylglycerolů pro výše uvedené výroby je přibližně 10 až 12 Mt rostlinných olejů a 10–12 Mt živočišných tuků.

Výroba olejových nátěrových hmot a tmelů

Olejové nátěrové hmoty a tmely (např. sklenářský olejový tmel) obsahují jako základ rostlinné vysychavé



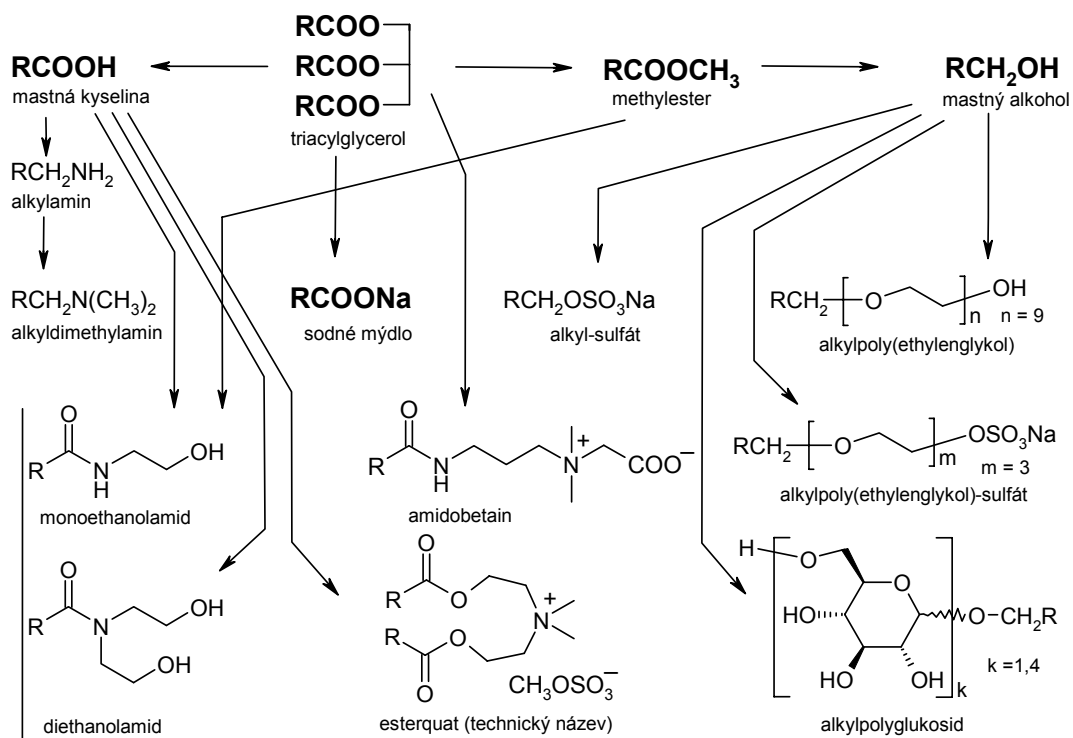
Obr. 4. Chemické využití rostlinných olejů a živočišných tuků

Obr. 5. Vývoj výroby mastných kyselin⁵Obr. 6. Vývoj výroby mastných alkoholů z fosilních a obnovitelných zdrojů⁵

oleje (fermeže). Fermeže jsou vysychavé oleje (hlavně lněný olej), které byly upraveny oxidací vzduchem a přidáním oxopolymeračních katalyzátorů (sikativů). Pro výrobu barev a laků se vyrábějí z mastných kyselin konjugované mastné kyseliny, dimery mastných kyselin, epoxykyseliny a epoxyestery.

Výroba tenzidů

Triacylglyceroly a z nich vyrobené mastné kyseliny a mastné alkoholy jsou surovinou pro výrobu tenzidů⁶ (obr. 7). Z mastných kyselin se vyrábějí alkylaminy (kyselina → amonná sůl → amid → nitril → alkylamin), z primárních alkylaminů Wallachovou-Leuckartovou reak-

Obr. 7. Využití triacylglycerolů pro výrobu tenzidů⁶

cí s formaldehydem terciární alkyldimethylaminy. Reakcí mastných kyselin s ethanolaminem vznikají ethanolamidy a reakcí s diethanolaminem diethanolamidy. Ethanolamidy a diethanolamidy se za mírnějších reakčních podmínek vyrábějí z methylesterů mastných kyselin. Z kokosového oleje se reakcí s 3-(dimethylamino)propylaminem a následnou reakcí amidu s natrium-chloracetátem vyrábí amidobetain. Sulfatací mastných alkoholů oxidem sirovým a následnou neutralizací alkyl-hydrogen-sulfátu hydroxidem sodným vzniká alkyl-sulfát. Oxyethylenací mastných alkoholů ethylenoxidem vzniká alkylpoly(ethylen glykol), jeho sulfatací a neutralizací se získá alkylpoly(ethylen glykol)-sulfát. Acetalizací glukosy mastným alkoholem vzniká alkylpolyglukosid. Na výrobu tenzidů se spotřebuje méně než 2 Mt triacylglycerolů ročně. Další údaje o tenzidech jsou uvedeny v nedávno vyšlém přehledném referátě o tenzidech⁶.

Jedním z pokusů o využití řepkového methylesteru byla jeho oxyethylenace na neionický tenzid^{7–9}, který měl být použit do práškových pracích prostředků. Jeho aplikační vlastnosti (detergence, pěnovost) byly téměř srovnatelné s vlastnostmi oxyethylenovaných mastných alkoholů, které se v práškových detergentech používají, ale jeho senzoricke vlastnosti (barva, zápach) byly však pro tento účel nevhovující.

Výroba léčivých přípravků a kosmetických prostředků

Při výrobě léčiv se používají rostlinné oleje a tuky jako pomocné látky (excipienty) při zpracování léčivých látek (substancí) do formy léčivého přípravku, nejčastěji do hydrofobních mastí. Kapalné oleje se používají jako rozpouštědlo léčivých látek ve formě kapek a roztoků. Pro výrobu čípků se používá tzv. neutrální tuk (*adepts solidus*) – triacylglycerol, jehož acyly především jsou nasycené vyšší mastné kyseliny.

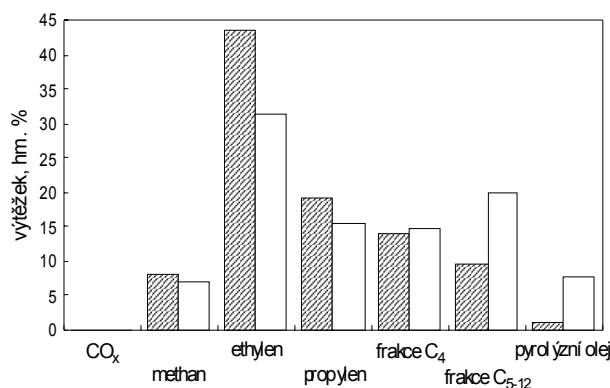
V kosmetických prostředcích se používají rostlinné oleje, v emulzních prostředcích mandlový olej, makadamiový olej a další méně běžné dražší oleje, v olejových koupelích se používá olej sojový, slunečnicový či ricinový. Z triacylglycerolů se pro kosmetické prostředky vyrábí velké množství esterů, např. isopropyl-myristát, isopropyl-palmitát. Dále se z triacylglycerolů vyrábějí emulgátory, které jsou základní a nepostradatelnou surovinou pro výrobu emulzních prostředků (mléka, krémy).

Z hlediska celkové bilance je spotřeba rostlinných olejů a z nich vyrobených derivátů ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu zanedbatelná (odhaduje se méně než 1 Mt za rok).

Hydrogenolýza a hydrogenace rostlinných olejů

Značná pozornost je věnována studiu tepelného rozkladu rostlinných olejů popř. produktů jejich chemických úprav např. esterifikací nebo hydrorafinací.

Řepkový olej lze převést hydrorafinací při použití katalyzátorů NiMo, CoMo nebo NiW (cit.¹⁰) na směs uhlo-

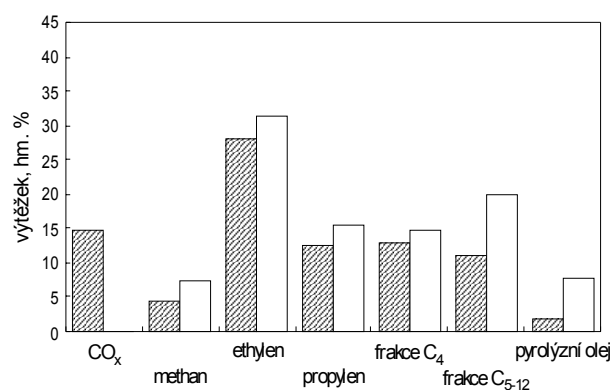


Obr. 8. Porovnání výtěžků pyrolyzních produktů laboratorní pyrolýzy¹¹ (teplota 810 °C) produktů hydrorafinace řepkového oleje (šrafovaně) a standardní ropné průmyslové suroviny, destilačního zbytku z hydrokrakování (prázdně)

vodíků, vody a oxidů uhlíku. Hlavními produkty rozkladných reakcí ve velkém přebytku vodíku jsou uhlovodíky, převážně *n*-oktadekan a *n*-heptadekan, které vznikají hydrodeoxygenací (eliminací kyslíku ve formě vody), popř. hydrodekarboxylací (eliminace kyslíku ve formě oxidů uhlíku) acylů C₁₈. Hydrorafinace probíhá při teplotě přibližně 300 °C a tlaku 0,7–7 MPa. Distribuce uhlovodíků je nejvýznamněji závislá na reakčním tlaku – při nižším tlaku je hlavním produktem *n*-oktadekan, při vyšším tlaku je dominantním produktem *n*-heptadekan. Tyto směsi uhlovodíků lze pak poměrně jednoduše pyrolyzovat podobně jako standardní suroviny ethylenové pyrolýzy (obr. 8).

Tepelný rozklad rostlinných olejů

Uhlovodíky lze získat i přímým tepelným rozkladem rostlinných olejů^{12–18}. Kromě žádané produkce široké palety nízkých alkenů dochází zároveň téměř k úplné deoxygenaci olejů za vzniku oxidů uhlíku a velmi malého množství



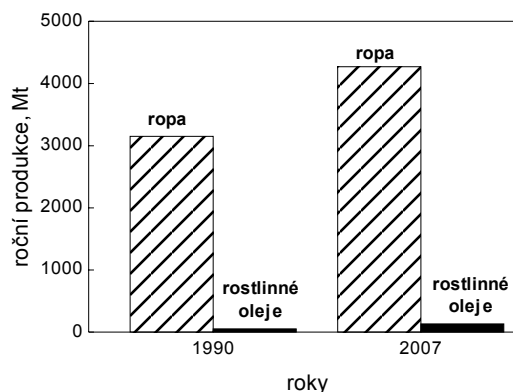
Obr. 9. Porovnání výtěžků pyrolyzních produktů laboratorní pyrolýzy (teplota 810 °C) řepkového oleje (šrafovaně) a destilačního zbytku z hydrokrakování (prázdně)¹⁴

ostatních kyslíkatých produktů (např. propanalu). Výtěžky nejdůležitějších produktů pyrolýzy jsou v porovnání s pyrolýzou standardní průmyslové ropné suroviny, destilačního zbytku z hydrokrakování, uvedeny na obr. 9. Triglyceroly mastných kyselin obsažené v řepkovém oleji obsahují dlouhé lineární řetězce, které za podmínek pyrolýzy velmi snadno podléhají β -štěpení vazby C-C a poskytují proto velké množství ethylenu a dalších klasických produktů pyrolýzy, jako je např. propylen nebo frakce C₄. Vznik oxidu uhličitého je možné vysvětlit dekarboxylací radikálu RCOO• založenou na β -štěpení vazby C-R za vzniku oxidu a uhlovodíkového radikálu R•. Oxid uhelnatý může vznikat například z radikálu RC•O α -štěpením¹⁹ vazby R-C.

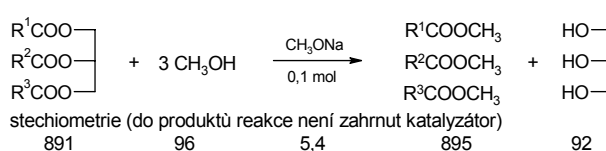
4. Využití v průmyslu paliv

Současná roční světová spotřeba ropy²⁰ je 4270 Mt, zatímco produkce rostlinných olejů¹ 115 Mt (obr. 10). Na 37 kg ropy tak připadá 1 kg rostlinného oleje. Pro totální náhradu ropy by bylo proto nutno zvýšit výrobu rostlinných olejů cca 37× a i kdyby se veškeré pralesy vykácely a vypálily a na jejich místě se pěstovaly olejniny, nešlo by takto vysokou produkci olejů zřejmě delší dobu udržet (např. kvůli nárokům na spotřebu hnojiv a jejich brzkému vyčerpání). V ČR se nyní ročně spotřebuje 2,5 Mt motorového benzínu a 4,5 Mt motorové nafty, tj. celkem 7 Mt kapalných paliv²¹. Současně se spotřebuje v ČR cca 0,7 Mt ropy jako suroviny pro výrobu dalších produktů (polymery, rozpouštědla atd). Z výše uvedených údajů je zřejmé, že mezi množstvím těžené ropy a množstvím produkovaných rostlinných olejů je taková disproporce, že ropu jako zdroj pro výrobu energie nahradit rostlinnými oleji nelze.

Výroba methylesteru řepkových kyselin bazicky katalyzovanou interesterifikací (obr. 11) řepkového oleje je technologicky dobře zvládnuta (počátky jejího řešení v ČR spadají do 80. let 20. století²²). V ČR je v současnosti k dispozici roční kapacita na výrobu 350 kt methylesteru, v EU je k dispozici kapacita na výrobu 6,7 Mt methyleste-



Obr. 10. Porovnání produkce ropy a celkového množství rostlinných olejů^{1,20}



Obr. 11. Výroba methylesteru řepkových kyselin interesterifikací methanolem

ru ročně.

Řada studií^{23–36} se zabývá získáváním bionafty z rostlinných olejů tepelným rozkladem při teplotách do 500 °C, obvykle za použití katalyzátorů, např. Al₂O₃, zeolitů a Na₂CO₃. Tímto způsobem jsou získávány převážně lineární alkeny a 1-alkeny, aromáty, v malém množství alkeny C₂-C₄, vodík, karboxylové kyseliny, aldehydy, ketony a oxidy uhlíku. Částečným tepelným rozkladem rostlinných olejů dochází ke zlepšení jejich užitečných vlastností jako biopaliv, ale současně se zvyšuje nežádoucí kyselost, jak dokládá tab. II.

Tabulka II

Fyzikálně-chemické vlastnosti částečně tepelně rozloženého sojového a palmového oleje a motorové nafty²⁴

Parametr	Upravený sojový olej	Upravený palmový olej	Motorová nafta
Hustota při 20 °C, kg m ⁻³	844	818	820–880
Viskozita při 40 °C, mm ² s ⁻¹	3,5	2,7	2,5–5,5
Číslo kyselosti, mg KOH g ⁻¹	116	133	0
Cetanové číslo	50,1	52,7	45,0
Viskozita při 38 °C před úpravou, mm ² s ⁻¹	32,6	40,9	–

Pozn. Číslo kyselosti je definováno jako množství KOH v mg potřebné k neutralizaci 1 g vzorku

Tabulka III
Spotřeba hnojiv ve vztahu k výnosům řepkového semene²⁸

Prvek	Výnos semen z 1 t ha ⁻¹ Spotřeba prvku [kg ha ⁻¹]	Výnos semen z 3 t ha ⁻¹ Spotřeba prvku [kg ha ⁻¹]	Množství prvku odvážené z pole při výnosu 3 t ha ⁻¹ [kg ha ⁻¹]
N	50–60	140–200	100
P	11–15	35–50	22
K	50–58	150–220	25
S	6–10	28–35	10
Ca	28–50	110–160	11
Mg	4–7	15–22	7

5. Perspektivy využití rostlinných olejů

Koncem 70. let 20. století se začala v České republice a v Evropě využívat řepka pro průmyslové účely. Množství oleje využívané jako palivo do dieselových motorů (bionafta) bylo relativně malé a zpracovávalo se v sektoru potravinářského průmyslu. Plánovalo se využití bionafty jako paliva v zemědělství, lesním hospodářství a v národních parcích. Tedy tam, kde bylo žádoucí předejít důsledkům případné havárie, při které by běžná nafta způsobila těžko odstranitelné ekologické potíže. Tento program však nebyl realizován.

Současné pěstování řepky je důsledek dotační zemědělské a ekologické politiky EU a tedy i ČR, která reguluje a nařizuje použití řepkového methylesteru jako motorového paliva²⁷. Methylester není jako palivo do dieselových motorů zcela ideální. Pokud se nadále bude pěstovat řepka ve velkém měřítku, měl by se řepkový olej využít ekonomicky.

Všechny ekologické důsledky masového pěstování obnovitelných surovin jsou těžko předvídatelné. V České republice (a podobně v EU), kde se řepka olejná pěstuje místo jiných zemědělských plodin, nebudou ekologické důsledky tak dramatické jako v tropických oblastech. V České republice se řepka olejná pěstovala v roce 2007 na 330 000 ha (3300 km²), což je 10 % všech osetých ploch a 4,2 % celkové plochy České republiky. Sklidilo se 1050 kt řepkového semene (3,2 t ha⁻¹), z něhož se získá cca 420 kt řepkového oleje. Existuje maximální mez, kolik procent orné půdy je možno dlouhodobě osívat řepkou. Řepka jako zemědělská plodina má specifické nároky. V tabulce III jsou pro ilustraci uvedena množství jednotlivých prvků v hnojivech²⁸, která jsou třeba k zajištění uvedených výnosů a rovněž je uvedeno množství těchto prvků, která se z pole odvezou. Je vidět, že pro intenzivní pěstování řepky je třeba intenzivně hnojit. Je racionální spotřebovávat tyto prvky v podobě minerálních hnojiv, zejména pak P, K, S a Mg pro tyto účely? Nevyčerpají se jejich ložiska dříve než ropa? Neměly by být tyto prvky spíše použity jako hnojiva pro výrobu potravin?

Úplná energetická bilance výroby biopaliv z oleje je kladná. Energie, spotřebovaná na jejich výrobu je nižší než

energie, kterou lze získat jejich spálením. Souhrnná bilance emisí skleníkových plynů však tak příznivá není, přestože právě ony jsou hlavním důvodem prosazování biopaliv. Výše uvedená spotřeba minerálních hnojiv je spojena s produkcí oxidů dusíku. Potenciál tohoto plynu přispívat ke skleníkovému efektu je přitom asi 300× větší než u oxidu uhličitého²⁹. Proto je v konečném důsledku efekt použití methylesteru řepkového oleje srovnatelný s klasickými palivy.

6. Závěr

Využití rostlinných olejů v průmyslu paliv v podobě methylesterů mastných kyselin má své technické i ekonomické nevýhody. Odstranění technických nevýhod eliminací karboxylové funkce hydrogenolýzou nebo dekarboxylací však vede k dalšímu zdražení produktu. V petrochemickém průmyslu vyrábějícím produkty s vyšší přidanou hodnotou může být proto využití olejů ekonomicky schůdnější. Termickým rozkladem rostlinných olejů, případně produktů jejich reesterifikace nebo dokonce dekarboxylace, lze získat běžné petrochemické produkty, které je možné hladce začlenit do navazujícího řetězce petrochemických výrob.

Rostlinné oleje by měly být použity tam, kde je jejich použití nejefektivnější – v potravinářství a v odvětvích chemického průmyslu, která využívají mastné kyseliny, glycerol a jejich deriváty, jako např. při výrobě tenzidů nebo ve farmaceutickém průmyslu. Určitý surovinový potenciál lze pro technické účely spatřovat pouze ve využití odpadních olejů a hlavně živočišných tuků.

Tato práce byla vytvořena za podpory grantů: MŠMT 6046137305 / 2005, GA ČR 104/08/1288.

LITERATURA

1. Produkce olejů svět: Index Mundi (by Miguel Barrientos): Information in this site was extracted from the CIA World Factbook: www.indexmundi.com

- (20.02.2008).
2. Produkce olejů ČR: Olejiny, situační a výhledová zpráva. MZ ČR 1990–2005.
 3. Westfechtel A.: Glycerol Derivatives – An Overview, *26th World Congress and Exhibition of the International Society for Fat Research (ISF)*; Praha 25.–28. září 2005.
 4. Bockish M.: *Fats and Oils Handbook*. str. 151. AOCS Press, Champaign (Illinois) 1998.
 5. Karsa D. R., Johansson I.: Surfactant derived from oils and fats; a story of continuous development. Proc. *3rd Euro Fed Lipid Congress, Edinburgh 5–8 September 2004*.
 6. Šmidrkal J.: Chem. Listy 93, 421 (1999).
 7. Hreczuch W.: Tenside Surfactans Deterg. 38, 72 (2001).
 8. Renkin M., Fleurackers S., Szwach I., Hreczuch W.: Tenside Surf. Det. 4, 280 (2005).
 9. Šmidrkal J., Filip V., Axmanová M., Hanek R.: *XXXV. seminář o tenzidech a detergentech, Bohdaneč 2001*. Sborník, str. 95. Bohdaneč 2001.
 10. Kubička D., Šimáček P., Lederer J., Bělohav Z., Záměstný P.: *17. konference APROCHEM 2008*. Sborník, (Škarka J. ed.), díl I., str. 1155. PCHE, Praha 2008.
 11. Bělohav Z., Pavlík D., Herink T., Svoboda P., Záměstný P., Marek J.: Chem. Listy 96, 325 (2002).
 12. Starkbaumova L., Bělohav Z., Šmidrkal J., Záměstný P.: *54. konference chemického a procesního inženýrství CHISA 2007*. Sborník, Pyrolýzy rostlinných olejů, CD ROM. ČSCHI, Praha 2007.
 13. Šmidrkal J., Bělohav Z., Filip V., Záměstný P.: *XLV. Mezinárodní konference z technologie a analytiky tuků, Janov nad Nissou 2007*. Sborník přednášek, str. 128. Janov nad Nissou 2007.
 14. Šmidrkal J., Bělohav Z., Filip V., Záměstný P., Starkbaumova L.: *XL. seminář o tenzidoch a detergentech, Bojnice 2007*. Sborník. Bojnice 2007.
 15. Zhenyi C., Xing J., Shuyuan L., Li L.: Energy Sources 26, 849 (2004).
 16. Şensöz S., Angin D., Yorgun S.: Biomass Bioenergy 19, 271 (2000).
 17. Onay O., Koçkar O. M.: Biomass Bioenergy 26, 289 (2004).
 18. Archambault D., Billaud F.: Ind. Crop. Prod. 7, 329 (1998).
 19. Lazár M.: *Chemické reakcie voľných radikálov*. Alfa, Bratislava 1983.
 20. EIA – Petroleum Basic Data: www.eia.doe.gov/basics/quickoil.html, staženo 04.03.2008.
 21. Šebor G., Melzoch K., Pospíšil M., Rychtera M.: *Analýza výroby a využívání biopaliv jako náhrady fosilních pohonných hmot v dopravě ČR* (studie). VŠCHT v Praze, Praha 2006.
 22. Šmidrkal J., Krob V., Zajícová H.: *Příprava esterů a superamidů mastných kyselin; závěrečná zpráva*. VÚTP, Rakovník 1989.
 23. Srivastava A., Prasad R.: Renew. Sustain. Energ. Rev. 4, 111 (2000).
 24. Lima D. G., Soares V. C. D., Ribeiro E. B., Carvalho D. A., Cardoso É. C. V., Rassi F. C., Mundim K. C., Rubim J. C., Suarez P. A. Z.: J. Anal. Appl. Pyrolysis 71, 987 (2004).
 25. Schwab A. W., Dykstra G. J., Selke E., Sorenson S. C., Pryde E. H.: J. Am. Oil Chem. Soc. 65, 1781 (1988).
 26. Dandik L., Aksoy H. A.: Fuel Process. Technol. 57, 81 (1998).
 27. Šebor G., Pospíšil M.: *17. konference APROCHEM 2008*. Sborník, (Škarka J., ed.), díl I., str. 1109. PCHE, Praha 2008.
 28. Vašák J., Fábry A., Zukalová H., Morbacher J., Barany P.: *Systém výroby řepky*. str. 52. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha 1997.
 29. Záměstný P., Kukula P., Young J. S.: Chem. Listy 93, 238 (1999).

J. Šmidrkal^a, V. Filip^a, Z. Bělohav^b, P. Záměstný^b, and V. Hönl^c (^a Department of Dairy and Fat Technology, ^b Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^c Department of Chemistry, Czech University of Agriculture, Prague): **Current State and Prospects of Utilization of Vegetable Oils**

The article presents a review of current situation in the production of vegetable oils and their use for food products and as a raw material in chemical industry. Most vegetable oils are used as edible oils and margarin, ca. 14 % are used in chemical industry, e.g. for production of methyl esters of fatty acids and surfactants, and a very small part in cosmetics and pharmaceuticals. Other potentialities of vegetable oils are their hydrogenation, hydrolysis to alkanes or pyrolysis to low-molecular-weight alkenes (ethene) and aromatics.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STUDIUM SYNTÉZY 3'-DEOXY-3'-[¹⁸F]FLUORTHYMIDINU – PERSPEKTIVNÍHO RADIOFARMAKA PRO POZITRONOVOU EMISNÍ TOMOGRAFII

**LIBOR PROCHÁZKA, MARTIN KROPÁČEK,
MARCELA MIRZAJEVOVÁ, JANA ZIMOVÁ,
MICHAELA FÖRSTEROVÁ, HELENA
ŠVECOVÁ a FRANTIŠEK MELICHAR**

*Ústav jaderné fyziky, v.v.i., Laboratoř PET, Akademie věd
České republiky, 250 68 Řež
melichar@ujf.cas.cz*

Došlo 20.7.06, přepracováno 11.3.08, přijato 20.5.08.

Klíčová slova: PET radiofarmaka, syntéza značených sloučenin, FLT, nukleofilní substituce

Úvod

3'-Deoxy-3'-[¹⁸F]fluorthymidin (3'-[¹⁸F]FLT) představuje mezi radiofarmaky pro pozitronovou emisní tomografii (PET) účinnou látku pro selektivní zobrazení rychle rostoucí tkáň. Důvodem je zabudování tohoto fluorovaného nukleosidu do nově vznikající DNA v rychle rostoucí nádorové tkáni. Zádrž v buňkách a efektivní poločas 3'-[¹⁸F]FLT jsou dostatečné k zobrazení akumulace účinné látky v nádorové tkáni a následně k stanovení rychlosti buněčného dělení.

Při návrhu syntézy účinné látky pro PET radiofarmaka je nutno vycházet z následujících požadavků:

- prekurzor účinné látky musí být dobře syntetizovatelný v požadovaném množství (miligramy) a ve farmaceutické kvalitě obecně popsané lékopisem (např. s definovaným obsahem rozpouštědel),
- vysoký výtěžek syntézy účinné látky k přípravě konečného radiofarmaka pro reálně aplikovatelné množství, kdy je nutné účinnost syntézy korigovat na fyzikální rozpad radioisotopu ¹⁸F (109 min),
- kontrola kvality konečného radiofarmaka, která zahrnuje stanovení radionuklidové, radiochemické a chemické čistoty, osmolality a apyrogenity, musí být časově zvládnutelná řádově v desítkách minut,
- definitivní postup přípravy a kontroly kvality musí

vyhovovat velmi přísným podmínkám správné výrobní praxe (SVP).

Experimentální část

Reagencie

Voda obohacená isotopem kyslíku [¹⁸O]H₂O – obsah min. 97 % (Rotem, Israel); 1-(2'-deoxy-3'-O-(4-nitrobenzen-1-sulfonyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-threo-penta-furanosyl)-3-(terc-butyloxykarbonyl)thymidin – min. 95 % (ABX, Německo); 1-(2'-deoxy-3'-O-(4-nitrobenzen-1-sulfonyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-threo-penta-furanosyl)thymidin – min. 95 % (ABX, Německo); 2,3'-anhydro-5'-O-benzoylthymidin – min. 95 % (ABX, Německo); acetonitril pro syntézu DNA – min. 99,8 %, obsah vody max. 0,03 % (Merck, Německo); dimethylsulfoxid bezvodý SeccoSolv (max. 0,05 % vody) (Merck, Německo); ethanol LichroSolv – min. 99,9 % (Merck, Německo); 3'-deoxy-3'-fluorthymidin (referenční standard) – min. 95 % (ABX, Německo); Kryptofix 222 pro syntézu – min. 99 % (Merck, Německo); uhlíčitán draselný p.a. – min. 99 % (Merck, Německo); hydrogenfosforečnan sodný, odpovídá Evropskému lékopisu (PhEur), (Fluka, Švýcarsko); hydroxid sodný, PhEur (Merck, Německo); kyselina chlorovodíková, 1 mol l⁻¹, Ph Eur (Sigma-Aldrich, Švýcarsko); Ardeaelysol konc. natriumchlorid 5,85 %, PhEur (Ardeapharma, ČR); sterilizovaná voda na injekci, PhEur (Phoenix, ČR).

Přístroje

Ozařování

Příprava výchozího nuklidu ¹⁸F byla provedena za následujících podmínek ozařování: cyklotron U-120M s ozařovacím terčem vyrobeným z niobu o objemu 3,6 ml (IBA, Belgie). Podmínky ozařování: terčový materiál – 3,3 ml [¹⁸O]H₂O, max. proud částic H⁻ 35 μA, energie 17 MeV, rychlost produkce cca 1–2 GBq/min/25 μA.

Syntéza a separace

Syntéza účinné látky 3'-[¹⁸F]FLT byla prováděna na syntézním modulu TRACERlab Mx FDG (General Electric Medical Systems, Švédsko) s řídicím počítačem a modifikovaným softwarem, který byl připraven pro jednotlivé stupně syntézy.

Separace účinné látky 3'-[¹⁸F]FLT z reakční směsi byla provedena semipreparativní chromatografií na přístroji složeném z binární gradientové pumpy P680P HPG (Dionex Softron, Německo), dávkovacího ventilu EV700-100-SU (Supelco, USA) se smýčkou 20 ml, kolony Polaris 5 μ C18-A, 250×10 mm s předkolonou Polaris

5 μ C18-A, 50 \times 10 mm (Varian, USA), UV detektoru UVD 170U (Dionex Softron, Německo), radiodetektoru LB6500-3 (Berthold Technologies, Německo) a automaticky ovládaného solenoidového ventilu 225T031 (NResearch Europe, Švýcarsko) pro separaci žádané frakce. Mobilní fáze měla složení ethanol:voda na injekci 7,5:92,5.

Kontrola kvality

Zbytková rozpouštědla byla stanovena na plynovém chromatografu STAR 3400CX (Varian, USA) s kolonou Varian VA-1 a plamenovým ionizačním detektorem za těchto podmínek: teplotní gradient kolony 40–80 °C, nosný plyn dusík, nástřik 1 μ l metodou „split“, teplota injektoru 260 °C, teplota detektoru 300 °C.

Chemická a radiochemická čistota byla stanovena kapalinovou chromatografií na přístroji s binární gradientovou pumpou Beckman 127 NM (Beckman Instruments, USA), ručním dávkovacím ventilem s 20 μ l smyčkou (Rheodyne, USA), UV detektorem UVIS 200 (Linear Instruments, USA) a radiodetektorem GABI (Raytest, Německo). Použitá mobilní fáze měla složení ethanol: voda 10:90.

Stanovení radioaktivity bylo provedeno ionizační komorou Atomlab 300 (Biodex, USA).

Pro stanovení bakteriálních endotoxinů byl použit inkubační turbidimetr LAL 5000 (Associates of Cape Cod, USA).

Stanovení osmolality bylo uskutečněno na osmometru Micro-osmometer 210 (Fiske, USA).

Měření pH bylo provedeno pH-metrem pH538 (WTW, Německo) se skleněnou kombinovanou mikroelektrodou Biotrode (Hamilton, USA).

Výsledky a diskuse

Syntéza účinné látky a formulace konečného přípravku

Pro přípravu 3'-[¹⁸F]FLT byla použita nukleofilní substituce vhodné funkční skupiny prekurzoru radioaktivním nuklidem ¹⁸F za katalýzy Kryptofixem 222. Konečným výsledkem byl sterilní apyrogenní izotonický roztok radiofarmaka vhodný pro intravenózní aplikaci v humánní medicíně.

Celý vývoj syntézy účinné látky a léčivého přípravku 3'-[¹⁸F]FLT, injekce, zahrnoval:

- separaci ¹⁸F⁻ z terčového materiálu na polárním bazickém anexu v uhlíčanovém cyklu,
- eluci [¹⁸F]F⁻ do reakční nádoby elučním roztokem (22 mg Kryptofixu 222, 7 mg uhlíchanu draselného, 0,3 ml acetonitrilu, 0,3 ml vody),
- odvodnění fluoračního činidla azeotropickou destilací s acetonitrilem (3 \times 0,2 ml),
- značení prekurzoru radionuklidem,
- kyselou nebo alkalickou hydrolyzu (podle použitého

prekurzoru),

- neutralizaci reakční směsi alkalickým fosfátovým pufrům nebo kyselým acetátovým pufrům,
- zachycení nezreagovaného [¹⁸F]F⁻ na oxidu hlinitém a transport reakčního produktu do smyčky dávkovacího ventilu semipreparativního chromatografu.

Dalšími kroky přípravy radiofarmaceutického přípravku bylo odstranění ethanolu z frakce 3'-[¹⁸F]FLT, izotonizace a sterilizace konečného přípravku, což představovalo:

- odpaření ethanolu destilací za sníženého tlaku v proudě sterilního dusíku,
- izotonizace koncentrovaným roztokem NaCl,
- sterilizace sterilizujícím filtrem.

Tímto postupem bylo získáno 6–9 GBq přípravku 3'-[¹⁸F]FLT (korigovaná účinnost značení 26,0 % (23,6 až 29,3 %), počet provedených syntéz 14). Připravená aktivita přípravku umožňuje vyšetření cca 7–11 pacientů.

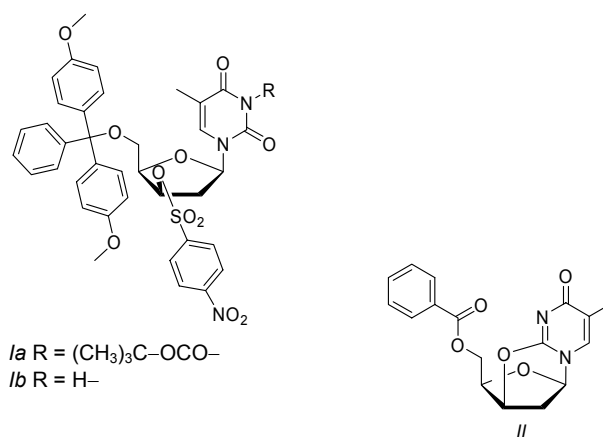
Volba prekurzoru a optimalizace podmínek značení

Testovány byly tři prekurzory, poskytující dle literatury nejvyšší výtěžky značení (obr. 1):

- 1-(2'-deoxy-3'-O-(4-nitrobenzen-1-sulfonyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-threo-penta-furanosyl)-3-(terc-butyloxykarbonyl)thymín (zkráceně Boc-FLT, Ia)¹,
- 1-(2'-deoxy-3'-O-(4-nitrobenzen-1-sulfonyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-threo-pentafuranosyl) thymín (Non-Boc-FLT, Ib)^{2,3},
- 2,3'-anhydro-5'-O-benzoylthymidin (BATH, II)⁴.

Z rozpouštědel byly dle literatury¹⁻⁷ použity: acetonitril (MeCN), dimethylsulfoxid (DMSO), dimethylformamid (DMF) a 1,2-dichlorbenzen (DCB).

Jedním z cílů studia syntézy bylo nahradit acetonitril, který se při teplotách běžně používaných pro značení deri-



Obr. 1. Strukturální vzorce prekurzorů použitých pro syntézu 3'-[¹⁸F]FLT

Tabulka I

Výtěžky zkušebních syntéz $3'$ - ^{18}F FLT s použitím prekurzoru Non-Boc-FLT v roztoku MeCN

Označení syntézy	Navážka prekurzoru [mg]	Teplota značení [°C]	Doba značení [min]	Výtěžek značení [%]
4 aktivní ^a	30	130	5	18
5 neaktivní ^b	18	85	4	0
6 neaktivní ^b	24	110	5	3
7 neaktivní ^b	24	120	10	25
8 neaktivní ^b	23	120	10	18
9 neaktivní ^b	24	120	10	34
10 neaktivní ^b	24	120	10	16
11 aktivní ^a	30	120	10	3
12 aktivní ^a	30	160	10	22
16 neaktivní ^b	12	130	10	5
18 neaktivní ^b	25	130	10	25
19 aktivní ^a	25	130	10	15
20 aktivní ^a	25	130	10	22
24 aktivní ^a	25	150	10	29

^a Pro syntézu použit neradioaktivní $^{19}\text{F}^-$, ^b syntéza s radioaktivním $^{18}\text{F}^-$

Tabulka II

Výtěžky zkušebních syntéz $3'$ - ^{18}F FLT s použitím prekurzoru Boc-FLT v roztoku MeCN

Označení syntézy	Navážka prekurzoru [mg]	Teplota značení [°C]	Doba značení [min]	Výtěžek značení [%]
21 aktivní ^a	25	130	10	50
22 aktivní ^a	25	110	10	51
23 aktivní ^a	25	150	10	44
25 aktivní ^a	25	130	10	58
26 neaktivní ^b	25	130	10	52

^a Pro syntézu použit neradioaktivní $^{19}\text{F}^-$, ^b syntéza s radioaktivním $^{18}\text{F}^-$

vátů thymidinu aniontem $^{18}\text{F}^-$ nukleofilní substitucí (130 až 180 °C), velice rychle odpařuje a strhává sebou část nuklidu ^{18}F . Tím se snižuje radiochemická účinnost syntézy a výtěžek $3'$ - ^{18}F FLT.

Souhrn výsledků provedených zkušebních syntéz s jednotlivými prekurzory je uveden v tabulkách I a II.

Z tabulek je patrné, že podstatně vyšší výtěžky syntézy poskytuje prekurzor Boc-FLT. V další tabulce III jsou uvedeny výsledky syntézy $3'$ - ^{18}F FLT s roztoky prekurzorů v DMSO a MeCN za stejných podmínek syntézy.

Výtěžek syntézy $3'$ - ^{18}F FLT je také závislý na navážce použitého prekurzoru a reakční teplotě syntézy.

Z uvedených výsledků vyplývá, že dimethylsulfoxid je vhodnějším rozpouštědlem při vysoké teplotě značení (160 °C) (poskytuje poněkud vyšší výtěžky), jeho použití je ale limitováno nízkou odolností materiálu kazety (polysulfon).

V rámci studia syntézy $3'$ - ^{18}F FLT byla provedena také konečná bilance aktivity ^{18}F v jednotlivých reakčních stupních syntézy v závislosti na teplotě značení prekurzoru Boc-FLT. Výsledky jsou patrné z obr. 2 a 3.

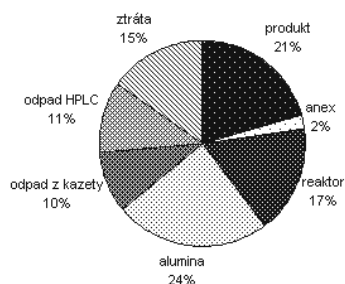
Z těchto grafů jednoznačně vyplývá, že se zvýšením teploty značení se snížil podíl nezreagovaného ^{18}F fluoridu (zachyceného na alumině) a zvýšil se výtěžek

Tabulka III

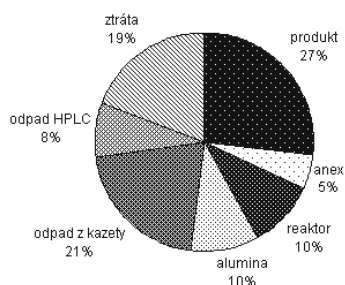
Porovnání účinnosti značení v acetonitrilu a DMSO pro všechny prekurzory

Prekurzor	Značení				Hydrolyza		Hlavní podíly aktivity (% korekce na rozpad)					
	roz-pouš-tědlo	objem rozp. [ml]	teplota [°C]	navážka prek. [mg]	činidlo	teplota [°C]	produkt kolona QMA	reaktor	alumina	odpad HPLC	ztráta	
Boc-FLT	DMSO	0,8	130	20	TFA	50	19	1	4	26	32	18
Boc-FLT	DMSO	0,8	130	20	HCl	50	24	2	5	30	28	11
Boc-FLT	DMSO	0,8	160	20	TFA	100	26	1	8	15	36	14
Boc-FLT	DMSO	0,8	160	20	HCl	100	34	1	7	13	24	21
Non-Boc-FLT	MeCN	2,0	130	12	TFA	50	10	2	6	42	25	15
Non-Boc-FLT	MeCN	2,0	130	12	HCl	50	14	2	8	39	22	15
Non-Boc-FLT	MeCN	5,3	160	12	TFA	100	18	1	10	17	31	23
Non-Boc-FLT	MeCN	5,3	160	12	HCl	100	21	1	12	19	29	18
Non-Boc-FLT	DMSO	0,8	130	12	TFA	50	15	2	5	34	27	17
Non-Boc-FLT	DMSO	0,8	130	12	HCl	50	17	1	4	30	24	24
Non-Boc-FLT	DMSO	0,8	160	12	TFA	100	24	1	7	19	33	16
Non-Boc-FLT	DMSO	0,8	160	12	HCl	100	26	2	8	16	32	16
BATH	MeCN	2,0	130	12	NaOH	80	14	2	3	37	22	22
BATH	MeCN	5,3	160	12	NaOH	80	22	1	9	15	19	34
BATH	DMSO	0,8	160	12	NaOH	80	28	1	8	13	17	33
BATH	DMSO	0,8	160	12	NaOH	80	31	2	12	14	16	25

Hydrolytická činidla: HCl = 1 ml 1 M HCl; TFA = 0,806 ml 1 M HCl + 0,194 ml konc. kyseliny trifluoroctové, NaOH = 0,25 M NaOH



Obr. 2. **Balance aktivity:** značení prekurzoru Boc-FLT při 130 °C, 10 min, hydrolyza 1 M HCl, 100 °C, 5 min



Obr. 3. **Balance aktivity:** značení prekurzoru Boc-FLT při 160 °C, 10 min, hydrolyza 1 M HCl, 100 °C, 5 min

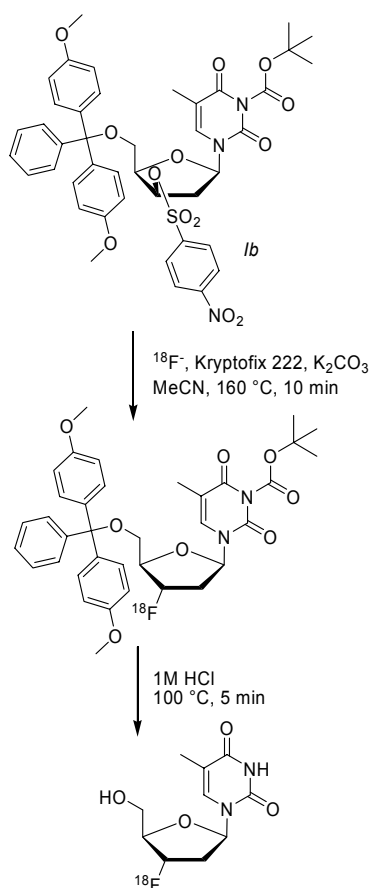
produktu. Zároveň se ale zvýšil i podíl ^{18}F v odpadu ze syntézního modulu, což je důsledkem zvýšené teploty, proto lze teplotu 160 °C považovat za optimum. Obdobný trend lze sledovat u obou dalších prekurzorů.

Konečné schéma syntézy $3'-[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ je patrné z následujícího obr. 4.

Závěr

Příprava $3'-[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ byla studována s použitím tří prekurzorů, nejvyšších výtěžků syntézy bylo dosaženo s použitím prekurzoru Boc-FLT. Studován byl vliv dvou rozpouštědel na výtěžek značení tří prekurzorů. Ve všech třech případech je poněkud vyššího výtěžku dosaženo při použití dimethylsulfoxidu. Dosažený celkový výtěžek syntézy je vyšší než ve většině publikací jiných autorů (o 5 až 15%)^{1,2,5,6}. Příprava $3'-[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ v požadované radiochemické a chemické čistotě vyžaduje přečištění s použitím HPLC. Celý proces syntézy byl dále optimalizován. Syntézy byly provedeny na původně jednorázovém syntézním modulu, pro který byl připraven příslušný software.

Parametry připraveného $3'-[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ odpovídají přísným požadavkům Správné výrobní praxe kladeným na radiofarmaceutické přípravky tak, aby i obsah zbytkového rozpouštědla vyhověl požadavku českého a evropského

Obr. 4. Schéma syntézy 3'-[¹⁸F]FLT

lékopisu. Navržený postup syntézy umožňuje připravit radiofarmakum o dostatečné aktivitě použitelné pro klinickou aplikaci u několika pacientů.

Autoři děkují Interní grantové agentuře Ministerstva zdravotnictví České republiky za podporu projektu NL/7688-3.

LITERATURA

1. Martin S. J., Eisenbarth J. A., Wagner-Utermann U., Mier W., Henze M., Pritzkow H., Haberkorn U., Eisenhut M.: Nucl. Med. Biol. 29, 263 (2002).
2. Grierson J. R., Shields A. F.: J. Labelled. Comp. Radiopharm. 42, 525 (1999).
3. Grierson J. R., Shields A. F.: J. Nucl. Med. 40, 83P (1999).
4. Cleij M. C., Steel C. J., Brady F., Ell P. J., Pike V. W., Luthra S. K.: J. Labelled. Comp. Radiopharm. 44, 871 (2001).
5. Machulla H.-J., Blocher A., Kuntzsch M., Piert M., Wei R., Grierson J. R.: J. Radioanal. Nucl. Chem. 243, 843 (2000).
6. Grierson J. R., Shields A. F.: Nucl. Med. Biol. 27, 143 (2000).
7. Wodarski C., Eisenbarth J., Weber K., Henze M., Haberkorn U., Eisenhut M.: J. Labelled. Comp. Radiopharm. 43, 1211 (2000).
8. Shields A. F., Grierson J. R., Dohmen B. M., Machulla H. J., Stayanoff J. C., Lawhorn-Crews J. M., Obradovich J. E., Muzik O., Mangner T. J.: Nat. Med. 4, 1334 (1998).
9. Sherley J. L., Kelly T. J.: J. Biol. Chem. 263, 8350 (1998).
10. Siegmund H., Pfeleiderer W.: Helv. Chim. Acta 79, 426 (1996).

L. Procházka, M. Kropáček, M. Mirzajevová, J. Zimová, M. Försterová, H. Švecová, and F. Melichar (Nuclear Physics Institute, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež near Prague): **Study of Synthesis of 3'-Deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine – Prospective Radiopharmaceutical in Positron Emission Tomography**

¹⁸F-Labelled compounds as active substances of radiopharmaceuticals are used for imaging in positron emission tomography (PET) in nuclear medicine. The radiosynthesis of PET radiopharmaceuticals is based on nucleophilic substitution with F⁻ in a precursor. The synthesis is demonstrated on 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine.

AUTOMATIZOVANÉ STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI CYKlickÉMU CITRULINOVANÉMU PEPTIDU NA ANALYZÁTORU AxSYM

RICHARD PIKNER^a, DAVID SUCHÝ^b, JANA
ZÍTKOVÁ^a, HANA BRABCOVÁ^b, MARIE
BERANOVÁ^a a STANISLAV KORMUNDA^c

^a Oddělení klinických laboratoří, Klatovská nemocnice
a.s., Plzeňská 569, 339 38 Klatovy, ^b Oddělení klinické
farmakologie, LF UK a FN Plzeň, Plzeň, ^c Ústav
sociálního lékařství, LF UK Plzeň
pikner@nemkt.cz

Došlo 6.2.08, přijato 6.5.08.

Klíčová slova: anti-CCP, revmatoidní artritida, referenční
meze, diagnostická senzitivita, diagnostická specifita

Úvod

Revmatoidní artritida je časté systémové autoimunitní onemocnění s frekvencí v populaci 1,0–2,0 %. Jde o chronický zánět kloubní výstelky (synovie), který vede k progresivní destrukci kloubů, a tím ke snížení lokální hybnosti a kvality života jedince. Při tomto procesu se do séra uvolňuje cyklický peptid s vysokým obsahem argininových zbytků, které jsou následně pomocí enzymu peptidylargininndeaminasy (PAD) přeměněny na citrulin. Následně vznikají protilátky specifické proti epitopům obsahující tento citrulin, a proto mluvíme o protilátkách proti cyklickému citrulinovanému peptidu (anti-CCP)¹. Druhá generace testů měřících specificky anti-CCP2 se jeví jako slibný marker revmatoidní artritidy s diagnostickou senzitivou průměrně 68 % a diagnostickou specifitou 95 %. Na rozdíl od běžně užívaného revmatoidního faktoru poskytuje výsledky s vyšší diagnostickou specifitou při stejné či vyšší diagnostické senzitivě (vysvětlení viz metodologie – statistická analýza)². Přítomnost anti-CCP protilátek je také prognostickým markerem vzniku revmatoidní artritidy³, či jako predikátor více agresivního průběhu choroby⁴.

Autoři představují analytické vlastnosti a klinické zhodnocení nové automatizované metody na stanovení anti-CCP protilátek, která provádí měření po jednotlivých patientských vzorcích a umožňuje získat výsledek za 20 až 30 minut.

Metodika

Opakovatelnost stanovení

Opakovatelnost stanovení metody vyjadřuje míru variability testovaných vzorků. Byl testován pozitivní kontrolní vzorek dodaný výrobcem a pozitivní pacient, výsledné hodnoty variability byly vyjádřeny jako průměrné hodnoty, SD a CV%. Míra variability byla testována v rámci jedné výrobní šarže po dobu 5 dnů, každý den byla provedena dvě stanovení anti-CCP s prodlevou 2 hodin mezi stanoveními, a to u pozitivní kontroly ze soupravy a pozitivního vzorku pacienta (celkem 20 stanovení jednoho vzorku). Stanovení byla prováděna vždy v duplikátu. Každý den se vždy používala čerstvá kontrola a samostatně rozmražený alikvot vzorku pozitivního pacienta.

Mez detekce

Mez detekce byla vypočtena jako koncentrace z průměrné hodnoty slepého pokusu + 2 směrodatné odchylky (SD). Stanovení byla opakována 10× pro standard A (0 U ml⁻¹) a 2× pro standard B (5 U ml⁻¹). Tato procedura byla provedena celkem 4× a u každé série byla následně vyhodnocena mez detekce (průměr + 2SD) a CV%. Výsledné hodnoty meze detekce jsou dány průměrem těchto čtyř měření.

Kontrolní soubor (kontroly)

K určení referenční meze anti-CCP protilátek byly použity vzorky sér od 105 dárců krve (51 žen a 54 mužů), kteří měli negativní rodinnou i osobní anamnézu revmatoidního onemocnění či jiného autoimunitního onemocnění (systémový lupus erytematodes tyreoiditida, coeliakie, diabetes mellitus I. typu). U této skupiny byl testován vliv pohlaví a věku na hodnoty anti-CCP.

Soubor pacientů

Ve srovnání se skupinou zdravých jedinců jsme provedli zhodnocení pacientů s již prokázanou revmatoidní artritidou, kteří splňovali diagnostická kritéria dle American College of Rheumatology⁵ (skupina označená jako „RA“ – celkem 95 vzorků sér), u těchto vzorků jsme vyhodnotili diagnostickou senzitivitu a specifitu pomocí operační charakteristiky modelu (Receiver Operating Characteristics plot – ROC křivka). Dále jsme vyšetřili sérové vzorky skupiny nemocných se systémovými onemocněními pojiva či kloubů (skupina „NONRA“, která zahrnovala pacienty s diagnózami: systémový lupus erytematodes, spondylartritidy, lumbalgie, M. Bechtěrev, osteoartróza, postinfekční artritidy apod. – celkem 71 sérových vzorků). Procentuální zastoupení jednotlivých chorob je sumarizováno v tab. I. Mezi soubory jsme analyzovali rozdíly distribucí hodnot anti-CCP.

Tabulka I
Procentuelní zastoupení diagnóz ve skupině pacientů NONRA^a

Klinická diagnóza	Počet	Výskyt [%]
Systémový lupus erythematoses	11	15,4
Časově omezená artritida	3	4,2
Spondylartritida	14	19,7
Chronické artralgie	7	9,9
Reaktivní artritida	4	5,6
Polymyalgia reumatica	2	2,8
Osteoartróza	12	16,9
Dnavá artritida	2	2,8
Lumbalgie	3	4,2
Ostatní	13	18,4

^a NONRA – pacienti s diagnózou systémového onemocnění pojiva či kloubů, při těchto onemocněních se mohou vyskytnout i protilátky proti CCP (anti-CCP)

Klinická senzitivita metody je definována jako % správně pozitivních nálezů ze skupiny pacientů s ověřenou diagnózou revmatoidní artritidy. Specifita je naopak % správně negativních výsledků ze skupiny kontroly. Referenční mez (cut off) byla definována jako hodnota 95. a 99. kvantilu hodnot anti-CCP ve skupině kontroly.

Metodika stanovení

Vzorky séra byly získány centrifugací při 10 000 g po dobu 10 min a zamraženy při 20 °C do doby analýzy, a to ne déle než 6 měsíců od odběru krve.

Hodnoty anti-CCP2 byly stanoveny na analyzátoru AxSYM v souladu s instrukcemi přístroje, výrobce metody ABBOTT Laboratories, USA, která byla vyvinuta v kooperaci s Axis-Shield Diagnostics. Metoda AxSYM[®] Xtra Anti-CCP je nekompetitivní enzymová imunoanalýza na mikročásticích (Microparticle Enzyme Immunoassay: MEIA) ke kvantitativnímu stanovení protilátek IgG třídy specifických k cyklickému citrulinovanému peptidu (CCP) v lidském séru a plazmě. Výše signálu je přímo úměrná koncentraci anti-CCP protilátek přítomných v séru či plazmě. První nenulový kalibrátor (kalibrátor B) má hodnotu 5 U ml⁻¹, což je také doporučená referenční mez výrobcem.

Statistická analýza

Byla provedena s užitím software CRAN 2.4.0 a Statistica 98 Edition.

Pro měření parametry v celém souboru a v jednotlivých skupinách a podskupinách byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, roz-

ptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum, maximum a vybrané kvantily. Vybrané statistické údaje byly též zpracovány graficky do tzv. Box & Whisker plot diagramů a diagramu rozptylu hodnot. Na porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách a podskupinách, vzhledem k distribucím těchto proměnných, byl použit neparametrický Mediánový test a to dvouvýběrová varianta. Pro zjištění závislosti zkoumaných znaků, vzhledem k negaussovskému rozdělení těchto proměnných, byl použit Spearmanův koeficient korelace. Pomocí určení diagnostických specifit a diagnostických senzitivit dané metody jsme stanovovali rozhodovací meze (cut off) mezi skupinami a podskupinami pro danou metodu a tyto výsledky byly graficky zpracovány v operační charakteristice modelu (ROC křivka), která popisuje diskriminační schopnost testu, vztah mezi diagnostickou senzitivitou a nespecifitou.

Plocha pod křivkou (Area under the curve – AUC) vztahená k maximu, tj. 1,000, udává míru diagnostické kvality testu.

Diagnostická senzitivita je definována jako % správně pozitivních výsledků ze všech výsledků skupiny pacientů majících hledanou chorobu (RA).

Diagnostická specifita je definována jako % správně negativních výsledků ze všech výsledků skupiny pacientů nemajících chorobu (kontroly)⁶.

Výsledky

Opakovatelnost stanovení v rámci jedné výrobní šarže

V následující tabulce II jsou sumarizovány výsledky testování opakovatelnosti stanovení dle protokolu popsáném v metodice.

Jak kontrola dodaná výrobcem, tak pozitivní pacientský vzorek vykazují velmi dobrou „day-to-day“ opakovatelnost, a to s průměrným CV 5,0 % (pozitivní kontrolní vzorek výrobce) a 5,3 % (pozitivní vzorek pacienta).

Tabulka II
Opakovatelnost stanovení v rámci jedné výrobní šarže

	Opakovatelnost měření		
	počet měření	pozitivní kontrola soupravy ^a [U ml ⁻¹]	pozitivní pacient ^b [U ml ⁻¹]
Průměr	20	23,5	68,4
SD	1,3	1,3	3,4
CV %	5,3	5,3	5,0

^a Pozitivní kontrola soupravy dodaná výrobcem – umělá matrice vzorku, ^b pozitivní pacient – přirozená matrice (sérum)

Mez detekce

Mez detekce byla stanovena podle protokolu uvedeného v metodice. Tabulka III sumarizuje výsledky čtyř nezávislých měření. Zjištěná průměrná mez detekce činí $0,84 \text{ U ml}^{-1}$.

Stanovení referenčních mezí

Ke stanovení referenčních mezí pro zdravou populaci bylo užito 105 vzorků od dárců krve (kontroly) z Transfúzního oddělení Klatovské nemocnice a.s., kteří měli negativní rodinnou i osobní anamnézu ve smyslu revmatoidní artritidy, systémových autoimunitních onemocnění (systémový lupus erythematoses, tyreoiditida, coeliakie, diabetes mellitus I. typu). Základní statistický popis je sumarizován v tab. IV.

Ve vyšetřeném souboru jsme nenalezli rozdíl v hodnotách anti-CCP protilátek dle pohlaví (neparametrický ANOVA test) ani dle věku (Spearman rank correlation).

Rozhodovací mez má při 95% kvantilu hodnotu $2,0 \text{ U ml}^{-1}$ a při 99% kvantilu hodnotu $3,4 \text{ U ml}^{-1}$ (obr. 1).

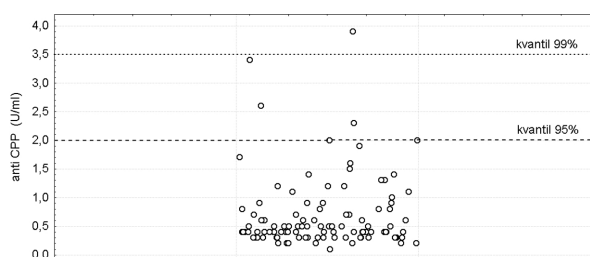
Soubor pacientů

Základní statistický popis všech porovnávaných skupin (RA – revmatoidní artritida, NONRA – smíšená onemocnění pojiva, artritidy, lumbalgie atd. a Kontroly – skupina zdravých dárců krve, viz výše) je shrnuta v tab. V.

Tabulka III
Mez detekce

	Průměrný signál	SD	%CV	Mez detekce [U ml^{-1}]
<i>Měření 1</i>				
Kalibrátor A	14,94	4,21	28,2	1,04
Kalibrátor B	55,4	0,13	0,2	1,04
<i>Měření 2</i>				
Kalibrátor A	12,43	3,81	30,6	0,92
Kalibrátor B	53,6	2,35	4,4	0,92
<i>Měření 3</i>				
Kalibrátor A	14,24	2,99	21,0	0,75
Kalibrátor B	54,15	0,45	0,8	0,75
<i>Měření 4</i>				
Kalibrátor A	14,5	2,85	19,6	0,66
Kalibrátor B	55,77	6,7	11,6	0,66

Pozn.: Tabulka III udává variabilitu stanovení prvních dvou kalibrátorů a odečtenou mez detekce z kalibrační křivky



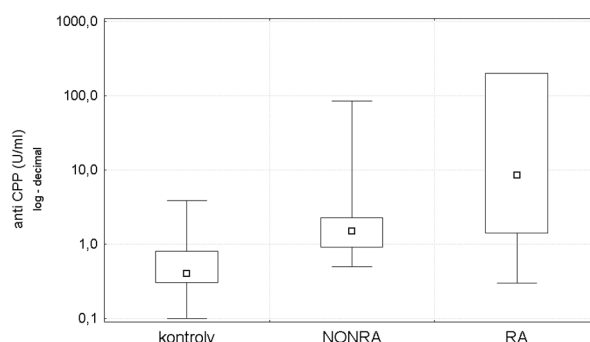
Obr. 1. Diagram rozptylu distribuce hodnot anti-CCP u skupiny kontroly; jsou vymezeny 95. a 99. kvantily hodnot

Nejvyšších výsledků anti-CCP dosahuje skupina RA. Mezi všemi skupinami existují statisticky významné rozdíly v distribucích hodnot anti-CCP protilátek s $P < 0,0001$ (mediánový neparametrický test), (viz obr. 2) v logaritmickém rozložení osy Y.

Ke zhodnocení klinické výpovědní hodnoty testu byla provedena analýza pomocí ROC křivky. Jako kontrolní skupina byla užita skupina dárců krve (kontroly). Na ose X je vynesena diagnostická nespecificita (1-Specificita) a na ose Y se nalézají příslušné hodnoty diagnostické senzitivity (obr. 3).

Hodnota AUC odečtená z ROC křivky pro anti-CCP je 0,926, což svědčí o velmi dobré klinické výpovědní hodnotě. Z naší sestavy mělo 8 pacientů diagnózu časné revmatoidní artritidy (tj. do 3 let trvání příznaků), ale pouze 2 z nich měli hodnotu vyšší než $2,0 \text{ U ml}^{-1}$, ale nepřekročili hodnotu $3,4 \text{ U ml}^{-1}$ (99. percentil referenční skupiny).

V tabulce VI jsou shrnuty rozhodovací meze a senzitivity při různé hladině specifity mezi skupinou pacientů s revmatoidní artritidou (RA) a kontrolní (kontroly).



Obr. 2. Krabicové diagramy distribucí anti-CCP hodnot dle sledovaných skupin; logaritmičticky znárodněné box ploty mediánu, 25. a 75. kvantilu a minimální a maximální naměřené hodnoty v jednotlivých skupinách. Rozdíly mezi skupinami jsou statisticky významné s $P < 0,0001$ (neparametrický mediánový test); \lceil max min, \square 75 % 25 %, \square median

Tabulka IV
Základní statistický popis skupiny kontroly dle pohlaví

		Počet	Průměr	SD	Medián	Minimum	Maximum
Muži	anti-CCP, U ml ⁻¹	54	0,64	0,52	0,5	0,2	2,6
Muži	věk, roky	54	41,4	11,5	42,5	24	62
Ženy	anti-CCP, U ml ⁻¹	51	0,74	0,74	0,4	0,1	3,9
Ženy	věk, roky	51	40,9	11,5	41	19	64

Tabulka V
Statistický popis sledovaných skupin pacientů

Skupina pacientů	Anti-CCP [U ml ⁻¹]					
	počet	průměr	SD	medián	minimum	maximum
RA	95	66,67	85,2	8,6	0,3	200,0
NONRA	71	3,75	11,2	0,5	1,5	84,8
Kontroly	105	0,69	0,64	0,4	0,1	3,9

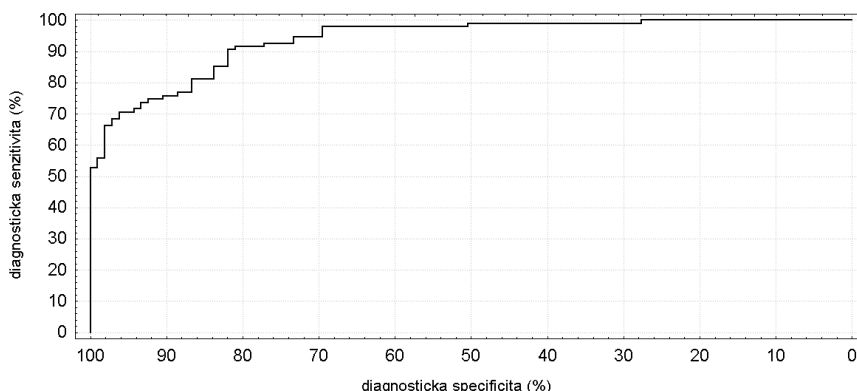
Pozn.: Průměrné hodnoty, medián, SD, %CV, minimální a maximální hodnoty anti-CCP zjištěné v jednotlivých skupinách sledovaných pacientů RA (revmatoidní artritida), NONRA (systémové onemocnění pojiva či kloubů) a kontrolní skupině (kontroly)

Při nejnižší rozhodovací mezi jsme dosáhli uspokojivé diagnostické senzitivity 71 % při diagnostické specifitě 95 %. Při hodnotě referenční meze 5,0 U ml⁻¹ doporučené výrobcem je dosaženo významně nižší diagnostické senzitivity 53 %, ale 100% diagnostické specifity.

Tabulka VII naopak ukazuje procento pozitivních výsledků nad rozhodovací mez ve skupině se systémovými onemocněními pojiva a kloubů (NONRA). Při nejnižší rozhodovací mezi je tato pozitivita 34 %, při rozhodovací mezi 5,0 U ml⁻¹ 4,2 % (pouze 3 pacienti). Jednalo se o pacienty s diagnózami systémová vaskulitida (anti-CCP = 40,9 U ml⁻¹),

spondylartritida (anti-CCP = 24,4 U ml⁻¹) a osteoartróza (anti-CCP = 84,8 U ml⁻¹). U posledně jmenované diagnózy s hodnotou anti-CCP 84,8 U ml⁻¹ došlo k následnému překlasifikování diagnózy a to na revmatoidní artritidu a také k úpravě léčby, tím pak klesá procento falešné pozitivivity na 2,9 %.

Podrobněji jsme proto analyzovali pacienty s hodnotami anti-CCP protilátek v rozmezí 2,0–4,9 U ml⁻¹. Ve skupině se vyskytlo 21 pacientů ze skupiny NONRA, 17 ze skupiny RA a 6 z kontrolní skupiny, tj. výsledky v tomto rozmezí zahrnují zhruba v 50 % pacienty bez rev-



Obr. 3. Operační charakteristika (křivka ROC) zjištěná metodou AxSYM® Xtra Anti-CCP pro skupinu pacientů s revmatoidní artritidou

Tabulka VI

Diagnostická senzitivita metody anti-CCP u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) při různých diagnostické specifitě

Diagnostická specifita [%]	Rozhodovací mez ^a [U ml ⁻¹]	Diagnostická senzitivita [%]
95	2,0	70,5
99	3,4	55,8
100	5,0	52,6

^a Hodnota rozhodovací meze byla určena na hladinách 95., 99. a 100. kvantilu skupiny Kontroly

Tabulka VII

Procentuelní (falešná) pozitivita u skupiny NONRA při různých hodnotách specifity a tomu odpovídajících rozhodovacích mezích. Referenční skupinu tvoří dobrovolní dárce krve (Kontroly)

Diagnostická specifita [%]	Rozhodovací mez [U ml ⁻¹]	% pozitivních hodnot nad rozhodovací mez
95	2,0	33,8
99	3,4	14,1
100	5,0	4,2

matoidní artritidy, 40 % tvoří pacienti s revmatoidní artritidou a zbývajících 10 % zdravé osoby. Hodnotu nad 5,0 neměli žádní dobrovolníci z kontrolní skupiny a pouze 3 pacienti ze skupiny NONRA.

Pokud tedy zvolíme rozhodovací mez na úrovni 5,0 U ml⁻¹, tj. doporučenou výrobcem a odpovídající hodnotě prvního nenulového kalibrátoru, klesá diagnostická senzitivita pro skupinu RA na 53 % při 100% diagnostické specifitě vůči zdravým, ale při 97% diagnostické specifitě vůči skupině NONRA.

Diskuse

Metoda vykazuje a splňuje požadavky jak na dobrou opakovatelnost, tak na dostatečnou mez detekce. Mez detekce je sice nezbytným sledovaným znakem, ale v tomto případě nemá žádný zásadní klinicko-diagnostický význam, rozhodovací meze pro klinickou interpretaci jsou pět až sedmkrát vyšší.

Zjištěné diagnostické sensitivity a specifity jsou odpovídající nálezům některých autorů. Autoři Fernández a spol.⁷ dosáhli diagnostické sensitivity na úrovni 52,8 % při diagnostické specifitě 100 % na ELISA soupravě Axis-Shield Diagnostics, Ltd, UK. Jednalo se však o paci-

enty s časnou revmatoidní artritidou, referenční mez byla 7,2 U ml⁻¹. V celé řadě dalších publikací jsou uváděny diagnostické sensitivity v rozmezí 39–94 %, medián 68,5 % při diagnostické specifitě udávané v rozmezí 81 až 100 %, medián 97 % (cit.²). Rozhodujícím faktem, který toto ovlivňuje, je tedy volba referenční meze, či hladiny diagnostické specifity. Lze však říci, že metoda AxSYM[®] Xtra Anti-CCP poskytuje srovnatelné výsledky diagnostické sensitivity, tak specifity s ostatními detekčními systémy⁷, při 95% diagnostické specifitě dosahuje diagnostická senzitivita hodnoty 70,5 %.

Významným faktem je však vysoká diagnostická specifita testu jak vzhledem k souboru kontroly, tak i vůči souboru RA – pacientům se systémovými onemocněními pojiva či polyartritidami, což je rovněž v souladu s již publikovanými pracemi^{2,7-9}. Falešná pozitivita ve skupině NONRA vedla v jednom případě k překlasifikování choroby na revmatoidní artritidu a nejednalo se tedy o falešnou pozitivitu, zbývajících 2 případy však odpovídají publikovaným pracím ostatních autorů, kdy se nalézá minimální četnost pozitivních výsledků u ostatních chorob pojiva jako jsou vaskulitidy, systémový lupus erytematoses, polyartriditidy^{2,8,9}.

Určení hladiny diagnostické specifity a té odpovídající referenční meze je rozhodujícím faktorem ovlivňujícím diagnostickou senzitivitu. Pokud porovnáme výsledky různých metod o stejné diagnostické specifitě a kontrolní skupině, získáme prakticky shodné výsledky. U metody anti-CCP je zřejmé, že při 95% diagnostické specifitě budeme mít dobrou diagnostickou senzitivitu cca 70 %, ale stále 30 % pacientů bude mít negativní výsledek anti-CCP i přes jasné klinické známky revmatoidní artritidy. Důvod této negativity není jasný. Některé práce naznačují, že kloubní infiltráty se liší v zastoupení lymfocytů a typu autoimunitní odpovědi v infiltrátu¹⁰ a také je popsána větší aktivita onemocnění u anti-CCP pozitivních pacientů¹¹ či větší tendence k progresi¹².

Závěr

Metoda AxSYM[®] Xtra Anti-CCP splňuje běžné analytické parametry a poskytuje automatizované stanovení anti-CCP protilátek po jednotlivých vzorcích.

Má vysokou diagnostickou specifitu a senzitivitu, která se neliší od literárních údajů jiných výrobců.

Na základě námi zjištěných výsledků navrhujeme použít jako základní rozhodovací mez pro metodu AxSYM[®] Xtra Anti-CCP hodnotu 5,0 U ml⁻¹, čímž máme zaručenou vysokou diagnostickou specifitu (100 % kontrolní skupina a 97 % ostatní onemocnění pojiva a kloubů) a diagnostickou senzitivitu 53 %. Na druhé straně hodnoty AxSYM[®] Xtra Anti-CCP mezi 2,0–5,0 představují zhruba 40% riziko přítomnosti revmatoidní artritidy a představují určitou šedou zónu, kdy je vhodné výsledek opakovat s časovým odstupem několika týdnů.

Použité zkratky

Anti-CCP	protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu
%CV	variační koeficient v %
Kontroly	skupina zdravých dobrovolníků – dárci krve
NONRA	skupina pacientů systémovými onemocněními pojiva či kloubů
RA	skupina pacientů s potvrzenou diagnózou revmatoidní artritidy
SD	směrodatná odchylka

Práce vznikla za podpory firmy Abbott Laboratories, která poskytla diagnostické soupravy k testování vzorků.

LITERATURA

- Schellekens G. A., de Jong B. A., van den Hoogen F. H., van de Putte L. B., van Venrooij W. J.: *J. Clin. Invest.* 101, 273 (1998).
- Avouac J., Gossec L., Dougados M.: *Ann. Rheum. Dis.* 65, 845 (2006).
- van Gaalen F. A., Linn-Rasker S. P., van Venrooij W. J., de Jong B. A., Breedveld F. C., Verweij C. L.: *Arthritis & Rheumatism* 50, 709 (2004).
- Kastbom A., Strandberg G., Lindroos A., Skogh T.: *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1085 (2004).
- Arnett F. C., Edworthy S. M., Bloch D. A., McShane D. J., Fries J. F., Cooper N. S., Healey L. A., Kaplan S. R., Liang M. H., Luthra H. S.: *Arthritis Rheum.* 31, 315 (1988).
- Racek J.: *Klinická biochemie*, kap. 4. Galén, Praha 2006.
- Fernandez-Suarez A., Reneses S., Wichmann I., Criado R., Núñez A.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, 1234 (2005).
- Schur P. H.: *Int. J. Adv. Rheumatol.* 3, 77 (2005).
- Lee D. M., Schul P. H.: *Ann. Rheum. Dis.* 62, 70 (2003).
- van Oosterhout M., Bajema I., Levarht E. W., Toes R. E., Huizinga T. W., van Laar J. M.: *Arthritis Rheum.* 58, 53 (2007).
- del Val del Amo N., Ibanez Bosch R., Fito Manteca C., Gutierrez Polo R., Loza Cortina E.: *Clin. Exp. Rheumatol.* 24, 281 (2006).
- Meyer O., Nicaise-Roland P., Santos M. D., Labarre C., Dougados M., Goupille P., Cantagrel A., Sibilia J., Combe B.: *Arthritis Res. Ther.* 8, 1186 (2006).

R. Pikner^a, D. Suchý^b, J. Zítková^a, H. Brabcová^b, M. Beranová^a, and S. Kormunda^c (^aDepartment of Clinical Laboratories, Hospital, Klatovy, ^bDepartment of Clinical Pharmacology, University Hospital, Plzeň, ^cDepartment of Social Medicine, Faculty of Medicine, Charles University, Plzeň): **Automated Determination of Citrullinated Cyclic Peptide Antibodies on AxSYM Analyser**

The aim of the study was to verify reproducibility, limit of detection, reference limits and diagnostic value of a new antiCCP2 method – AxSYM[®] Xtra Anti-CCP as a marker of rheumatoid arthritis. Reference limits were verified on a group of 105 volunteers. Diagnostic performance was assessed in a group of 95 patients with rheumatoid arthritis and 75 patients with systemic connective tissue diseases or polyarthritis. The AxSYM[®] Xtra Anti-CCP assay achieved the day-to-day reproducibility 5.0–5.3 %, the detection limit was 0.8 U ml⁻¹. The assay reached 71 % and 53 % diagnostic sensitivity at 95 % and 100 % diagnostic specificity with cut-off 2.0 U/ml and 5.0 U ml⁻¹, respectively. We found also 4.2 % of positive values in systemic connective tissue diseases above the cut-off 5.0 U ml⁻¹. The AxSYM[®] Xtra Anti-CCP assay provides automated random access measurement of anti-CCP antibodies with good analytical performance and diagnostic sensitivity and specificity comparable with other methods.

PŘESTUP POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ Z PŮDY DO VYBRANÝCH ROSTLIN

**RADIM VÁCHA, JARMILA ČECHMÁNKOVÁ,
MARKÉTA HAVELKOVÁ,
VIERA HORVÁTHOVÁ a JAN SKÁLA**

*Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy Praha, Žabovřeská 250, 156 27 Praha 5
vacha@vumop.cz*

Došlo 12.7.07, přepracováno 21.2.08, přijato 20.3.08.

Klíčová slova: polycyklické aromatické uhlovodíky, zemědělská půda, zátěž rostlin

Úvod

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) jsou skupinou látek se dvěma a více aromatickými jádry, která se řadí mezi perzistentní organické polutanty (POP). Tato skupina kontaminantů je již dlouhodobě sledována v různých složkách prostředí, včetně půdy. Doba setrvání různých skupin POP v prostředí se může výrazně lišit, a to i v rámci PAHs. Mnohé sloučeniny se v půdě samovolně rozkládají v rámci několika roků (naftalen, antracen), jiné sloučeniny, jako je např. benzo(ghi)perylen, jsou i v půdě relativně špatně rozložitelné¹, a to navzdory procesům degradace v půdním prostředí (mikrobiální činnost, fotolýza, hydrolyza atd.).

Zvýšené obsahy PAHs v zemědělských půdách mohou být jen těžko příčinou akutní otravy lidského organismu. To by ovšem nemělo vést k bagatelizaci rizik, spojených s event. projevy chronické toxicity při jejich dlouhodobé expozici. K prokázaným zdravotním poruchám patří zvýšená karcinogenita, mutagenita, teratogenita, genotoxicita, poruchy krvetvorby, zvýšení hladiny cholesterolu v krvi, poruchy reprodukce (estrogenní efekt) a další.

Sledování závažných POP v našich zemědělských půdách bylo zahájeno na počátku 90. let 20. století. Na základě zahraničních zkušeností byl akceptován výčet zdravotně závažných sloučenin ze skupiny POP, uvedený v tzv. „Holandském seznamu“, zahrnujícím i skupinu 13 PAHs a byl vypracován návrh kritických obsahů těchto sloučenin pro legislativu².

Díky dlouhodobému sledování zátěže našich zemědělských půd POP (cit.^{3–5}) bylo zjištěno, že v podmínkách ČR jsou závažné vstupy PAHs do půdy prostřednictvím:

- imisních spadů v oblastech zvýšeného výskytu průmyslu,
- zátěže ze spalování tuhých paliv v intravilánech,

- kontaminované vody v inundačních pásmech některých řek,
- aplikací kalů z čistíren odpadních vod (ČOV) na zemědělskou půdu.

Hodnocení zátěže prostředí POP se provádí zpravidla posouzením koncentrační úrovně dané látky ve zkoumaném médiu. Při hodnocení sumárních koncentrací skupiny látek (polycyklické aromatické uhlovodíky, PCDD/F) nebyl tento postup shledán dostatečným, vzhledem k rozdílným úrovním toxicity jednotlivých sloučenin. Proto byl zaveden princip tzv. ekvivalentů toxicity, který přiřazuje toxický ekvivalent jednotlivým sloučeninám. Toxické ekvivalenty byly odvozeny z humanotoxikologických studií, zohledňujících karcinogenní riziko. Sčítáním součinnů těchto ekvivalentů a koncentrací jednotlivých sloučenin je získána výsledná sumární hodnota, u PCDD/F udávaná jako mezinárodní toxický ekvivalent (I-TEQ PCDD/F), popř. nověji uváděný WHO-TEQ PCDD/F (cit.^{6,7}). Obdobně přístup se v současné době praktikuje i v oblasti zátěže PAHs, kde nejtoxičtějšími sloučeninami (toxický ekvivalent = 1) jsou benzo(a)pyren a dibenzo(a,h)antracen. Toxicita směsi se pak vyjadřuje jako suma toxických ekvivalentových faktorů (suma TEF).

Legislativně je v České republice problematika perzistentních organických polutantů v zemědělských půdách zapracována do vyhlášky 13/1994 Sb. Protože hodnoty koncentrací POP ve vyhlášce nebyly odvozeny z hodnot relevantních pro půdy ČR, nýbrž vznikly korekcí převzatých zahraničních hodnot, neprokázaly aktuální limitní hodnoty využitelnost pro hodnocení zátěže našich zemědělských půd. Z tohoto důvodu byly předloženy vědecky zdůvodnitelné limitní hodnoty obsahů POP v podobě tzv. preventivního limitu, který byl odvozen z vrchní hranice požadovaných hodnot koncentrací POP v našich zemědělských půdách². Tento návrh byl předložen k účelu novelizace vyhlášky 13/1994 Sb. (cit.⁸). Vyšší úroveň limitních hodnot, zaměřená na přestup POP ze zemědělských půd do potravního řetězce, není v současné době obecně k dispozici. K hodnocení vysokých zátěží se přistupuje prostřednictvím analýzy rizik, která je však odborně, časově a finančně náročná.

Vývoj vyšších stupňů limitních hodnot komplikuje určení perzistence PAHs v půdním prostředí, jejich degradace a přeměna na jiné sloučeniny. Z degradačních procesů se jako nejvýznamnější udává mikrobiální rozklad organických sloučenin v půdě.

Welp a Brümmer⁹ se pokusili chemickou analýzou při použití různých extrakčních činidel (směs acetonu a toluenu, tenzidy) definovat mikrobiálně odbouratelný podíl PAHs v půdě. K tomuto účelu využili pětiletý polní pokus, ve kterém sledovali samovolný úbytek PAHs v půdě, který pak srovnávali s obsahem PAHs v různých extraktech.

Sledování přestupu PAHs do rostlin je komplikováno dalšími faktory. Jiní autoři¹⁰ porovnávali atmosférické a biologické zdroje PAHs v rostlinách v tropickém prostředí a v případě naftalenu uvádějí výrazné rozdíly v obsahu ve vzduchu, půdě a rostlinách, kdy o několik řádů vyšší koncentrace byly nalezeny v rostlinných pletivech. Autoři

uvádějí hypotézu o biologických zdrojích PAHs v prostředí a přeměně složitějších sloučenin na jednodušší. Vznik PAHs v půdě při rozkladu fytohmoty dokládá také Thiele a Brümmer¹¹, zjištěn byl především vznik složitějších sloučenin se 4–6 aromatickými jádry.

Jednotlivé sloučeniny PAHs různých molekulových hmotností se podstatně liší ve svém chování a distribuci v prostředí. Nízkou přístupností PAHs s vyšší hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol/voda (K_{ow}) pro rostliny uvádí dále např. Brandt a spol.¹², u těchto sloučenin ovšem výrazně roste hodnota bioakumulace v tkáních živočichů (tukové tkáni). Také schopnost vázat se na půdní organickou hmotu (rozdělovací koeficient K_{oc}) je až o tři řády vyšší u složitějších PAHs s vyšším počtem aromatických jader, ve srovnání s jednoduššími PAHs (cit.¹³). Přesto však někteří autoři zjistili, že zvýšená zátěž rostlin složitějšími PAHs může být způsobena aplikací zatížených kalů ČOV do půd, navzdory vyššímu obsahu organické hmoty v těchto materiálech¹⁴.

Organické polutanty mohou vstupovat do rostlin několika způsoby, uvádí se¹⁵, že v případě PCDD/F je významnější absorpce polutantů obsažených v depozici povrchem rostlin, ve srovnání s kořenovým příjmem. Při vývoji matematického modelu predikce zátěže rostlin a půdy PCDD/F (cit.¹⁵) byla zohledněna pozadřová zátěž půdy, suchá a mokrá depozice a příjem kořeny. Uvedené transferové cesty je možno předpokládat i v případě PAHs. Holoubek¹³ specifikuje příjem PAHs vegetací následnými procesy:

- z půdního roztoku kořenem (závisí na vodním režimu rostliny a obsahu lipidických složek v kořenu, umožňujících snadnější sorpci do vnitřních pletiv),
- absorpcí PAHs na povrch kořene,
- foliární příjem látek odpařených z půdního povrchu,
- absorpcí PAHs na listovou plochu,
- některé PAHs jsou syntetizovány přímo rostlinami.

Hodnocení obsahu PAHs ve vzorcích plodin je vzhledem k hygienickým normám problematické, a to z důvodu absence limitních hodnot pro PAHs v naší legislativě. V rámci EU byl zaveden limit pro obsah benzo(a)pyrenu v některých potravinách (nařízení 208/2005/ES). Pro obsah této sloučeniny v tucích a olejích pro přímou spotřebu je stanoven limit 0,002 mg kg⁻¹, limit pro dětskou výživu

je 0,001 mg kg⁻¹. Vyhláška MZd ČR (cit.¹⁶) č. 305/2004 Sb., stanoví nejvyšší přípustné koncentrace pro výčet 9 PAHs v jedlých olejích, kdy nejvyšší přípustné množství pro jednotlivé sloučeniny je 0,002 mg kg⁻¹.

Účelem našeho sledování bylo posoudit, do jaké míry se zvýšená zátěž půd PAHs může projevit na zátěži pěstovaných rostlin. K tomuto účelu jsme vybrali půdy, kontaminované PAHs v terénních podmínkách, a to především z hlediska zachování reálných podmínek půdních vlastností a udržení rovnovážného stavu při dlouhodobé kontaminaci půd. Snahou bylo podchytit takovou úroveň zátěže zemědělských půd PAHs, kterou lze v podmínkách ČR považovat za výrazně zvýšenou. Protože setrvání a osud PAHs v prostředí je výrazně ovlivněn mikrobiální činností půd^{9,17}, věnovali jsme pozornost i těmto parametrům. Jejich hodnocení však není předmětem prezentovaného článku a této problematice bude věnována samostatná pozornost.

Experimentální část

Sledování PAHs v půdě a rostlinách bylo realizováno prostřednictvím tří experimentů, nádobového pokusu, polního mikroparcelkového pokusu a laboratorního extrakčního kolonového pokusu.

Nádobový pokus

Na základě šetření v terénu byla vybrána experimentální zemina (fluvizem modální – FLm) se zvýšenou zátěží PAHs, kontaminovaná prostřednictvím inundací (periodické záplavy, povodně). Jako další zdroj zvýšených obsahů PAHs byly použity kaly z čistíren odpadních vod (ČOV) se zvýšenou zátěží PAHs. Jejich smícháním se zeminou (kambizem modální – KAm) v hmotnostním poměru 1:1, byla simulována zvýšená zátěž zemědělské půdy POP, po aplikaci kalů ČOV. K zatíženým variantám byla vybrána jako kontrolní varianta nezatížená zemina (kambizem arenická – KAa), jejíž pedologické vlastnosti (pH, zrnitost, C_{org} , půdotvorný substrát) byly srovnatelné se zeminou kontaminovanou inundacemi (fluvizem modální – FLm). Charakteristiky uvedených zemín a obsahy PAHs jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I
Charakteristika pokusných zemín

Zemina	Zrnitost	Půdotvorný substrát použitá zemina	Σ PAHs [mg kg ⁻¹]	Σ TEF PAHs [mg kg ⁻¹]
Fluvizem modální – Karviná, zátěž PAHs z inundací	3	aluviální bezkarbonátové říční sedimenty	21,05 (+/- 1,39)	2,462 (+/- 0,20)
Kambizem modální (+ kal ČOV Třinec), zátěž PAHs aplikací kalů ČOV	3	ruly a granulity	24,59 (+/- 1,21)	6,22 (+/- 0,51)
Kambizem arenická kontrola, bez zvýšené zátěže PAHs	2	štěrkopísky teras	0,45 (+/- 0,08)	0,06 (+/- 0,02)

K založení pokusu byly použity experimentální smaltované Mitscherlichovy nádoby, které byly naplněny 6 kg přesáté zeminy (síta 2 mm). Přesátá zemina byla před zapravením do jednotlivých nádob homogenizována v celém objemu důkladným promícháním. Nádoby byly umístěny na podstavci ve volném terénu bez zastřešení. Pokus byl založen ve čtyřech opakováních. Půdní reakce byla vápenním upravena na hodnotu pH 6,5 (dolomitický vápenec, Ca a Mg ve formě CaCO_3 a MgCO_3) a bylo provedeno základní hnojení makroprvky N, P a K. Po uplynutí 20 dnů od založení pokusu byla zemina v nádobách opět homogenizována promícháním a byly odebrány vzorky zemin k analýze PAHs. Z každé homogenizované nádoby byl odebrán jeden vzorek ze středu nádoby (cca 200 g zeminy). Následně byl pokus oset ředkvičkou setou (*Raphanus sativus* v. *radicula*), odrůda „Duo“.

Po sklizni rostlin (září 2005) byla zemina v nádobách opět homogenizována promícháním, byly odstraněny zbytky rostlin a odebrány vzorky zemin (z každé nádoby jeden vzorek ze středu nádoby). Popis analýzy vybraných půdních vlastností (obsah a kvalita organické hmoty) je uveden níže. Na jaře roku 2006 byl pokus oset mrkví setou (*Daucus carota*). Na podzim roku 2006 byly identickým způsobem odebrány vzorky rostlin a zemin k analýze PAHs.

Oseté nádoby byly pravidelně zalévány konstantním množstvím pitné vody (500 ml), a to v závislosti na klimatických podmínkách, zpravidla 1× za 48 hodin. Pokus byl pravidelně udržován (pletí, jednocení vysazených rostlin). Sklizené ředkvičky byly analyzovány ve formě hypokotyly myté („bulvy“ ředkviček), chrást mytá a chrást nemytá. Mytí rostlin bylo provedeno v laboratorních podmínkách za použití demineralizované vody. V případě mrkve byl použit k analýze očištěný a omytý kořen, ten byl rozdělen na dvě části, střední válec (obsahující svazky cévní) a primární kůru.

Polní mikroparcelkový pokus

Polní pokus se nachází v oblasti Českomoravské vysočiny (okres Jihlava), založen byl na pozemku s půdním typem kambizem modální (varieta kyselá, podloží ruly). Protože půda pokusu není sledovanými sloučeninami extrémně zatížena, byly použity testované kaly ČOV (Praha-Podbaba, Třinec), které byly zapraveny v množství 50 kg m^{-2} , a to dne 3.8.2005. Pokus byl založen formou mikroparcelky ($2 \times 1 \text{ m}$) ve čtyřech opakováních a oset byl v obou letech hořčicí bílou (*Sinapis alba*). Při sklizni pokusu byly odebrány vzorky zemin (z hloubky humusového horizontu 5–15 cm) a rostlin (směsný vzorek z 10 dílčích odběrů z každé mikroparcelky u zemin i rostlin) k analýze PAHs, rostliny byly analyzovány ve formě listy myté a nemyté v prvním roce pokusu a listy myté ve druhém roce pokusu.

Laboratorní kolonový extrakční pokus

V průběhu roku 2006 byl realizován laboratorní kolonový extrakční pokus, určený ke sledování přestupu poly-

cyklických aromatických uhlovodíků (PAHs) z půdy do roztoku. Pokus byl založen v novodurových kolonách s vypustním ventilem, dno kolony je opatřeno 0,2 mm sítkem. Kolony byly plněny 100 g pokusné přesáté zeminy, odebrané z nádobového pokusu. Zemina byla v kolonách nasycena demineralizovanou vodou na hodnotu plně vodní kapacity a následně byla vystavena po dobu 24 hodin působení 200 ml roztoku ve třech opakováních následovně:

- demineralizovaná H_2O ,
- demineralizovaná H_2O okyselená H_2SO_4 na hodnotu pH 3,
- 0,2% roztok tenzidu – laurylsíranu sodného ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) rozpuštěného v demineralizované H_2O .

Tenzid byl použit na základě práce německých autorů¹⁸, kteří definovali množství PAHs extrahované z půdy 0,2% roztokem tenzidu jako část obsahu PAHs v půdě, biologicky dostupného půdním mikroorganismům. V laboratoři Aquatest Praha a.s. byl proveden srovnávací pokus s certifikovaným materiálem (sediment), výrazně zatíženým PAHs, kde byla sledována výtěžnost PAHs při extrakci vodou, 0,2% a 4% a roztokem uvedeného tenzidu. Na základě výsledků tohoto porovnávacího experimentu byl zvolen postup extrakce v kolonovém pokusu. Extrakce probíhala posloupně tak, že nejdříve bylo použito nejslabší extrakční činidlo (demineralizovaná voda), následovala extrakce stejného vzorku demineralizovanou vodou s upraveným pH a v konečné fázi byl vzorek podroben extrakci nejsilnějším činidlem (0,2% roztok tenzidu).

Získaný extrakt byl následně centrifugován při 2500 ot min^{-1} , z důvodu oddělení koloidní fáze od roztoku. Holoubek¹³ udává, že většinový podíl PAHs ve vodném prostředí je vázán na koloidní částice, pouze 33 % PAHs je rozpuštěno ve vodě. Získaný roztok byl použit k vlastní analýze PAHs.

Výsledky všech experimentů byly zpracovány při použití základních statistických metod v programu Excel (aritmetický průměr, geometrický průměr, medián, směrodatná odchylka, interval spolehlivosti, analýza rozptylu).

Analýza PAHs

Vlastní laboratorní stanovení obsahu PAHs v zeminách, rostlinách a roztoku byla provedena v akreditovaných laboratořích Aquatest a.s.

Analýza pevných vzorků (zemina, rostlina) zahrnuje jejich vysušení bezvodým síranem sodným, následuje extrakce v roztoku acetonu. Extrakt je následně bez čištění analyzován. PAHs jsou stanoveny vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s fluorescenční detekcí (mobilní fáze – acetonitril/voda) a to tak, že část PAHs je stanovena za isokratické eluce při neměnných vlnových délkách na jednom přístroji, zbývající podíl PAHs je stanoven opět za isokratické eluce při neměnných vlnových délkách na druhém přístroji. Přitom součástí jedné přístrojové sestavy jsou dva detektory v sérii, takže k detekci jsou použity dvě rozdílné vlnové délky (změna jejich nastavení

Tabulka II
Přehled sloučenin k výpočtu sumy toxických ekvivalentových faktorů PAHs

Sloučenina	Hodnota toxického ekvivalentu
Benzo(a)pyren	1
Benzo(a)antracen	0,1
Benzo(b)fluoranten	0,1
Benzo(k)fluoranten	0,01
Dibenzo(a,h)antracen	1
Indeno(1,2,3-cd)pyren	0,1

tak neprobíhá během analýzy). Tento postup zajišťuje minimalizaci obtíží s gradientovou elucí a se změnami nastavení vlnových délek během analýzy při dělení nečistých vzorků.

Ke sledování zátěže půd a rostlin PAHs byly použity hodnoty koncentrací jednotlivých sloučenin, dále hodnoty sumy všech sloučenin (suma PAHs), hodnoty sumy sloučenin PAHs se 2–3 aromatickými jádry a 4–6 aromatickými jádry. Z důvodu rozdílných toxikologických vlastností jednotlivých sloučenin PAHs¹³, pak také hodnoty sumy toxických ekvivalentových faktorů (suma TEF PAHs), počítaných jako součet násobků koncentrací s hodnotou toxického ekvivalentu karcinogenních sloučenin. Jejich seznam a hodnoty toxických ekvivalentů jsou uvedeny v tab. II.

Analýza obsahu a kvality půdní organické hmoty

Uvádíme popis stanovených půdních vlastností v centrálních laboratořích VÚMOP v.v.i.

C_{org} – organický (oxidovatelný) uhlík. Udává obsah uhlíku v primární organické půdní hmotě. Může být využit k výpočtu obsahu humusu ($1,72 \times C_{org}$). Metoda stanovení je založena na principu oxidace organického uhlíku kyselinou chromovou za nadbytku kyseliny sírové (kyselinou chromsírovou) při zvýšené teplotě. Nespotebovaná kyselina chromová se stanoví jodometricky. Akreditovaná metoda (SOP 4/02) je modifikovanou normou ISO 14235.

Stanovení silně a slabě poutaných humusových látek, zahrnuje stanovení uhlíku huminových kyselin (C-HK), stanovení uhlíku fulvokyselin (C-HF), stanovení uhlíku humusových látek (C-HK + C-HF) a stanovení barevného kvocientu Q4/6, indikujícího kvalitu humusu. Metoda stanovení¹⁹ je založena na extrakci vzorku směsným roztokem, obsahujícím pyrofosforečnan sodný a hydroxid sodný, obsahy uhlíku uvedených látek se stanoví titračně, hodnota Q4/6 fotometricky.

C_{ws} – vodorozpustný uhlík, indikující kvalitu primární organické hmoty (biopřístupný uhlík pro půdní mikroorganismy) je laboratorně stanoven²⁰ po hodinové extrakci vzorku 0,01 M roztokem $CaCl_2$ (1:5 w/V), vlastní stanovení oxidovatelného uhlíku v odparku filtrátu prostřednictvím zahřívání s chromsírovou kyselinou a titrací Mohrovou solí.

C_{hws} – uhlík rozpustný v horké vodě, účel stanovení obdobný jako v případě vodorozpustného uhlíku. Stanoví se²¹ po 1 hodinovém varu půdního vzorku 0,01 M $CaCl_2$ (1:5 w/V), vlastní stanovení oxidovatelného uhlíku v odparku filtrátu prostřednictvím zahřívání s chromsírovou kyselinou a titrací Mohrovou solí.

Výsledky a diskuse

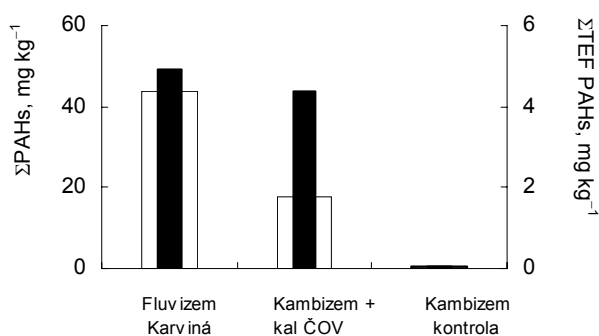
V tabulce III jsou uvedeny pro zeminy nádobového pokusu hodnoty obsahu huminových kyselin (C-HK), fulvokyselin (C-FK), jejich vzájemný poměr (HK:FK), celkový obsah humusových látek (C-HL), hodnoty barevného kvocientu Q4/6 a obsah uhlíku, stanovený jako uhlík organický (C_{org}), uhlík rozpustný ve vodě (C_{ws}) a uhlík rozpustný v horké vodě (C_{hws}).

Nejvyšší hodnoty obsahu C_{org} byly detegovány v zemině, smíchané s kalem Třinec, zatížená varianta Karviná dosahuje téměř stejné hodnoty obsahu C_{org} jako kontrolní varianta Mělník.

Obsahy uhlíku rozpustného v horké vodě (C_{hws}) vyjadřují aktivní organický uhlík v rozložitelné primární organické hmotě. Jeho nejvyšší hodnota byla zjištěna na variantě s kalem Třinec (1944 mg kg⁻¹), řádově nižší hodnotu vykazuje kontrolní varianta Mělník, nejnižší pak Karviná. Podobné poměry hodnot nalézáme i v případě uhlíku vodorozpustného (C_{ws}). Obsah celkových humusových látek

Tabulka III
Ukazatele obsahu a kvality organické hmoty v pokusných zeminách

Zemina	C-HK [pyro %]	C-FK [pyro %]	HK : FK	C-HL [pyro %]	Q4/6 [pyro]	C_{org} [%]	C_{ws} [mg kg ⁻¹]	C_{hws} [mg kg ⁻¹]
FLm – Karviná	0,06	0,07	1:1	0,13	4,3	1,6	34	175
KAm (+ kal ČOV Třinec)	0,83	0,5	1:0,6	1,33	2,7	5,23	204	1944
KAa – Mělník (kontrola)	0,33	0,2	1:0,6	0,53	2,3	1,66	89	489



Obr. 1. Obsahy sumy PAHs a sumy toxických ekvivalentových faktorů PAHs v zeminách nádobového pokusu; □ ΣPAHs, ■ ΣTEF

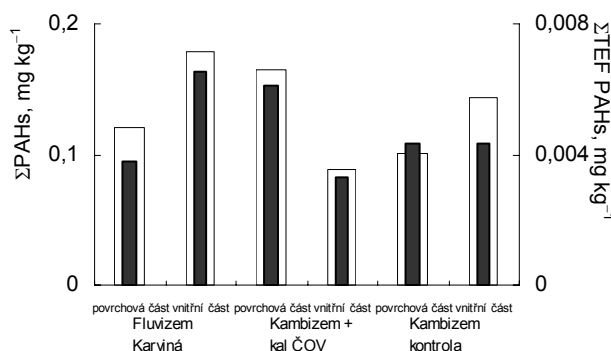
je pak opět nejvyšší na variantě s kalem Třinec, nejnižší ve fluvizemi Karviná. Kvalita humusových látek, odvozená z poměru huminových kyselin a fulvokyselin, je stejná na variantě s kalem Třinec a kontrolní variantě Mělník, kde byla zjištěna převaha huminových kyselin, ve fluvizemi Karviná je poměr těchto látek vyrovnaný. Hodnoty barevného koeficientu Q4/6 potvrzují nejnižší kvalitu humusu ve fluvizemi Karviná a srovnatelnou kvalitu humusu na variantě s kalem Třinec a kontrolní variantě Mělník.

Obsahy sumy PAHs v zatížených zeminách nádobového pokusu v prvním roce se pohybovaly v koncentracích od 21 do 24,6 mg kg⁻¹ s tím, že obsahy byly na zatížených variantách Karviná a Třinec srovnatelné, byly však zjištěny statisticky významné rozdíly v obsahu před zahájením a po ukončení vegetace. V zrnitostně lehké fluvizemi s nízkým obsahem organické hmoty byly zjištěny vyšší obsahy PAHs, v rámci uvedeného intervalu hodnot, po ukončení vegetace, což může souviset s uváděným vznikem PAHs při rozkladu fytomasy¹¹. V zemině s kalem Třinec byly naopak po ukončení vegetace celkové obsahy PAHs nižší. Zde je ovšem třeba brát v úvahu i existující heterogenitu, dokonale rovnoměrné promíchání kalu se zeminou není reálné. Odpovídající trend vykázaly i hodnoty sumy TEF PAHs, blíže vztažené k míře karcinogenního rizika. V následujícím roce byly odebrány vzorky zemin pouze po ukončení vegetace a byl zjištěn opět nárůst obsahu sumy PAHs na variantě Karviná na hodnotu více než 40 mg kg⁻¹, zatímco na variantě s kalem Třinec mírně poklesly obsahy sumy PAHs na hodnotu 18 mg kg⁻¹. Srovnatelné hodnoty TEF PAHs na těchto variantách dávají předpoklad rychlejšího poklesu obsahů jednodušších a méně karcinogenních PAHs na variantě s kalem Třinec a potvrzují vyšší perzistenci složitějších, tedy vícejaderných PAHs v půdě. Obsahy PAHs v zemině kontrolní varianty Mělník se pohybovaly pod svrchní hranicí požadových hodnot (1 mg kg⁻¹) v intervalu hodnot 0,4–0,6 mg kg⁻¹, byl zjištěn trend mírného nárůstu hodnot PAHs po ukonče-

ní vegetace.

Na obr. 1 jsou uvedeny obsahy sumy PAHs a sumy TEF PAHs (suma toxických ekvivalentových faktorů) v zeminách nádobového pokusu po ukončení druhého vegetačního období (aritmetický průměr ze čtyř opakování). Při srovnání sumy TEF PAHs v zeminách je zřetelný výrazně nižší rozdíl mezi hodnotami na variantě Karviná a Třinec ve srovnání se sumou PAHs, z toho vyplývá vyšší zastoupení karcinogenních sloučenin PAHs na variantě s kalem Třinec.

Při srovnání obsahu sumy PAHs v rostlinách ředkvičky, pěstované v prvním roce, byl zjištěn nárůst koncentrace PAHs v nemytém chrástu zatížené fluvizemě Karviná, ve srovnání s kambizemí s kalem Třinec a především ve srovnání s nezatíženou kontrolní variantou. Po omytí chrástu dochází ke zřetelnému poklesu obsahu PAHs a jejich koncentrace jsou na všech variantách pokusu na stejné úrovni. Výsledky potvrzují, že povrchová kontaminace rostlin, v tomto případě kontaminace znečištěnou zeminou (prašnost, rozstřík při zalévání) výrazně převládá nad vstupem PAHs do rostliny přes jejich kořenový systém. Přesto i zde byl zaznamenán trend nárůstu PAHs v hypokotylu ředkviček v pořadí kambizem kontrola, kambizem s kalem ČOV, fluvizem Karviná. Podobný trend byl zaznamenán i při srovnání sumy toxických ekvivalentových faktorů. Zátěž nadzemní části ředkviček v neomytém stavu z varianty fluvizem Karviná (0,49 mg kg⁻¹) a varianty s kalem Třinec (0,13 mg kg⁻¹) byla zhodnocena jako výrazně zvýšená, vzhledem k limitní hodnotě benzo(a)pyrenu v potravinách, určených k přímé spotřebě (nařízení 208/2005/ES, limit 0,002 mg kg⁻¹). Po omytí nadzemní části rostlin (chrást ředkviček), poklesly hodnoty benzo(a)pyrenu pod detekční limit (0,01 mg kg⁻¹) na všech variantách. Zvýšené hodnoty benzo(a)pyrenu byly detegovány také v hypokotylech ředkviček na variantě se zatíženou fluvizemí Karviná (0,042 mg kg⁻¹). Na variantě se zapraveným kalem z ČOV Třinec dosáhl obsah

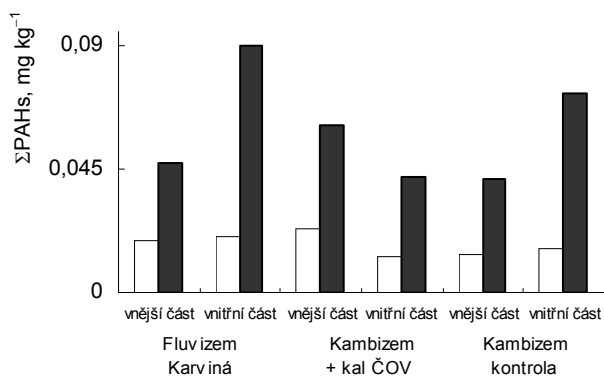


Obr. 2. Obsahy sumy PAHs a sumy toxických ekvivalentových faktorů PAHs v povrchové a vnitřní části kořene mrkve, nádobový pokus, □ ΣPAHs, ■ ΣTEF

této sloučeniny v hypokotylech ředkviček $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$. Na kontrolní variantě se koncentrace pohybovaly pod mezí detekce.

Z obr. 2 je patrná výrazná diferenciacie obsahů sumy PAHs a TEF PAHs v povrchové a vnitřní části kořene mrkve (2. rok trvání pokusu) na variantě Třinec, kde byl zjištěn vyšší obsah sumy PAHs v povrchové části rostliny, ve srovnání s vnitřní částí, na rozdíl od varianty kontrolní a především varianty Karviná. Na variantě Karviná se sorpčně chudou fluvizemí byla výrazně více zatížena vnitřní část kořene mrkve, dá se tedy uvažovat o vyšší mobilitě některých sloučenin PAHs v této půdě, s jejich pronikáním do cévních svazků kořene mrkve. Ve srovnání s kontrolní variantou dosahují koncentrace sumy PAHs i TEF PAHs ve středním válci kořene mrkve výrazně zvýšených hodnot, obsahy v primární kůře kořene mrkve jsou však s kontrolní variantou srovnatelné. Na variantě s kalem Třinec byly zjištěny mírně zvýšené koncentrace ve středovém válci kořene mrkve, avšak výrazně zvýšené obsahy v primární kůře, oproti kontrole. Z výsledků se dá předpokládat, že na variantě s kalem Třinec, kde jsou PAHs pevněji vázány na půdní organickou hmotu, dochází k narušení této vazby v rhizosférní oblasti kořene a k následné vazbě PAHs na lipidické a další organické sloučeniny (především rostlinná barviva) v povrchových vrstvách kořene. Bobovnikova a spol.²² uvádí karoten v kořeni mrkve jako sloučeninu, která vázala vysoké koncentrace PCB.

Srovnáme-li obsahy sumy PAHs se 2–3 aromatickými jádry a 4–6 aromatickými jádry v kořenech mrkve (obr. 3), je zřejmé, že vyšší přestup sloučenin PAHs transferovou cestou půda-rostlina se týká především jednodušších sloučenin. U sloučenin se 4–6 aromatickými jádry dosáhly vyšší koncentrace obsahy v primární kůře kořene na všech variantách pokusu a lze tedy odvodit výrazně nižší pronikání těchto sloučenin přes primární kůru do cévních svazků kořene. Výsledky odpovídají obecně známému faktu o mobilitě PAHs, kdy se uvádí¹³, že sloučeniny s vyšší molekulovou hmotností jsou relativně nepohyb-

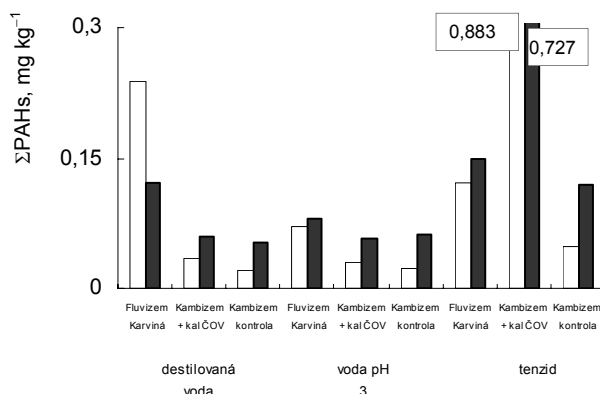


Obr. 3. Obsahy sumy PAHs se 2-3 a 4-6 aromatickými jádry v kořenech mrkve, nádobový pokus; □ Σ4–6 jader, ■ Σ2–3 jader

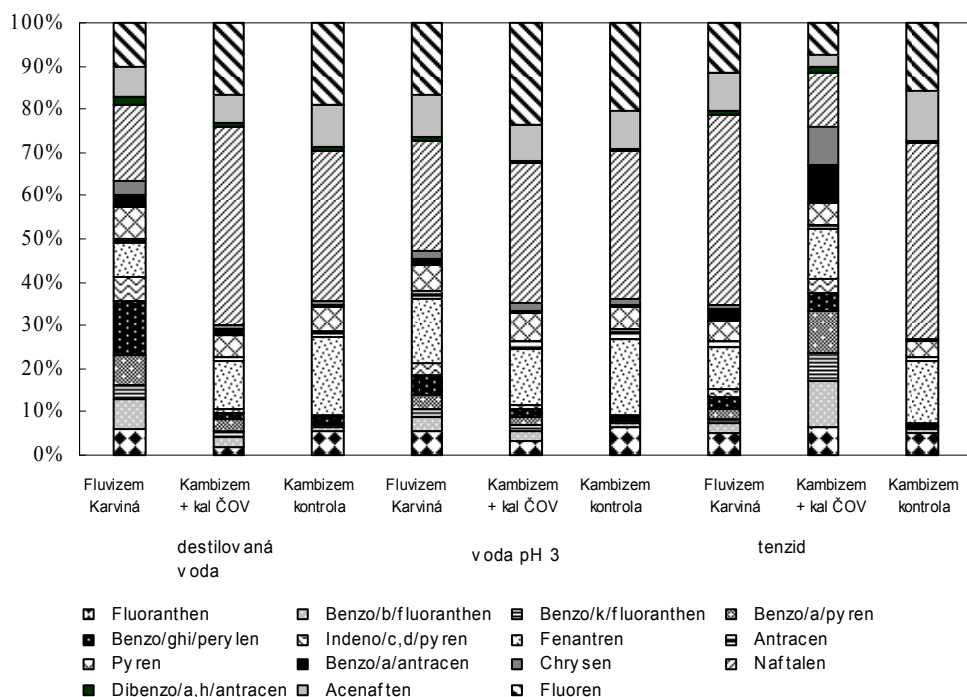
livé, vzhledem k vyšším molekulovým objemům a extrémně nízké těkavosti a rozpustnosti. Fyzikální a chemické vlastnosti PAHs se mění s molekulovou hmotností s tím, že s jejím růstem klesá rozpustnost ve vodě, roste bod tání, bod varu a rozdělovací koeficient oktanol/voda (K_{ow}).

Výsledky extrakčního kolonového pokusu jsou v souladu se závěry nádobových experimentů. Na obr. 4 je znázorněn obsah sumy PAHs se 2–3 a 4–6 aromatickými jádry v extraktech ($\mu\text{g l}^{-1}$). Při první extrakci destilovanou vodou došlo k vymytí především jednodušších PAHs z půdy do roztoku na variantě Karviná, zatímco na variantě kal Třinec nebyly PAHs z organických vazeb vytěsněny. Při opakované extrakci okyselenou vodou došlo k poklesu obsahů PAHs v extraktu z varianty Karviná s tím, že relativně nižší pokles byl zjištěn PAHs se 4–6 aromatickými jádry, které jsou v půdě silněji poutány na organickou hmotu a nebyly vyplaveny již při první extrakci. Na vyluhovatelnost PAHs z půdy s kalem Třinec neměla změna acidity rozpouštědla výraznější vliv. Použití tenzidu při následné třetí extrakci však vedlo k narušení vazeb PAHs na půdní organickou hmotu a na variantě Třinec došlo k masivnímu přechodu PAHs se 2–3 > 4–6 aromatickými jádry z půdy do roztoku. Oproti druhé extrakci byly zjištěny vyšší hodnoty PAHs v extraktu tenzidu i na variantě Karviná, ty však byly již výrazně nižší, než při první extrakci a převaha PAHs se 4–6 aromatickými jádry oproti PAHs se 2–3 aromatickými jádry potvrzuje, že jednodušší sloučeniny s nižší afinitou k půdní organické hmotě byly z půdy masivněji vytěsněny již při první extrakci.

Z obr. 5, který porovnává procentické zastoupení jednotlivých sloučenin PAHs na celkové zátěži extraktů, lze odvodit některé další zákonitosti. Je patrné, že nejvíce přechází do roztoku skutečně nejjednodušší naftalen se dvěma aromatickými jádry, jeho podíl vůči ostatním sloučeninám je nejvyšší v extraktu destilovanou vodou z varianty kal Třinec, tedy v případě vysokého obsahu organické hmoty v půdě a slabého extrakčního činidla. Při následné extrakci okyselenou destilovanou vodou (pH 3)



Obr. 4. Obsah sumy PAHs se 2-3 a 4-6 aromatickými jádry v extraktech kolonového pokusu; □ Σ4–6 jader, ■ Σ2–3 jader



Obr. 5. Procentuální zastoupení jednotlivých sloučenin PAHs v extraktech kolonového pokusu

jeho podíl klesá, především na úkor fluorenu s nepatrně složitější molekulou. Zachycen byl i mírný pokles fenanthrenu se třemi aromatickými jádry ve prospěch složitějších sloučenin. Z toho je patrné, že použití kyselého extrakčního činidla mělo vliv na poměr jednotlivých sloučenin v extraktu, přestože změna zdaleka nedosahuje účinnosti použití roztoku tenzidu, kdy je dobře patrný nárůst podílu složitějších PAHs, se zvýšeným karcinogenním rizikem. Použití roztoku tenzidu vedlo k mobilizačnímu efektu PAHs a poměr jednotlivých sloučenin je porovnatelný s jejich poměrem v první extrakci na variantě fluvizem Karviná, kdy došlo k vymytí kontaminovanou vodou naplavených PAHs, které nebyly vázány v sorpčně chudém půdním prostředí. V případě varianty kal Třinec však pozorujeme ještě vyšší zastoupení nejtoxičtějších sloučenin, což souvisí s jejich celkovými obsahy v půdě dané varianty (jejich vyšší zastoupení v kalu ČOV). Z obrázku je dále patrné, že v kontrolní variantě s nízkými obsahy PAHs nedošlo k podstatným změnám poměru jednotlivých sloučenin v roztoku v posloupném průběhu tří extrakcí a obecně zde platí, že vyluhovány byly především nejjednodušší sloučeniny PAHs.

Závěr

Závěrem je možné konstatovat, že výrazná zátěž půdy PAHs vedla ke kontaminaci podzemních orgánů rostlin, ta byla způsobena, v závislosti na půdních vlastnostech, pronikáním (především jednodušších PAHs) půdním roztokem do cévních svazků nebo vazbou (především složitějších PAHs) v povrchových částech kořene na jeho organické složky. Je tedy zřejmé, že kontaminace rostlin může být způsobena různým typem zátěže půd PAHs, včetně aplikace kalů ČOV, jak udávají i jiní autoři^{14,23}. Nadzemní část rostlin byla mnohem výrazněji zatížena mimokořenovou cestou, což se potvrdilo nejenom v nádobovém, ale i mikroparcelkovém polním pokusu. Na zatížených lokalitách může být problematické dodržení limitních obsahů PAHs v komoditách, určených k přímé spotřebě, jak se prokázalo v případě benzo(a)pyrenu.

Príspevek vznikl v rámci projektu MZe ČR a NAZV č. QF 4063.

LITERATURA

1. Starke U., Herbert M., Einsele G.: *Bodenschutz 1680*, 1 (1991).
2. Němeček J., Podlešáková E., Pastuszková M.: *Rostl. Výr.* 42, 49 (1996).

3. Holoubek I., Adamec V., Bartoš M., Černá M., Čupr P., Bláha K., Demnerová K., Drápal J., Hajšlová J., Holoubková I., Jech L., Klánová J., Kocourek V., Kohoutek J., Kužilek V., Machálek P., Matějů V., Matoušek J., Matoušek M., Mejstřík V., Novák J., Ocelka T., Pekárek V., Petira K., Provazník O., Punčochář M., Reider M., Ruprich J., Sánka M., Tomani-ová M., Vácha R., Volka K., Zbiral J.: Národní inventura Persistentních organických polutantů v České republice (NPOPsINV), 2. verze – NPOPsINV 2003, TOCOEN REPORT No. 249. (2003).
4. Podlešáková E., Němeček J., Vácha R., Pastuszková M.: *Toxicol. Environ. Chem.* **66**, 91 (1998).
5. Vácha R., Podlešáková E., Němeček J., Poláček O.: *Chem. Listy* **95**, 590 (2001).
6. Eljarrat E., Caixach J., Rivera J.: *Chemosphere* **51**, 595 (2003).
7. Van den Berg M., Birnbaum L. S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind J., Walker N., Peterson R. E.: *Toxicol. Sci.* **93**, 223 (2006).
8. Sánka M., Němeček J., Podlešáková E., Vácha R., Beneš S.: *Výpracování kritických hodnot obsahů rizikových prvků a organických cizorodých látek v půdě a jejich příjem rostlinami z hlediska ochrany kvality a kvantity zemědělské produkce*. Zpráva MŽP 2002.
9. Welp G., Brümmer G. W.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **43**, 83 (1999).
10. Krauss M., Willeke W., Martius C., Banderia A. G., Garcia M. V. B., Amelung W.: *Environ. Pollut.* **135**, 143 (2005).
11. Thiele S., Brümmer G. W.: *Soil Biol. Biochem.* **34**, 733 (2002).
12. Brandt C. A., Becker J. M., Porta A.: *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 1638 (2002).
13. Holoubek I.: *Chemie životního prostředí IV. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs)*. Brno, 2005. <http://recetox.muni.cz/index.php?id=23>, staženo 20.4. 2007.
14. Oleszczuk P., Baran S. J.: *Environ. Sci. Health, Part A* **40**, 2085 (2005).
15. Meneses M., Schuhmacher M., Domingo J. L.: *Chemosphere* **46**, 1393 (2002).
16. MZd ČR: *Vyhledání MZd ČR č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách*. Sbíрка zákonů 2004.
17. Johnsen A. R., Karlson U.: *Microb. Ecol.* **50**, 488 (2005).
18. Thiele S., Brümmer G. W.: *Chemische Extraktionverfahren zur Abschätzung des mikrobiell abbaubaren PAK-Anteils kontaminierten Böden*. *Mitteilgn. Dtsch. Bodenkundl. Gesellsch.* **91/I**, 522 (1999).
19. Hraško J., Červenka L., Facek Z., Komár J., Němeček J., Pospíšil F., Sirový V.: *Rozbory půd*. SVPL, Bratislava 1962.
20. Houba V. G. J.: *Soil and Plant Analysis*, part 5A. Wageningen University 1994.
21. Korchens M., Schulz E., Behm R.: *Zbl. Microbiol.* **145**, 305 (1990).
22. Bobovnikova T. I., Alekseeva L. B., Dibtseva A. V., Chernik G. V., Orlynsky D. B., Pripulina I. V., Pleskachevskaya G. A.: *Sci. Total. Environ.* **246**, 51 (2000).
23. Zohair A., Salim A.-B., Soyibo A. A., Beck A. J.: *Chemosphere* **63**, 541 (2005).

R. Vácha, J. Čechmánková, M. Havelková, and V. Horváthová (Research Institute for Soil and Water Conservation Prague, Czech Republic): **Transfer of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soil into Selected Plants**

The influence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil on plant production quality was investigated. A series of pot, field, and laboratory tests were performed. The results showed that the transfer of PAHs into plants is influenced mainly by chemical characteristics of aromatics, by soil characteristics (the content and quality of organic matter) and by plant characteristics (plant species and bodies). The pot and field tests confirmed the prevailing influence of emissions on the PAH load of mustard shoots compared with PAH transfer from the soil. Nevertheless, an increased transfer of PAHs containing less aromatic rings into the middle parts of carrot roots was confirmed for sandy soils. Increased contents of PAHs were also detected in primary bark of carrot roots in sludge application. These findings were confirmed by laboratory extraction tests.

BECARIO

Středoškolská soutěž v experimentální chemii „O pohár Becario“

Bohužel je smutnou realitou, že chemie patří na středních školách mezi ty méně oblíbené předměty. O to víc nás těší to, že se každoročně objevuje mnoho studentů, které chemie nejenom baví, ale jsou do ní doslova zapáleni. Někteří se obdivují odhalování zákonitostí, podle kterých se přeměňují molekuly, a jsou spíše teoretickými nadšenci. Jiní se zase, třeba s ne úplně dokonalou teoretickou přípravou, horlivě pouštějí do experimentování ve školní, nebo dokonce domácí laboratoři.

Existující středoškolské soutěže jako Chemická olympiáda (ChO) nebo korespondenční seminář KSICHT jsou z větší části postaveny na teoretických úkolech. ChO sice má i praktickou část, ale bez teoretických znalostí uspět nelze. Když nás tedy oslovili zástupci sdružení Becario, že by rádi zorganizovali chemickou soutěž pro středoškoláky, bylo třeba se zamyslet. Zamyslet se hlavně nad tím, kde asi bude na trhu středoškolských chemických aktivit pomyslná díra. A na základě těchto úvah se zrodila soutěž „O pohár Becario“.

Od dosavadních aktivit se skutečně odlišuje – je to soutěž experimentální, týmová a záleží i na úrovni prezentace předváděných experimentů. Stručně řečeno mají soutěžní týmy pod vedením svého pedagoga vybrat, zpracovat a poutavě předvést zajímavý experiment na zadané téma.

Téma 1. ročníku bylo „*Chemie a světlo*“. Generálku svojí prezentace museli studenti nejprve provést na kmenové škole před vlastními spolužáky (a mj. zjistili, kolik to dá práce připravit, „zachodit“ a poutavě předvést chemický pokus). Dokumentaci k celému projektu zaslali porotě, která vybrala 10 nejlepších týmů. Ty pak byly pozvány na finále soutěže, kde experimenty předvedly v doprovodu elektronické prezentace před odbornou porotou.

Finále loňského prvního ročníku se konalo 18. dubna 2007 na VŠCHT Praha. V porotě zasedli prof. Jitka Moravcová za VŠCHT Praha, Ing. Pavla Topolánková za Becario, RNDr. Petr Holzhauser za Národní centrum pro mladé chemiky a porotě předsedal prof. Václav Pačes, předseda AV ČR. Slavnostní vyhlášení výsledků a předání cen pak proběhlo odpoledne v prostorách Senátu ČR.

První ročník soutěže měl veliký úspěch jak u účastníků soutěže, tak u profesorů, kteří jim s přípravou projektů pomáhali. Proto se letošní druhý ročník soutěže s podtitulem „*Chemie a elektrina*“ konal jako dvoudenní akce ve dnech 22.–23. 4. 2008, opět v prostorách VŠCHT a Senátu. Jako předseda v porotě tentokrát zasedl prof. Rudolf Zahradník, čestný předseda AV ČR. V rozšířeném provedení se tak soutěže mohlo ve dvou půldenních kláních zúčastnit 14 týmů a zbyl čas i na společenský večer na parníku na Vltavě.

*Petr Holzhauser,
sekce mladých ČSCH*

LUMINISCENCE V BĚŽNÉM ŽIVOTĚ I V LABORATOŘI

JIŘÍ KRIST^a, FRANTIŠEK GÉLA^a, FABIÁN FRONČEK^a a MARTIN KUBALA^b

^a Mendelovo gymnázium, Opava, příspěvková organizace, Komenského 5, 746 01 Opava, ^b Katedra experimentální fyziky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc

Došlo 10.12.07, přijato 20.5.08.

Klíčová slova: školní chemické pokusy, chemiluminiscence, fotoluminiscence, singletní kyslík, acidobazické reakce

Úvod

V západní Evropě je již dlouho pozorován postupný pokles zájmu studentů o přírodní vědy a v současné době je tento trend patrný i u nás¹. Z velké části je to způsobeno tím, že studium přírodních věd klade poměrně velké nároky na abstraktní myšlení, neboť moderní chápání jevů v přírodě se již posunulo do sfér, které označujeme předponou „nano-“. Tato oblast je již našim smyslem těžko přístupná a moderní věda stojí na mnoha abstraktních konstrukcích jako např. foton, spin či energie. Ukazuje se, že motivace studentů porozumět těmto pojmům může být výrazně podpořena, pokud je teoretický výklad doplněn názornými experimenty, nejlépe takovými, které si studenti mohou sami vyzkoušet. Výrazným motivačním faktorem je také informace, jakým způsobem je možno popisovaný jev uplatnit v praxi^{2,3}. Spektroskopické či mikroskopické techniky využívající luminiscenci dnes patří mezi nejpoužívanější metody v základním výzkumu v široké škále přírodovědných disciplín a – ač si to většinou neuvědomujeme – zařízení využívající tohoto jevu nás obklopují doslova na každém kroku (viz níže). Také díky tomu, že provedení mnoha luminiscenčních experimentů je poměrně nenáročných, mohlo by být zařazení luminiscenčních experimentů zajímavým doplňkem výuky přírodních věd, především chemie a fyziky.

Záhadný jev luminiscence (světélkování) přitahoval pozornost lidí už od pradávna a popisy světélkujícího moře můžeme nalézt už v antické literatuře⁴, plné porozumění těmto jevům umožnil však až rozvoj kvantové mechaniky počátkem 20. století. Luminiscenci definujeme⁵ jako přebytek světelného záření tělesa nad úrovní tepelného vyzařování v dané spektrální oblasti při dané teplotě, jestliže tento přebytek trvá déle než 10^{-10} s. Na molekulární úrovni je možno tento jev vysvětlit tak, že molekula se při přechodu ze stavu s vyšší energií (zpravidla první excitovaný stav) do stavu s nižší energií (zpravidla základní stav) zbaňuje přebytečnou energii vyzařením světelného kvanta

(fotonu), přičemž energie tohoto fotonu je rovna rozdílu energií těchto dvou stavů. Podle mechanismu, jakým se molekula dostane do excitovaného stavu, můžeme rozlišit různé druhy luminiscencí, např. katodovou luminiscenci (excitace po dopadu elektronů – obrazovky televizorů), rentgenoluminiscenci (excitace RTG zářením – luminiscenční stínítka, scintilátory), elektroluminiscence (excitace přiloženým elektrickým polem či procházejícím elektrickým proudem – světelné diody, polovodičové lasery) a další⁶.

Pro didaktické účely se jako nejvhodnější jeví chemiluminiscence, která nastává při některých exotermických reakcích, při nichž meziproducty nebo konečné producty vznikají v excitovaném stavu (v přírodě např. světélkování světlušek či pařežů) a fotoluminiscence, kdy excitovaného stavu je dosaženo pohlcováním světla v ultrafialové, viditelné či blízké infračervené oblasti spektra, přičemž vlnová délka emitovaného světla je odlišná od vlnové délky světla absorbovaného (čili dochází ke „změně barvy“ světla).

Připravili jsme několik jednoduchých luminiscenčních pokusů, o kterých se domníváme, že by mohly efektním způsobem doplnit výuku chemie či fyziky. U každého experimentu kromě návodu přidáváme ještě pár tipů pro správné provedení, poté následuje teoretické vysvětlení jevu a jeho možné využití.

Experimentální část

Chemiluminiscence singletového kyslíku

Drtivá většina stabilních molekul má spárované elektrony. Jelikož elektron může mít spin $+1/2$ nebo $-1/2$; celkový elektronový spin molekuly je celé číslo. Většina molekul má v základním stavu (stavu s nejnižší energií) celkový spin roven nule a také průmět spinu může nabývat jediné hodnoty a to 0 (odtud označení singletový stav). Vzácněji se vyskytují molekuly, které mají v základním stavu celkový spin 1 a jelikož průmět spinu může nabývat tři hodnot (-1 , 0 nebo 1), označujeme tento stav jako tripletový. Mezi tyto vzácné výjimky patří i molekula kyslíku O_2 .

Rudá záře⁷

Do roztoku vzniklého smíšením 100 ml 30% roztoku NaOH a 50 ml 30% roztoku H_2O_2 zavádíme chlor (v digestoři), který lze připravit reakcí 65 ml 30% HCl s 16 g $KMnO_4$ (případně reakcí 81 ml 30% HCl s 22 g MnO_2 nebo reakcí 94 ml 30% HCl s 25 g $K_2Cr_2O_7$). Pozorujeme chemiluminiscenci v oranžovo-červené oblasti spektra.

Pro přípravu chloru doporučujeme použít frakční baňku, do které nasype me manganistan draselný a z dělicí nálevky přikapáváme kyselinu chlorovodíkovou, vznikající chlor zavádíme hadičkou přímo do připraveného roztoku. Chlor by se měl před zaváděním do roztoku čistit zaváděním do vody. Ověřili jsme však, že pokus probíhá i bez čištění chloru a dokonce i efektněji.

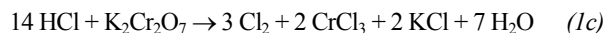
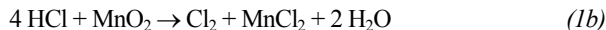
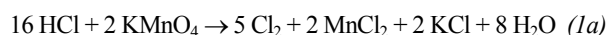
Roztok, do kterého zavádíme chlor, bychom měli optimálně chladit po celou dobu pokusu. Zjistili jsme však, že postačí roztok před pokusem dobře vychladit ve vodě z vodovodu. Z bezpečnostních důvodů je vhodné zařadit promývačku k pohlcování nezreagovaného chloru (nezbytně nutné to není pouze v případě, že provádíme pokus v digestoři; prakticky se totiž všechny chlor pohltí již při zavádění do roztoku).

Bezpečnost pokusu a tipy

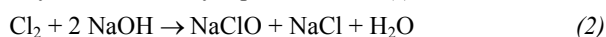
Pokud studenti nesmějí pracovat s koncentrovanými žiravinami, může být tento pokus pouze demonstrační. Při pokusu vzniká jedovatý chlor, proto je nutné dbát na maximální těsnost celé aparatury a pokus provádět v digestoři. Z bezpečnostního hlediska je dobré přidat ještě jednu promývací baňku s roztokem hydroxidu sodného, s nímž by případně reagoval chlor unikající z první promývací baňky. Při případné nehodě ukončíme pokus uzavřením kohoutu u dělicí nálevky. Je důležité mísit roztoky peroxidu a hydroxidu velmi pomalu, jelikož při smíchání pěni a mohlo by dojít k potřísnění žiravinou, roztok je nutno chladit. Pokus je důležité provádět v dobře zatemněné místnosti, jinak nepůsobí tak efektně. Pokud pokus nefunguje, pak přidáme ještě trochu peroxidu vodíku.

Princip

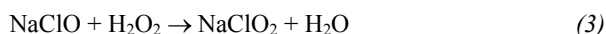
Ve frakční bance vzniká chlor podle rovnice 1a (nebo rovnice 1b či 1c):



Chlor je zaváděn do promývací baňky, kde reaguje s hydroxidem sodným podle rovnice (2):



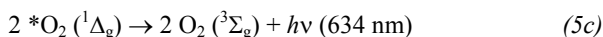
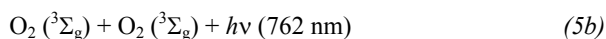
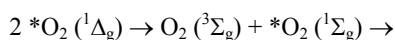
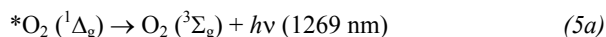
Vznikající chlornan sodný dále reaguje s peroxidem vodíku podle rovnice (3):



Vzniká nestabilní chloritan sodný, který se rozkládá podle rovnice (4):



Molekula kyslíku ${}^*\text{O}_2$ se nachází v singletovém stavu (tzv. singletní kyslík). Jak již bylo uvedeno výše, u molekuly kyslíku nejde o stav s nejnižší energií, je to tedy stav excitovaný (proto * v označení). Singletový kyslík může být generován různými reakcemi v různých formách, nicméně v kondenzované fázi je významná pouze forma ${}^*\text{O}_2 ({}^1\Delta_g)$, která může přecházet do základního stavu třemi různými mechanismy, přičemž přebytek energie může být vyzářen ve formě fotonu ($h\nu$):



Při reakcích (5b) a (5c) jsou emitované fotony ve viditelné oblasti spektra⁸.

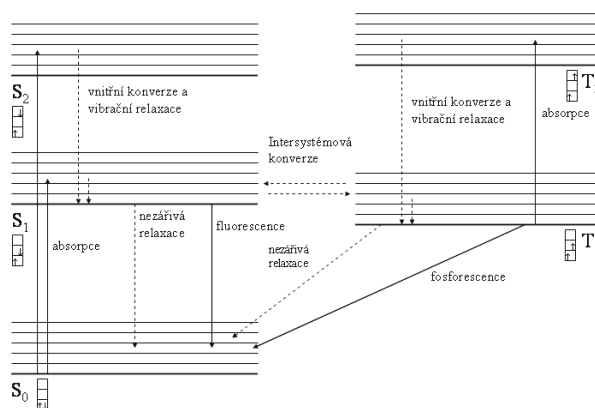
Využití ve výuce

Pokus má za cíl demonstrovat chemiluminiscenci v nepříliš složité aparatuře a užitím běžných a snadno dostupných chemikálií, které se dají koupit i v lékárně či drogerii.

Na tomto pokusu lze také názorně vysvětlit pojmy excitovaného a základního stavu molekuly a ukázat přechody mezi nimi. Dále je možné pokus provést jako motivaci k objasnění spinových stavů. Další možností je demonstrace laboratorní přípravy chloru, neobvyklá příprava kyslíku a oxidační vlastnosti peroxidu vodíku. Je vhodné využít reakcí, které při pokusu probíhají, k procvičení schopnosti žáků sestavovat a vyčíslovat chemické rovnice.

Fotoluminiscence

Po pohlcení fotonu se molekula dostane do excitovaného stavu. V excitovaném stavu pak může dojít k celé řadě procesů, které souhrnně označujeme jako relaxace (např. změny v rozložení náboje v molekule, reorientace molekul rozpouštědla, tepelné disipace a další) a molekula se velmi rychle dostane na nejnižší energetickou hladinu prvního excitovaného stavu. Odtud potom přechází zpět do základního stavu, což může být doprovázeno vyzářením fotonu. Vzhledem k tomu, že relaxace jsou v podstatě ztrátami energie, má vyzářený foton menší energii a tedy větší vlnovou délku než foton absorbovaný, jinými slovy, dochází ke změně barvy světla (obr. 1). Pokud dochází k přechodům jen mezi singletovými stavy molekuly, je uvedený proces velmi rychlý (typicky nanosekundy)



Obr. 1. Energetický diagram pro procesy, které se odehrávají při fotoluminiscenci; svislé plné čáry – procesy spojené s pohlcením či vyzářením fotonu, přerušované čáry – nezářivé přechody, S – singletové stavy, T – tripletové stavy, vodorovné čáry – energetické hladiny

a mluvíme o fluorescenci. Pokud dochází k přechodu ze singletového stavu do tripletového stavu a dále k emisi fotonu, je celý proces mnohem pomalejší (milisekundy až hodiny), neboť je spinově zakázaný a pak hovoříme o fosforescenci. Pokud dochází k přechodu z tripletového stavu zpět do prvního singletového excitovaného stavu a odsud k emisi fotonu, jedná se o tzv. zpožděnou fluorescenci⁶. Fluoreskujících látek je celá řada a je možné nalézt např. fluorofory, které absorbují zelené světlo a emitují žluté. Mnohem efektněji působí experimenty, kdy dojde k posunu z neviditelné ultrafialové oblasti do viditelné části spektra.

Svítilící pupeny

Pupeny jírovce maďalu (lidově „kaštan koňský“, *Aesculus hippocastanum*) odkrojíme, nařízneme je a vložíme do Petriho misky s vodou. Pod UV lampou sledujeme vyluhování modře luminiskující látky a její difuzi do celého objemu vody. Čerstvou větvíčku pod UV lampou napříč rozřízneme a na kruhovém průřezu pozorujeme různé rozložení luminiskující látky.

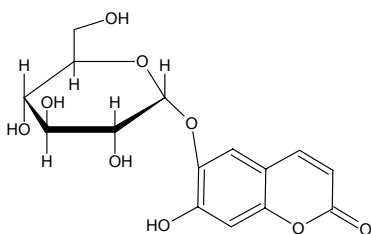
Bezpečnost pokusu a tipy

Při dodržení bezpečnosti práce s nožem mohou pokus provádět sami studenti. Pokus provádíme v dobře zatemněné místnosti, pokud možno použijete čerstvých pupenů.

Princip

V pupenech, v plodech i v jiných částech jírovce maďalu je přítomen eskulin (obr. 2), který má fluorescenční vlastnosti.

Eskulin má silnou antimikrobiální aktivitu a je až 10× účinnější než chinin. Pomáhá snižovat teplotu a zvyšuje prokrvení. Eskulin se používá v mikrobiologii pro stanovení bakteriálních druhů, speciálně pro určení druhu *Enterococcus*. Bakterie druhu *Enterococcus* dokáží totiž eskulin enzymaticky rozkládat, přičemž metabolity této reakce při ozáření UV světlem již nevykazují fluorescenci. Používá se také do šampónů – zvyšuje prokrvení vlasové pokožky a tím zlepšuje zásobení vlasových kořínků výživnými látkami.



Obr. 2. Struktura eskulinu

Využití ve výuce

Tento pokus má za cíl demonstrovat přítomnost luminiscenčních látek v biologickém materiálu. Umožňuje názorně vysvětlit pojmy jako základní a excitovaný stav, foton a energie fotonu. Tento pokus je také efektní demonstrací difuze. Studenty je možno také podnítit k hledání dalších luminiskujících látek. Při osvětlení UV lampou vykazují luminiscenci některé běžné kapaliny, jako např. pivo, tonik, moč a samozřejmě roztoky fluorescenčních sond, z těch běžně dostupných uveďme alespoň fluorescein či eosin. Fotoluminiscenci můžeme pozorovat i u některých pevných látek, např. prací prášek, antracen, bělený papír či bílé textilie.

Aplikace fotoluminiscence

Model zářivky

V třecí misce rozetřeme kyselinu boritou s fluoresceinem v hmotnostním poměru 100:1. Tuto naoranžovělou směs nasypeme do zkumavky a nad kahanem roztavíme tak, aby vznikající tavenina (rovnice 6) pokryla pokud možno rovnoměrně celý povrch stěny zkumavky a dno. Po vychladnutí z taveniny vznikne sklovitá hmota⁹. Do zkumavky umístíme UV diodu a připojíme ji ke zdroji. Pozorujeme, jak se UV záření (spolu s přilehlou modrou oblastí spektra) mění na žlutozelené světlo.



Princip

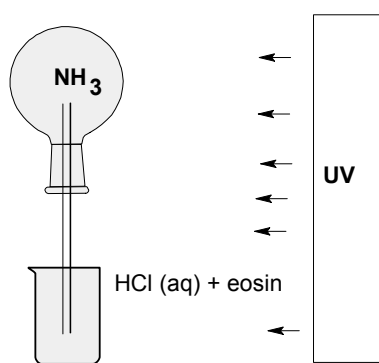
Nejčastěji se s aplikací fotoluminiscence setkáváme v zářivkách. Funkce zářivek spočívá v katodové luminiscenci par rtuti, která však z velké části září v UV oblasti, proto se na vnitřní stranu zářivkové trubice nanáší vrstva luminoforu, která toto UV záření pohlcuje a poté vyzařuje viditelné světlo.

Využití ve výuce

Tento pokus může sloužit jako jednoduchá ukázka aplikace fotoluminiscence v běžném životě a doplnit výklad k experimentům popsáním výše.

Fontánka¹⁰

Do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml vody přidáme pár kapek 1% roztoku eosinu v ethanolu (nebo několik naříznutých pupenů jírovce maďalu) a při excitaci UV zářením pozorujeme luminiscenci. Poté, co roztok okyselíme 2–3 kapkami koncentrované HCl, přestane roztok v UV záření luminiskovat. Do zábrusové baňky kápneme 4 až 5 kapek koncentrovaného vodného roztoku amoniaku a uzavřeme zátkou s trubičkou. Roztok v uzavřené baňce nad kahanem odpařujeme, dokud baňka není naplněna (vlhký indikátorový papírek přiložený k ústí trubičky zmodrá). Trubičku ponoříme do roztoku kyseliny chlorovodíkové a v UV světle pozorujeme luminiskující fontánku (obr. 3).



Obr. 3. Aparatura k experimentu „Fontánka“

Bezpečnost pokusu a tipy

Pokud studenti nesmějí pracovat s koncentrovanými žiravinami, může být tento pokus pouze demonstrační. Pokus pro větší efekt provádíme v zatemněné místnosti. Je velmi důležité přidat správné množství kyseliny do roztoku s indikátorem. Pokud se přidá větší množství, nedojde při reakci s plyným amoniakem k potřebné změně pH a pokus se nezdaří. Pro práci s NH_3 je vhodné použít suchou varnou baňku. Zátka i trubička v ústí varné baňky musí pevně držet, aby nedošlo vlivem podtlaku v baňce k jejich nasátí dovnitř a k rozbití aparatury.

Princip

Spektra či intenzita fluorescence mnoha fluoroforů (např. eosin či aeskulin a mnohé další) závisí na pH prostředí. Amoniak se velmi dobře rozpouští ve vodě a tohoto faktu lze využít pro konstrukci fontánky – plyný amoniak, kterým je naplněna varná baňka, se začne rozpouštět ve vodném roztoku, do které je ponořena trubička vedoucí z baňky. Při rozpouštění plynu vzniká v baňce podtlak, který způsobí nasávání roztoku. Změna pH při rozpouštění NH_3 způsobí změnu luminiscenčních charakteristik přídavné látky (eosin, eskulin).

Využití ve výuce

Tento pokus je velice efektní. Má za cíl poutavě demonstrovat rozpustnost plynů ve vodě a závislost fotoluminiscence na aciditě prostředí s využitím jednoduché aparatury, běžných a snadno dostupných chemikálií. Tento pokus může sloužit jako vhodný a poutavý úvod k acidobazickým titracím.

Především se ale jedná o velmi jednoduchou ukázkou toho, že luminiscence může být více než hra a že měření luminiscenčních charakteristik může poskytnout zajímavé informace o dalších látkách v roztoku. Praktické uplatnění je velice široké a zahrnuje nejen zmíněné měření pH, ale je možné i získávat informace např. o koncentracích vybraných iontů, polaritě prostředí¹¹, membránovém potenciálu¹², nebo také o molekulárních interakcích¹³ či konformačních změnách molekul¹⁴. V současné době je již zcela

běžné využití fluorescence v mikroskopii ke sledování procesů v buňkách¹⁵.

Závěr

S jevem luminiscence se setkáváme poměrně často v každodenním životě a díky vysoké citlivosti a variabilitě jsou luminiscenční techniky významné i v moderním základním a aplikovaném výzkumu. Je tedy až překvapivé, že se s tímto významným jevem setkávají až studenti vyšších ročníků chemických a fyzikálních oborů na vysokých školách.

Uvedené experimenty umožňují zajímavým způsobem seznámit studenty s elementárními pojmy jako energie, excitovaný stav, foton či spin a ukázat jejich význam. Všechny tyto pojmy jsou vyučovány již na středních školách a tedy vysvětlení těchto experimentů by mělo být přístupné i středoškolským studentům. Nesporný nádech tajemna (zvláště v experimentech, kdy „světlo vzniká z ničeho“ – chemiluminiscenční experimenty či fotoluminiscence s buzením v UV) může být pro studenty účinným podnětem pro další zkoumání těchto jevů. Experimenty „Model zářivky“ a „Fontánka“ přitom již přímo ukazují možné využití luminiscence. Poměrně malé materiální a finanční nároky by měly umožnit studentům nejenom provedení experimentů, ale i vyzkoušet si jejich případné modifikace či nalézt další praktické aplikace. Věříme, že tato práce bude sloužit jako odrazový můstek pro středoškolské i vysokoškolské učitele, kteří chtějí zajímavým způsobem obohatit výuku nebo popularizační přednášky o přírodních vědách.

Autoři děkují za konzultace Lukáši Müllerovi a Janě Skopalové z Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Marii Solárové z Katedry chemie Přírodovědecké fakulty Ostravské univerzity. Poděkování patří i Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky za podporu formou grantů č. NPV II 2E06029 a MSM 6198959215.

LITERATURA

1. Ústav pro informace ve vzdělávání, v knize: *Klíčové údaje o vzdělávání v Evropě 2005. Vzdělávací systémy v Evropě ze všech úhlů pohledu.* Eurydice, Brusel, Praha 2005.
2. Grecmanová H.: *Nové metody propagace přírodních věd mezi mládeží, Olomouc, 15.–16.11.2007.* Sborník příspěvků (Opatrný T., Kvítek L., Fadrná V., Menzelová R., ed.), str. 22. Olomouc 2007.
3. Müller L.: *Nové metody propagace přírodních věd mezi mládeží, Olomouc, 15.–16.11.2007.* Sborník příspěvků (Opatrný T., Kvítek L., Fadrná V., Menzelová R., ed.), str. 50. Olomouc 2007.
4. Plinius st.: *Historia naturalis.* http://penelope.uchicago.edu/Thayer/E/Roman/Texts/Pliny_the_Elder/home.html, staženo 26.11.2007.

5. Pátek K., v knize: *Luminiscence (fyzikální poznatky a technické aplikace)*. str. 1. SNTL, Praha 1962.
6. Dvořák L., Kupka Z., v knize: *Fyzikální podstata a využití luminiscence*. str. 1. SPN, Praha 1980.
7. Šimůnek O.: http://chemiluminiscence.xf.cz/chemiluminiscence_II_final.pdf staženo 8.3.2007.
8. Grossweiner L.: <http://www.photobiology.com/educational/len2/singox.html> staženo 25.11.2007.
9. Hruby M.: www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/29hruby.pdf staženo 1.3.2007.
10. Solárová M., v knize: *Chemické pokusy pro základní a střední školy*. str. 24. Paido, Brno 1996.
11. Kubala M., Plášek J., Amler E.: *Phys. Res.* 53, 109 (2004).
12. Gášková D., Brodská B., Heřman P., Večeř J., Malínský J., Sigler K., Benada O., Plášek J.: *Yeast* 14, 1189 (1998).
13. Kubala M., Teisinger J., Ettrich R., Hofbauerová K., Kopecký V. Jr., Baumruk V., Krumscheid R., Plášek J., Schoner W., Amler E.: *Biochemistry* 42, 6446 (2003).
14. Gregor M., Kubala M., Amler E., Mejsnar J.: *Phys. Res.* 52, 579 (2003).
15. Slavík J., v knize: *Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology*. str. 1. CRC Press, Boca Raton 1994.

J. Krist^a, F. Géla^a, F. Fronček^a, and M. Kubala^b
(^a *Mendel Grammar School, Opava*, ^b *Department of Experimental Physics, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*): **Luminescence in Everyday Life and in Laboratory**

The paper describes spectacular luminescence experiments, which could serve as an interesting supplement of chemistry and physics lessons at universities or high schools. Phenomena such as chemiluminescence, fluorescence or phosphorescence can be demonstrated and abstract concepts like excited state, spin or photon explained. All the experiments have small requirements on laboratory equipment and material costs.

**Proděkan chemické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze
upozorňuje na přijímací řízení v**

**bakalářských oborech studijního programu Chemie,
Biochemie a KATA
ve školním roce 2009/2010.**

Ke studiu budou přijati uchazeči s ukončeným úplným středním nebo úplným středním odborným vzděláním, kteří splní požadavky testu všeobecných studijních předpokladů. Přihlášky a podrobné informace lze získat na adrese: PŘF UK, studijní oddělení, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel: 221 951 155, 221 951 156. Přihlášky ke studiu se přijímají do 28. února 2009.

Další informace naleznete na webových stránkách PŘF UK – www.natur.cuni.cz.

CHEMICKÁ LUMINISCENCE LUMINOLU A JEHO SYNTÉZA ZE SNADNO DOSTUPNÝCH CHEMIKáliÍ

DANIEL ŠIMS A JAN SKOPAL

Gymnázium Josefa Jungmanna, Svojsíkova 1, 412 01 Lito-
měřice
simsa.d@seznam.cz

Došlo 10.12.07, přijato 21.5.08.

Klíčová slova: luminiscence, chemiluminiscence, luminol

Úvod

Luminiscence, česky též světélkování, je vyzařování elektromagnetického záření po předchozím dodání energie, přičemž se jedná o přebytek nad termodynamicky rovnovážným tepelným zářením.

Jinými slovy, luminofor (světélkující látka) nejdříve přijme energii (světelnou, tepelnou, apod.) a přejde do excitovaného stavu. Excitovaný stav je nestabilní, a proto snadno přejde zpět do základního stavu za současné emise světla.

luminofor + energie \rightarrow luminofor* \rightarrow luminofor + $h\nu$

Druhy luminiscence rozdělujeme podle typů budící energie (viz tabulka I).

Aplikace chemiluminiscence v praxi je častá. Běžně se člověk může setkat se svítícími tyčinkami (light-stick) – využívají se při potápění, jako nouzové světlo či k nočnímu rybolovu. Dále se chemické luminiscence vyu-

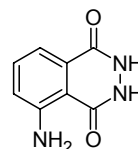
Tabulka I
Rozdělení luminiscence

Druh luminiscence	Budící energie
Radioluminiscence	krátkovlnné elektromagnetické záření – např. γ , rentgenové atd.
Termoluminiscence	tepelná
Elektroluminiscence	elektrická
Katodová luminiscence	elektrony urychlené v elektrickém poli
Triboluminiscence	mechanická – tření, stlačování apod.
Chemoluminiscence	chemická reakční
Fotoluminiscence	světelné záření, popř. UV záření
Sonoluminiscence	ultrazvuk

žívá v analýze DNA a proteinů či k detekci nebezpečných látek v ovzduší (oxidy dusíku, ozon, některé organofosfáty jako bojové plyny).

Konkrétně luminol (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion) je významná látka pro chemiluminiscenční reakce a stejně tak pro výzkum chemiluminiscence samotné. Její strukturální vzorec je na obr. 1.

Několik let po objevení luminolu v roce 1928 se našlo jeho uplatnění v kriminalistice (detekce stop krve, popř. jiných tělních tekutin), později i v biochemii a biologii. Hemoglobin obsahuje železnaté kationty, které jsou už v malé koncentraci schopny katalyzovat reakci luminolu. I po několikerém umytí zůstávají na kobercích nebo podlahách stopy krve, běžnému oku neviditelné. Ovšem po nanesení reakční směsi s luminolem se potřísněná místa intenzivně rozzáří. Stejného principu využívají i myslivci k dohledávání poraněné zvěře. Spolehlivost detekce je však ovlivněna tím, že reakce luminolu může být katalyzována i dalšími látkami (obsahující např. kationty měďnaté, manganaté, kobaltnaté, železité). Vzhledem k těmto a dalším nežádoucím vlivům je luminol v kriminalistice nahrazen jinými látkami.



Obr. 1. Strukturální vzorec luminolu

Experimentální část

Luminiscence luminolu v alkalickém prostředí

Schéma 1 ukazuje průběh reakce, při které vyzařuje modré světlo.

Chemikálie: luminol, hydroxid sodný nebo draselný, hexakvanoželezitan draselný, peroxid vodíku (30% roztok), destilovaná voda.

Roztok A: 0,2 g luminolu, 10 ml 10% roztoku hydroxidu sodného a doplníme na 500 ml destilovanou vodou.

Roztok B: 1,5 g hexakvanoželezitanu draselného, 2 ml 30% roztoku peroxidu vodíku a doplníme na 500 ml destilovanou vodou.

Provedení: Luminiscenci zahájíme smícháním roztoků A a B. Při doznívání reakce je možné do reakční směsi přidat ještě několikrát malé množství roztoku hydroxidu, čímž reakci dočasně „oživíme“. Silné vyzařování světla trvá řádově desítky sekund, slabé záření můžeme pozorovat ještě několik minut.

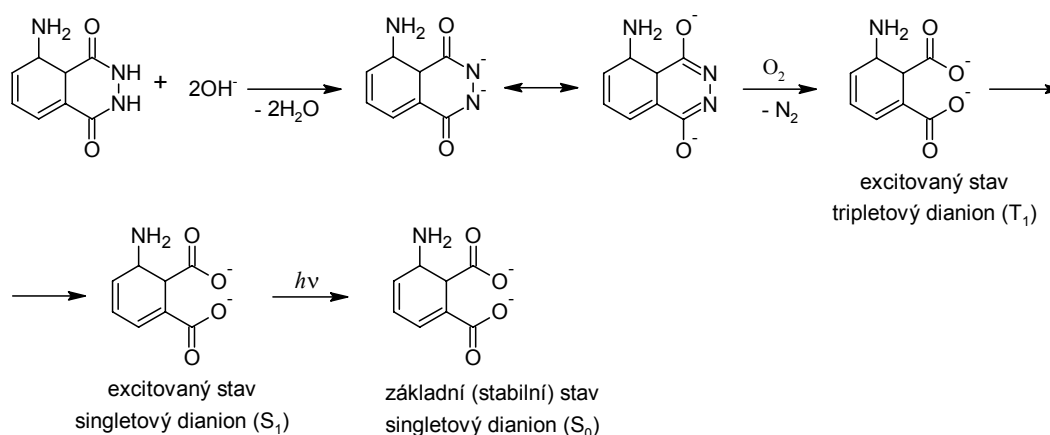


Schéma 1

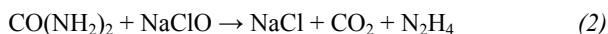
Příprava luminolu z běžně dostupných chemikálií

I. Příprava síranu hydrazinia

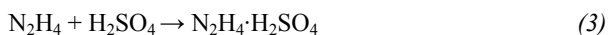
Nejprve připravíme roztok chlornanu sodného podle rovnice (1):



Do baňky odměříme 350 ml vody a za míchání přidáme 20 g NaOH. Roztok ochladíme na teplotu 0°C a baňku postavíme do větší nádoby s chladicí směsí (led a sůl). Do roztoku začneme zavádět chlor, (připravený např. reakcí manganistanu a zředěné kyseliny chlorovodíkové). Kontrolujeme teplotu, aby nepřesáhla 2°C . (Namísto chlornanu by ve větším množství začal vznikat chlorečnan.) Nyní můžeme přikročit k přípravě hydrazinu podle rovnice (2):



Připravený roztok chlornanu ochladíme na 0°C a přidáme 25 ml 50% roztoku NaOH a roztok 15 g močoviny v 20 ml vody. Reakční směs promícháme a necháme asi 1 hodinu reagovat. Poté směs přelijeme do větší nádoby, přidáme 25 ml 10% želatiny a pomalu zahříváme na vodní lázni. Po třiceti minutách roztok odpaříme na 250 až 300 ml, zfiltrujeme vyloučenou želatinu a k filtrátu za chlazení přikapáváme 140 ml 30% kyseliny sírové, čímž připravíme síran hydrazinu (3).



Směs necháme v chladu krystalizovat. Vyloučené krystaly odfiltrujeme a při pokojové teplotě vysušíme. Výtěžek cca 11 g.

II. Příprava kyseliny 3-nitroftalové

Rozpustíme 50 g ftalanhydridu v 50 ml 97% H_2SO_4 v tlustostěnné baňce o objemu 250 ml. Postupně přidáváme 100 ml 65% HNO_3 a kontrolujeme, aby teplota nepřesáhla 110°C . Směs zahříváme přibližně 2 h na vodní lázni. (Schéma 2 popisuje probíhající reakci.) Poté směs nalijeme do 500 ml ledové vody. Produktem je směs kyseliny 4-nitroftalové a 3-nitroftalové. Námí požadovaný isomer je ve vodě méně rozpustný. Vyloučenou sraženinu přefiltrujeme přes fritu a necháme usušit na vzduchu. Chceme-li získat čistší kyselinu 3-nitroftalovou, je možno rekrystalizovat produkt ze studené ledové kyseliny octové. t.t. = $216\text{--}218^\circ\text{C}$, výtěžek cca 16 g.

III. Vlastní příprava luminolu

V kádince o objemu 400 ml smícháme 10 g kyseliny 3-nitroftalové, 30 ml glycerolu a 100 ml vody. K tomu přidáme 10 g síranu hydrazinu a 15 g NaOH, rozpuštěných ve 100 ml vody. Směs zahříváme při atmosférickém tlaku, abychom vyvařili přebytečnou vodu. Jakmile teplota překročí 120°C , zahříváme ještě po dobu 12–14 min. Poté směs necháme vychladnout na 100°C a nalijeme do 150 ml horké vody (65°C). Po ochlazení se vyloučí sraženina, kterou odfiltrujeme a převedeme do baňky o objemu

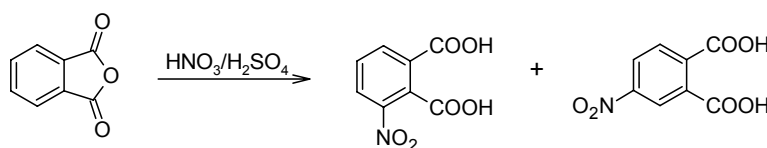


Schéma 2

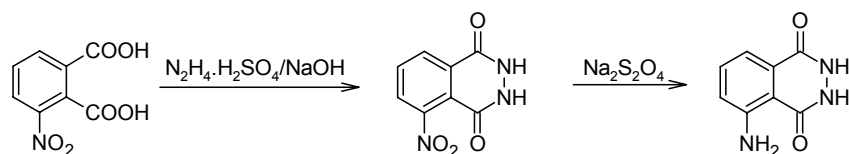


Schéma 3

250 ml. Výtěžek cca 7 g.

K 7 g připraveného preparátu přidáme 50 ml 10% roztoku NaOH a 30 g Na₂S₂O₄. Vznikne hnědočervený roztok, který povaříme 10 min. Poté ho ochladíme na 80 °C, přidáme 20 ml koncentrované kyseliny octové a necháme vychladnout na laboratorní teplotu. Vyloučený světle žlutý produkt (luminol) odsajeme na fritě. Výtěžek cca 3 až 5 g.

Výsledky a diskuse

Existuje řada dalších podobných pokusů s luminolem, např. ve vodném prostředí s využitím uhličitanového pufru, za katalýzy měďnatými kationy, nebo v aprotickém prostředí (např. dimethylsulfoxid). Tyto modifikace nabízejí jen o něco delší dobu luminiscence – řádově minuty, ale maximální intenzita vyzářeného světla je podobná.

Reakci ovlivňuje především kvalita použitého luminolu, zvyšováním koncentrací reaktantů se dá mírně zvýšit i intenzita luminiscence.

Luminiscenci můžeme dále ztraktivnit přidáním malého množství různých fluorescenčních barviv, která změni barvu vyzařovaného světla (např. fluorescein na žlutozelenou, rhodamin B – na červenou, eosin – na fialovorůžovou). Tím zároveň demonstrujeme fotoluminiscenci. Záření luminolu je využito jako energie pro excitaci molekul indikátoru.

Závěr

V tomto příspěvku jsme popsali luminiscenci, kterou jsme dále rozdělili podle druhů budící energie. Poté jsme se zabývali chemiluminiscencí, konkrétně luminolem. Popsali jsme jeho přípravu a nejvýhodnější poměry pro provedení luminiscenční reakce. A k čemu tyto poznatky

použít? Zajímavě provedené a vizuálně efektní chemické pokusy mohou být cestou, jak zaujmout studenty a probudit v nich zájem o chemii. Učitel chemie je schopný luminol syntetizovat a samotné provedení reakcí je otázkou několika minut. Třeba právě jas a pestrobarevnost chemické luminiscence může být jiskřičkou, která ve studentech zažehne touhu po poznání přírodních jevů.

LITERATURA

1. Javorskij B. M., Seleznev J. A.: *Přehled elementární fyziky*. SNTL, Praha 1989.
2. http://chemiluminiscence.xf.cz/chemiluminiscence_II_final.pdf, staženo 18. listopadu 2007.
3. <http://en.wikipedia.org/wiki/Luminol>, staženo 18. listopadu 2007.
4. <http://en.wikipedia.org/wiki/Chemiluminescence>, staženo 19. listopadu 2007.
5. <http://www.ch.ic.ac.uk/wiki/index.php/It:Luminol>, staženo 19. listopadu 2007.
6. <http://jade6.truman.edu/~patter/organic/procedures/luminol.pdf>, staženo 19. listopadu 2007.

D. Šimsa and J. Skopal (*Josef Jungmann Grammar School, Litoměřice*): **Chemiluminescence of Luminol and Its Synthesis from Easily Available Chemicals**

Chemiluminescence, a low-temperature light emission due to a chemical reaction, is demonstrated on the reaction of luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione), hydrogen peroxide, potassium hexacyanoferrate (III) and alkaline hydroxide. The synthesis of luminol from common chemicals and its impressive chemiluminescence are described.

VŠEM PŘEDPLATITELŮM CHEMICKÝCH LISTŮ

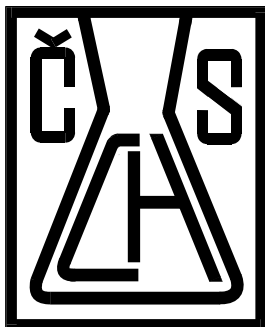
Vážení předplatitelé,
pokud jste tak dosud neučinili, obracíme se na vás s prosbou o potvrzení vašeho dalšího zájmu o odběr Chemických listů v roce 2009 formou objednávky.
Objednávku můžete zaslat písemně na adresu společnosti: ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1, faxem na číslo: 222 220 184, e-mailem: chem.ekonom@csvts.cz

Předplatné Chemické listy	Cena včetně DPH
1 výtisk – volná prodejní cena	170,- Kč
Plné předplatné (instituce, nečlenové ČSCH)	1730,- Kč
Individuální členské předplatné	865,- Kč
Individuální studentské předplatné	480,- Kč
Individuální členské předplatné v SR (doruč. via ČSCH)	70,- Eur
Plné předplatné v SR	92,- Eur
Individuální členské předplatné v zahraničí mimo SR	115,- Eur
Plné předplatné v zahraničí	258,- Eur

Pokud nebudete mít zájem o odběr časopisu v r. 2009, prosíme rovněž o písemné potvrzení.
Předem děkujeme.

Sekretariát České společnosti chemické

Odborná skupina organické, bioorganické a farmaceutické chemie ČSCH



Sborník abstraktů

Konference
Pokroky v organické, bioorganické
a farmaceutické chemii

43. Konference

14. - 16. listopadu 2008

redakce sborníku

Radmila Řápková, Irena Valterová, Vladimír Pouzar a Pavel Drašar

Organizátoři konference si dovoluují uvést na tomto čestném místě firmy a instituce, které významnou měrou pomohly k uskutečnění této tradiční akce. Budiž jim za to v této formě vysloven dík.



Karolina Express (Sartorius)
časopis Chemické listy
Lach-Ner s.r.o.
Lonza Biotec s.r.o.
Merck, spol. s r.o., Praha
SciTech, spol. s r.o., Praha
Sigma-Aldrich, spol. s r.o., Praha
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, vvi, Praha
Vysoká škola chemicko-technologická, Praha

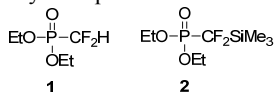


SYNTHESIS OF DIFLUORINATED COMPOUNDS STARTING FROM PHOSPHONATES

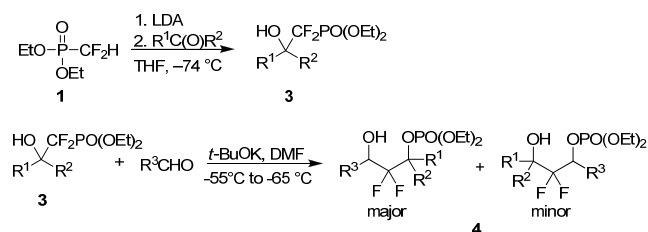
ANASTASIA ALEXANDROVA a **PETR BEIER***

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic
anastasia@uochb.cas.cz, beier@uochb.cas.cz*

Phosphonates **1** and **2** were found to be useful and easily accessible reagents for the introduction of CF₂ moiety into molecules of carbonyl compounds.



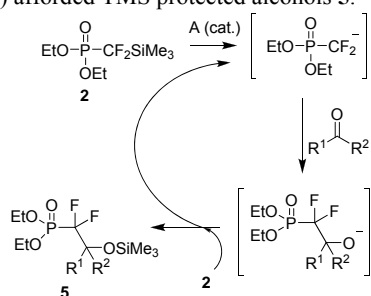
Nucleophilic addition of **1** to aldehydes and ketones was thoroughly investigated under the following scheme:¹



Scheme 1. Reaction of phosphonate **1** with carbonyl compounds.

The first step proceeded smoothly affording phosphonates **3** in quantitative yields with both aldehydes (enolizable, non-enolizable) and ketones. But for the addition of carbonyl compound to phosphonates **3** we failed to use any enolizable aldehyde due to the presence of a strong base. Thus, the best yields of isomeric phosphates **4** were achieved in the reaction of phosphonates **3** derived from non-enolizable aldehydes (R¹=Ar, R²=H) with aryl aldehydes.¹

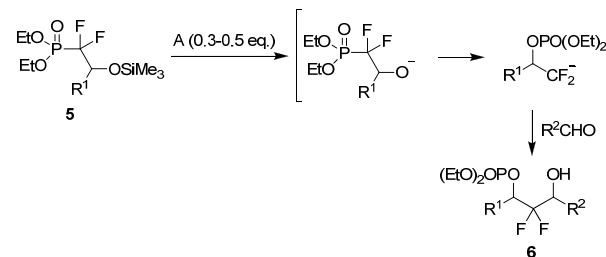
Since the use of enolizable aldehydes in the later reaction was found to be problematic due to competing enolization of aldehydes, we turned our attention to phosphonate **2** that has a trimethylsilyl group instead of the proton. Reaction of **2** with carbonyl compounds in the presence of catalytic amount of the activator (A) afforded TMS protected alcohols **5**.



Scheme 2. Addition of carbonyl compounds to phosphonate **2**.

In the sequence, OTMS phosphonates **5** may react with another molecule of carbonyl compound providing

corresponding phosphates **6** according to the same mechanistic scheme as phosphonates **3** but in nearly neutral medium.



Scheme 3. Reaction of phosphonate **5** with carbonyl compounds.

Different activators such as tetrabutylammonium triphenyldifluorosilicate (TBAT), cesium fluoride, potassium fluoride, potassium carbonate, etc. were tried in reactions shown in Scheme 2 and 3. We have found that phosphates **6** can be prepared in one pot from an aldehyde and **2**.

This work was financially supported by Research Plan AVZ40550506.

REFERENCES

- Beier P., Alexandrova A. V., Zibinsky M., Prakash G. K. S.: *Tetrahedron*, in press.

PŘÍPRAVA (Z)-FLUOROENOL FOSFÁTŮ Z DIFLUOROFOSFONÁTŮ

PETR BEIER*, **RADEK POHL**
a **ANASTASIA V. ALEXANDROVA**

*Ústav organické chemie a biochemie, Akademie Věd České Republiky, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha
beier@uochb.cas.cz*

Enol fosfáty jsou významná třída sloučenin. Mnoho z nich vykazují biologickou aktivitu včetně insekticidních vlastností. K této skupině látek patří také fosfoenol pyruvát – důležitá makroenergetická sloučenina nacházející se ve všech živých organizmech. Jedna z nejčastějších metod přípravy enol fosfátů je Perkowova reakce α-halogen karbonylových sloučenin s trialkyl fosfity.¹

Při výzkumu reaktivity difluorovaných fosfonátů **2** připravených z dietyl difluorofosfonátu **1** a karbonylových sloučenin jsme zjistili, že při reakci fosfonátů připravených z aromatických aldehydů s terc. butylátem draselným vznikají fluoroenol fosfáty **3**. Navíc, při použití přebytku báze je produktem pouze Z izomer fluoroenol fosfátu, (Z)-**3**. Pokud byl fosfonát **2** připraven z alifatických aldehydů nebo z ketonů, pak je produktem reakce s bázi fosfát obsahující difluorometyl skupinu **4** (Schéma 1).

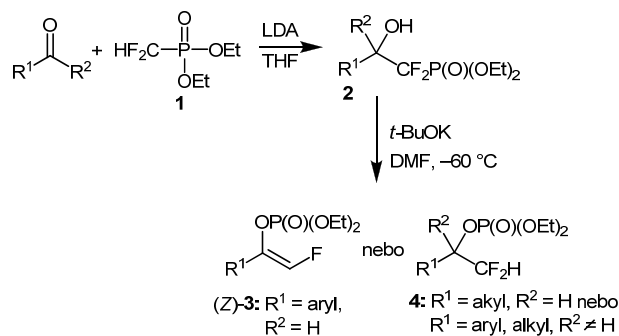


Schéma 1.

Tato metodologie rozšiřuje možnosti přípravy substituovaných enol fosfátů a nabízí další využití fluorovaných fosfonátů, které byly dříve v naší laboratoři použity k přípravě alkoholů obsahujících difluoromethyl skupinu a 2,2-difluoro-1,3-diolů.²

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 203/08/P310 a výzkumného plánu AV ČR (AVZ40550506).

LITERATURA

- Lichtenthaler F. W.: Chem. Rev. 61, 607 (1961).
- Beier P., Alexandrova A. V., Zibinsky M. Prakash G. K. S.: Tetrahedron, v tisku.

SYNTEZA STAVEBNÍCH JEDNOTEK PRO TVORBU SAMOSKLADNÝCH STRUKTUR

TEREZA BEDNAŘÍKOVÁ a JINDŘICH JINDŘICH

Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 40, Praha 2
 jindrich@natur.cuni.cz

Náš výzkum je zaměřen na syntézu sady C-3 symetrických jader¹, které budou dále použity pro přípravu multimerů cyklodextrinů. Tyto multimery by měly sloužit jako stavební jednotky pro tvorbu samoskladných supramolekulárních struktur dendrimerního typu.

Látky **1** a **2** byly připraveny užitím kyselého katalyzované trimerizace a Suzuki – Miyaura cross-coupling reakce jako klíčových kroků.

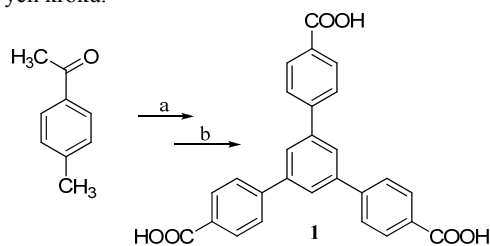


Schéma 1: (a) SiCl₄, EtOH (b) HNO₃, H₂O
(1) 1,3,5-tris(4-karboxyfenyl)benzen

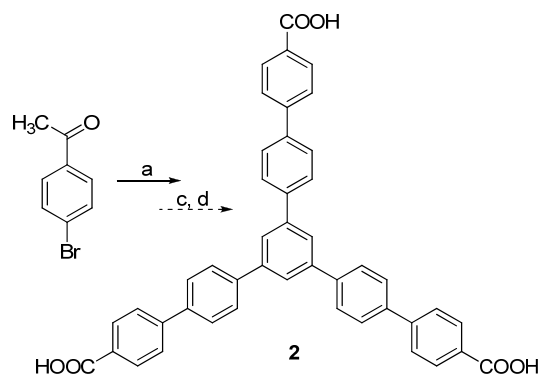


Schéma 2: (a) SiCl₄, EtOH (c) 4-methoxykarbonylfenylboronová kyselina, CsF, Pd(PPh₃)₄, (CH₂OMe)₂ (d) NaOH, MeOH, THF; HCl, H₂O **(2)** 1,3,5-tris(4'-karboxy[1,1'-bifeny]-4-yl)benzen

Tento projekt je podporován MSM 0021620857.

LITERATURA

- Kotha S., Kashinath D., Lahiri K., Sunoj R.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 4003.

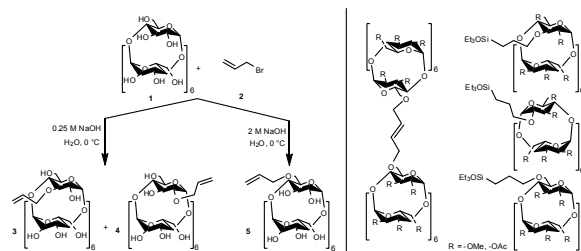
SYNTHESIS OF REGIOISOMERS OF MONOSUBSTITUED β-CYCLODEXTRIN DERIVATIVES

ANTONÍN BERAN a JINDŘICH JINDŘICH

Department of Organic Chemistry, Charles University, Hlavova 2030, 128 40 Prague 2
 jindrich@natur.cuni.cz

Cyclodextrins (CD)¹ are cyclic oligosaccharides with a truncated cone shape, where OH groups are situated outside, and C-H bonds inside of the CD ring. This property is the reason of different polarity between the cavity and the ring surface of the CDs and sets their complexation abilities for making inclusion complexes with organic substances. These properties can be changed by regioselective modification.

The aim of this work has been to prepare a set of three isomers² monosubstituted β-CD derivate (2¹-O, 3¹-O and 6¹-O) (Scheme 1.A) and use them for preparation of β-CD dimers by metathesis³ with Hoveyda-Grubbs catalyst 2nd generation or preparation of triethoxysilyl β-CD derivatives (Scheme 1.B).



This work was supported by Project No. MSM00214620857 from Ministry of Education of the Czech Republic and KAN200200651 Grant Agency of AS CR.

REFERENCES

1. Szejtli J.: Chem. Rev. 98, 1743 (1998).
2. (a) Jindřich J., Tišlerová I.: J. Org. Chem. 70, 9054 (2005); (b) Jindřich J., Pitha J., Lindberg B., Seffers P., Harata K.: Carbohydr. Res. 266, 75 (1995).
3. Grubbs R.H., Trnka T.M.: Acc. Chem. Res. 34, 18 (2001).

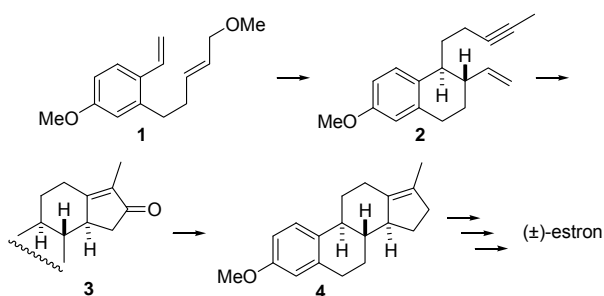
FORMÁLNÍ TOTALNÍ SYNTÉZA ESTRONU ZALOŽENA NA CYKLOANULACÍCH

ROBERT BETÍK^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo nám.2, 166 10 Praha 6
rbetik@seznam.cz; kotora@natur.cuni.cz.

Efektivní totální syntézy přírodních látek patří mezi hlavní cíle organické syntézy. Naším cílem bylo vyvinout novou metodu přípravy látek se steroidním skeletem, která by umožňovala přípravu jejich *ent*-derivátů. Nedávno byl publikován nový syntetický přístup přípravy derivátů 16-ketoestronu, který byl založen na opakované cyklizaci α,ω -dienů pomocí Cp_2ZrBu_2 a následné reakci s allylhalogenidy.^{1,2} Podobný přístup byl použit i pro formální totální syntézu estronu.³ Vzhledem k experimentálním obtížím některých kroků výše zmiňovaného postupu jsme se rozhodli použít jinou metodiku.

Prvním krokem je cyklizace dienu **1** pomocí Cp_2ZrBu_2 následovaná CuCl -katalyzovanou reakcí s 2-brombuta-2,3-dienem. Tato reakce poskytuje enyn **2** v jediném kroku. Klíčovým krokem, při němž vznikají steroidní kruhy C a D, je Pauson-Khandova reakce enynu **2** zprostředkovaná $\text{Co}_2(\text{CO})_8$, která vedla, téměř kvantitativně, k derivátu **3**. Posledním krokem je redukce keto skupiny pomocí $\text{AlCl}_3/\text{LiAlH}_4$. Tato reakce poskytla známý meziprodukt **4**, který může být převeden na estron ve 2 krocích.⁴ Celkově byl meziprodukt **4** připraven z komerčně dostupných látek v 7 krocích (50%).



Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 1M0508.

LITERATURA

1. Herrmann P., Kotora M., Buděšínský M., Šaman D., Císařová I.: Org. Lett. 8, 1315 (2006).
2. Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: Chem. Lett. 36, 1268 (2007).
3. Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: J. Org. Chem. 73, 6202 (2008).
4. Barlett P. A., Johnson, W. S.: J. Am. Chem. Soc. 95, 7501 (1973).

PŘÍPRAVA KVARTERNÍCH SOLÍ TRITERPENOIDŮ A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA

D. BIEDERMANN^a, P. SPÁČILOVÁ^a, J. ŠAREK^a, a M. HAJDÚCH^b

^aKatedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha; ^bLab. experiment. medicíny, Dětská a onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc
david.biedermann@gmail.com

Přípravou kvarterních amoniových solí lupanových triterpenoidů se až do dnešní doby zabývala pouze jediná vědecká práce¹.

Kvarterní sole lupanových triterpenoidů přitom, vzhledem ke své vysoké hydrofilítě, nabízejí potenciálně výborné farmakologické vlastnosti. Kvarterní sole obecně navíc disponují širokou škálou biologických účinků a proto by se mohly zařadit k triterpenoidním sloučeninám z našeho pracoviště s dobře popsanou biologickou aktivitou^{2,3}.

V rámci výzkumu biologické aktivity byly připraveny série kvarterních amoniových derivátů betulinové, dihydrobetulinové, platanové, oleanolové, ursolové a 21 oxokyseliny. Příprava probíhala vesměs reakcí příslušných 2-brommethyl-esterů s terciárními aminy.

Získaná rodina sloučenin byla podrobena *in vitro* testům biologických aktivit. Byla stanovena antimikrobiální, protizánětlivá a cytotoxická aktivita. Některé z připravených sloučenin projeví silnou cytotoxickou a antimikrobiální aktivitu. Struktury všech připravených látek byly potvrzeny spektrálními daty (NMR, IČ, MS).

Režijní náklady byly hrazeny z výzkumného záměru MSM0021620857, derivatizační činidla byla financována z grantu MPO FT-TA/027.

LITERATURA

1. Hammouda Y., Pourrat H.: Proceedings of the Pharmaceutical Society of Egypt 39, 69, (1957).
2. Šarek J., Klinot J., Bražinová S., Džubák P., Klinotová E., Nosková V., Křeček V., Kořínková G., Thomson J. O., Janošťáková A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajdúch M.: J. Med. Chem. 46, 5402 (2003).
3. Džubák P., Hajdúch M., Vydra D., Hustová A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Šarek J.: Nat. Prod. Rep. 23, 394 (2006).

NOVELIZACE ZÁKONA 19/1997 Sb. O NĚKTERÝCH OPATŘENÍCH SOUVISEJÍCÍCH SE ZÁKAZEM CHEMICKÝCH ZBRANÍ A NOVÁ VYHLÁŠKA 208/2008 Sb.

MARKÉTA BLÁHOVÁ a **VÁCLAV VOPÁLENSKÝ**

*Státní úřad pro jadernou bezpečnost, Senovážné náměstí 9, 110 00 Praha 1
marketa.blahova@sujb.cz*

Dnem 1.7.2008 vstoupila v platnost dlouho připravovaná novela zákona č. 19/1997 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem chemických zbraní (CHZ). Původní zákon 19/1997 Sb. byl přijat v ČR v roce 1997. Implementuje do českého právního řádu Úmluvu o zákazu chemických zbraní a zavádí kontrolní režim pro její dodržování na území ČR. Od roku 1997 byl několikrát novelizován (zákonem č. 249/2000 Sb., kterým přecházejí kompetence výkonu a státní administrativy a dozoru v oblasti zákazu CHZ a kontroly z MPO ČR na SÚJB; zákonem č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích; zákon č. 186/2004 Sb., o celní správě). Poslední novela provedena zákonem 138/2008 Sb., zákon 19/1997 Sb. se zásadně nemění, ale zaměřuje se především na implementaci opatření přijatých na konferencích smluvních států Úmluvy o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a o jejich zničení po jejím vstupu v platnost. V novele se rovněž promítly zkušenosti z kontrolní činnosti SÚJB a uplatňování zákona č. 19/1997 Sb. Tímto zákonem byla i zrušena prováděcí vyhláška Ministerstva průmyslu a obchodu č. 50/1997 Sb. Spolu s novelou zákona vstoupila v platnost vyhláška Státního úřadu pro jadernou bezpečnost č. 208/2008 Sb. S platností od 1.7.2008 především nově upravuje ohlašovací povinnost při nakládání se stanovenými látkami a výrobou určitých organických chemických látek. Novou vyhláškou byly výrazně zpřísněny limity pro ohlašování stanovených látek.

LITERATURA

1. Zákon č. 19/1997 Sb. v platném znění.
2. Vyhláška č. 208/2008 Sb.

PŘÍPRAVA A STUDIUM VYSOCE FLUOROVANÝCH LÁTEK

Abstrakt přednášky k ceně Alfreda Badera za bioorganickou chemii za rok 2009

TOMÁŠ BRÍZA

*Vysoká škola chemicko-technologická, ústav analytické chemie, Technická 5, Praha 6, 166 28, Česká republika
Ftor@seznam.cz*

Od objevení a první izolace fluoru roku 1886, uplynulo téměř 70 let, než byly poprvé v 50. letech 20. století připraveny perfluoralkyl jodidy, využívané dodnes jako základní stavební bloky v chemii vysoce fluorovaných látek. Tyto látky jsou dnes

široce využívány například v medicíně, organické syntéze, materiálové chemii a separačních technikách.

Separční techniky využívající právě vysoce fluorované látky, se ukazují jako efektivní řešení v některých oblastech organické syntézy a homogenní katalýzy. Problematickou separací produktu a katalyzátoru v homogenně katalyzovaných reakcích efektivně řeší fluorové dvoufázové systémy. Ty využívají fluorofilní katalyzátor zpravidla připravovaný z daného fluorovaného ligandu.

Vzhledem k tomu, že metodika přípravy cyklopentadienových fluorovaných ligandů nebyla téměř popsána, bylo cílem najít schůdné syntetické cesty pro jejich přípravu a dále studovat jejich vlastnosti vzhledem k využití ve fluorových dvoufázových systémech.

Syntéza cyklopentadienů byla provedena dvěma odlišnými cestami. První byla založená na přímé substituci cyklopentadienového kruhu. Druhá cesta využila cykloadičních reakcí polyfluorovaného alkyne pomocí komplexu zirkonia. Jako základní stavební kámen pro připojení fluorovaného řetězce k cyklopentadienovému kruhu byly zvoleny [2-(perfluoralkyl)ethyl]trifláty. Nejprve byly připraveny mono(polyfluoralkyl)cyklopentadieny. Připojení druhého fluorovaného řetězce bylo provedeno pomocí [2-(perfluoralkyl)ethyl]triflátů. Takto byla připravena série bis(polyfluoralkyl)cyklopentadienů **1**^{1,2} (schéma 1).

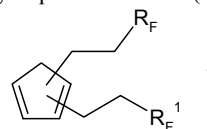


Schéma 1. Bis(polyfluoralkyl)cyklopentadien

Cyklopentadieny **1** byly studovány jako potenciální ligandy při komplexacích s přechodnými kovy. Byly připraveny polyfluorované ferroceny **2**. Tyto komplexy, díky dostatečné stabilitě, byly využity pro studium jejich fluorofilních vlastností. Analogicky byly připraveny komplexy³ rhodia **3**. Na rozdíl od ferrocenů **2** byly komplexy rhodia **3** (schéma 2) nestabilní a podléhaly rozkladu.

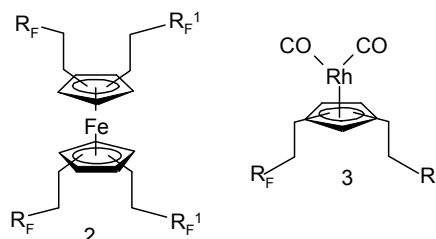


Schéma 2. Komplexy železa a rhodia

Dále byl připraven bis(polyfluoralkyl)acetylen⁴, který byl použit jako stavební blok pro cykloadiční reakce vedoucí k pentasubstituovaným cyklopentadienům. Příprava alkyne **4** byla založena na nukleofilní substituci polyfluoralkylovaného substrátu vhodným acetylidem, (schéma 3).

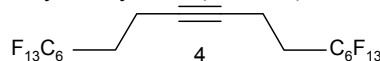


Schéma 3. Bis(polyfluoralkyl)acetylen

Reakcí acetylenů **4** s Negishiho činidlem byl připraven odpovídající polyfluorovaný zirkonacyklopentadien, který byl dále využit pro přípravu cílových pentasubstituovaných cyklopentadienů. (schéma 4).

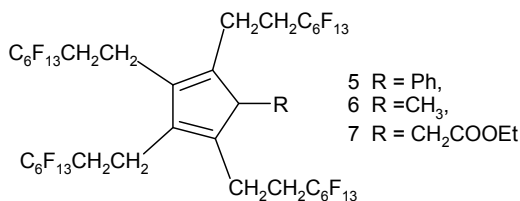


Schéma 4. Deriváty pentasubstituovaných cyklopentadienů

S vybranými pentasubstituovanými cyklopentadieny byly provedeny pokusy o přípravu ferrocenů. Postup byl zvolen analogický³ přípravě ferrocenů **2** z bis(polyfluoralkyl)cyclopentadienů **1**. Cyklopentadieny však za daných podmínek neposkytly odpovídající komplexy. Příčinou je zřejmě velké sterické bránění čtyřmi polyfluorovanými řetězci.

Pro cyklopentadieny **1** a ferroceny **2** byly změřeny a vypočteny veličiny charakteristické pro fluorofilní látky.

TERATURA

1. Bříza T., Kvičala J., Paleta O.; Čermák J.: Tetrahedron 58, 3841 (2002).
2. Bříza T., Kvičala J., Mysík P., Paleta O., Čermák J.: Synlett. 5, 685 (2001).
3. Kvičala J., Bříza T., Paleta O., Čermák J.: Tetrahedron 58, 3847 (2002).
4. Bříza T., Kvičala J., Paleta O.: Collect. Czech. Chem. Commun. 68, 1039 (2003).

MÉNĚ BĚŽNÉ REAKCE V CHEMII CALIX[4]ARENU

JAN BUDKA^a, ALEXANDRA BÍLÁ^a, FILIP ŠEMBERA^a, JAN MOTYČKA^a, VÁCLAV EIGNER^b, MICHAELA POJAROVÁ^b, IVAN STIBOR^a a PAVEL LHOTÁK^a

^aÚstav organické chemie, ^bÚstav chemie pevných látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

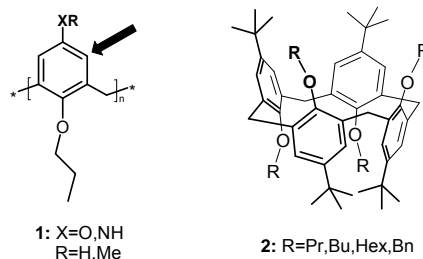
Jan.Budka@vscht.cz

Pro chemii calix[4]arenu jsou typické dva druhy reakcí – substituce spodního okraje, která primárně slouží zejména k zabrždění konformace (snadno tak lze dospět ke třem atropoisomerům ze čtyřech možných: kónickému, částečně kónickému a 1,3-alternujícím) a substituce horního okraje, tj. *para*-poloh fenolických jader.

Tato práce prezentuje několik syntetických příkladů, které doplňují výše uvedené reakce, a to:

a) substituci do *meta*-poloh, která vyžaduje obsazení *para*-polohy vhodným elektron-donorním substituentem, který bude podporovat substituci do vedlejší polohy (**1**)

b) novou dvojestupňovou syntézu, kterou lze v excelentním výtěžku připravit dosud nejhůře dostupný 1,2-alternující atropoisomer (**2**).¹



Tento projekt je podporován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (COST D31 OC134 a Výzkumné centrum LC06070)

LITERATURA:

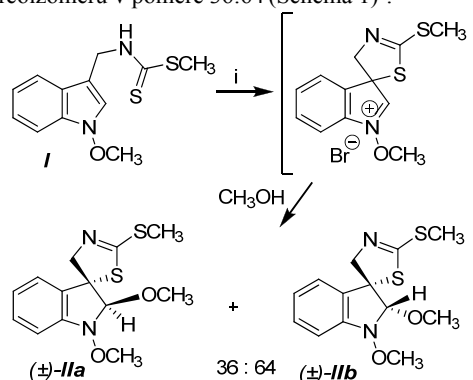
1. Lhoták P., Bílá A., Budka J., Pojarová M., Stibor I.: Chem. Commun. 1662 (2008)

DIASTEREOSELEKTIVITA SPIROCYKLIZÁCIE 1-METOXYBRASINÍNU NA 1-METOXYSPIROBRASINOLMETYLÉTER

MARIANA BUDOVSKÁ, ZUZANA ČURILLOVÁ, PETER KUTSCHY a MARCEL TÖRÖK

Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav chemických vied, Moyzesova 11, 040 01 Košice
mariana.budovska@gmail.com

Spiroindolinový fytoalexín 1-metoxyspirobrasinolmetyléter [(-)-**Ila**] bol v roku 1995 izolovaný z japonskej redkvičky (*Raphanus sativus*) infikovanej baktériou *Pseudomonas cichorii*¹. Prvá syntéza zmesi racemických diastereoizomérov 1-metoxyspirobrasinolmetylétera je založená na cyklizácii 1-metoxybrasinínu (**I**) pôsobením dioxándibromidu (DDB) v dioxáne v prítomnosti metanolu ako nukleofilu za vzniku zmesi prírodného *trans*-(±)-**Ila** a neprírodného *cis*-(±)-**Ilb** diastereoizoméru v pomere 36:64 (Schéma 1)².

Schéma 1. i) DDB, dioxán, CH₃OH, 60%.

Táto skutočnosť nás podnietila k hľadaniu reakčných podmienok, pri ktorých by prednostne vznikal prírodný *trans*-diastereoizomér **IIa**. Výrazná zmena pomeru diastereoizomérov na 69:31 v prospech *trans*-diastereoizoméru (\pm)-**IIa** bola dosiahnutá použitím metoxidu sodného v komplexe s 15-crown-5-éterom namiesto metanolu³. S cieľom ovplyvniť diastereo selektivitu spirocyklizácie jednoduchším spôsobom bol študovaný vplyv rozpúšťadiel a teploty na diastereo selektivitu reakcie. Zistilo sa že v rozpúšťadlách typu éterov prednostne vzniká *cis*-diastereoizomér zatiaľ čo pri nízkych teplotách je uprednostnený vznik *trans*-diastereoizoméru.

Táto práca vznikla s podporou grantu VEGA, č. 1/3553/06.

LITERATÚRA

1. Monde K., Takasugi M., Shirata A.: *Phytochemistry*, **39**, 581(1995).
2. Kutchy P., Suchý M., Monde K., Harada N., Marušková R., Čurillová Z., Dzurilla M., Miklošová M., Mezencev R., Mojžiš J.: *Tetrahedron Lett.* **43**, 9489 (2002).
3. Monde K., Tohru T., Nobuaki M., Kutchy P., Čurillová Z., Pilátová M., Mojžiš J.: *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 5206 (2005).

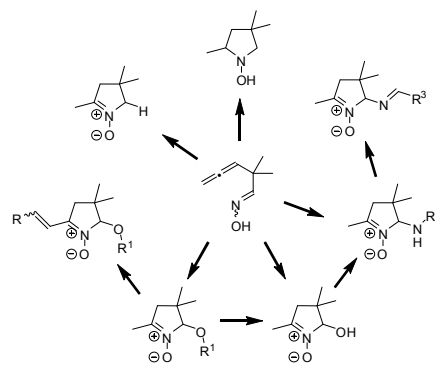
A NEW ALLENYLOXIME SYNTHON IN HETEROCYCLIZATIONS LEADING TO STABLE CYCLIC NITRONES

MARIAN BUCHLOVIČ, STANISLAV MAN, and MILAN POTÁČEK

Department of Chemistry, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic
potacek@chemi.muni.cz

Allene chemistry is recently going through a significant development and finds its use in many different synthetic applications¹. Our work provides a new connection between the allene chemistry and nitron synthesis. Nitrones (azomethine oxides) belong to the important building blocks in organic synthesis and attract a lot of attention because of their wide application in the natural product synthesis².

For our study we have chosen 2,2-dimethyl-3,4-dienal oxime as a principal substance in most of the presented experiments³. We found exceptional potential of this compound in preparation of stable 5-membered cyclic nitrones bearing different functionalities (Scheme 1). Reactions were carried out in aqueous or alcoholic medium and led to isolable products with excellent chemical selectivity. All products were isolated and fully characterized. They were further tested in various transformations.



Scheme 1

REFERENCES

1. (a) Ma S.: *Chem. Rev.* 2005, **105**, 2829; (b) *Modern Allene Chemistry*; Krause N., Hashmi A. S. K., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2004.
2. Padwa, A.; Pearson, W. H. *Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products*; John Wiley and Sons: New York, NY, 2002.
3. (a) Buchlovič M., Man S., Potáček M.: *Tetrahedron*, 2008, **64**, 9953; (b) Man S., Buchlovič M., Potáček M.: *Tetrahedron Lett.* 2006, **47**, 6961.

SYNTÉZA MAKROCYKLŮ S TRITHIAFULVENOVÝMI ČLÁNKY

PETR HOLÝ^a, MICHAL BUCHTA^{a,b} a JIŘÍ RYBÁČEK^a

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
^bVŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
petrholý@uochb.cas.cz; michal.buchta@vscht.cz

V programu syntézy ligandů pro komplexaci fullerenu se věnujeme syntéze makrocyklů, které obsahují trithiafulvenové články (**T**) spojené sulfidovými můstky s vhodnými elektronově bohatými aromatickými platformami (**Ar**). V minulém sdělení jsme prezentovali¹ postupnou výstavbu takového (4+4) makrocyklu (Schéma 1, vzorec **I**) s využitím 4,5-bis(2-kyanoethylthio)-1,3-dithiol-2-thionu² pro články **T** a komerčního 1,4-bis(brommethyl)benzenu pro prvky **Ar**. Dutina tohoto makrocyklu již umožňuje pojmout například molekulu fullerenu C₆₀. Pro posílení elektrondonorového charakteru makrocyklu, pro zlepšení rozpustnostních vlastností a pro ladění velikosti dutiny nyní budujeme tento typ makrocyklů s využitím různých alkoxylovaných aromatických platform. Současně se věnujeme studiu alternativně vznikajících (2+2) makrocyklů (vzorec **II**), v jejichž struktuře omezená flexibilita článků a poloha alkoxy skupin na aromatických jádrech vnáší prvek planární chiralidy do těchto struktur cyklofanového typu.

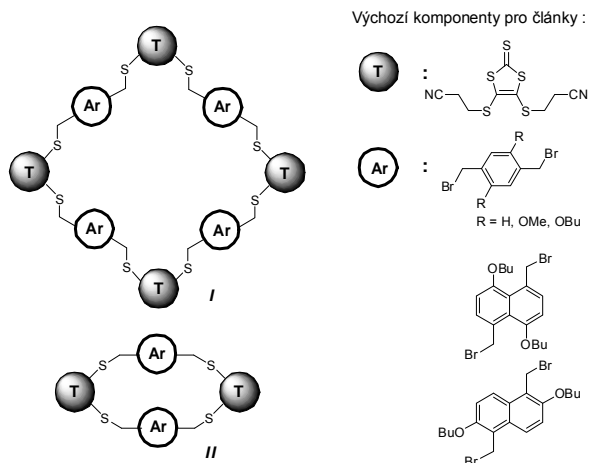


Schéma 1.

Práce byla provedena za finanční podpory GA AV ČR (grant č. IAA400550704) a v rámci výzkumného záměru ZA 055 0506).

LITERATURA

- Holý P., Buchta M., Rybáček J., Lipnická Š., Bělohradský M.: Chem. Listy 101, 932 (2007).
- Simonsen K. B., Svenstrup N., Lau J., Simonsen O., Mørk P., Kristensen G. J., Becher J.: Synthesis 1996, 407.

ISOQUINOLINE ALKALOIDS: POTENT ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORS FROM *ESCHSCHOLTZIA CALIFORNICA* (PAPAVERACEAE)

LUCIE CAHLÍKOVÁ^a, LUBOMÍR OPLETAL^a, JAN SCHRAML^b, MILAN KURFÜRST^b a ONDŘEJ PAVLÍČEK^c

^aDept Pharm. Botany Ecol., Fac. Pharm., Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, ^bInst. Chem. Process Fundament. ASCR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, ^cDept Anal. Chem., Fac. Pharm., Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
Lucie.Cahlkova@faf.cuni.cz

Alkaloids are a major class of plant secondary metabolites that show a wide variety of chemical structures and biological activities; some of them are used in both modern and traditional medicine.

The screening of dry aerial parts and roots of various species from genus *Eschscholtzia* (*E. pulchella*, *E. californica*, *E. oregana*, *E. glauca*, *E. lobbii*) was carried out in term of the effect on erythrocyte acetylcholinesterase with the use of autobiographic method utilizing TLC (colour reaction of 1-naphthol and Fast Blue B). The best inhibition gave taxon *Eschscholtzia californica* CHAM (aerial parts with roots). This taxon was selected for the isolation of alkaloids.

The Californian poppy, *Eschscholtzia californica* Cham. (*Papaveraceae*), is an annual plant originating from California where it colonizes coastal dunes and arid areas. The aerial parts

of Californian poppy is used in folk medicine. Its chemical composition is well known and about 30 tertiary and quaternary isoquinoline alkaloids belonging to six types have been identified.

The extract of alkaloids was prepared by percolation of dry herb with roots (36,54 kg) by 95% EtOH. Some alkaloids were separated in the form of pseudo-cyanides from this extracts. The rest was separated into bases which chlorides are soluble and insoluble in chloroform. Phenolic and nonphenolic alkaloids were obtained from each of fractions. Each of fraction was purified by chromatography on silica gel and alumina and structures of isolated alkaloids were determined by physical and spectroscopic methods.

Some alkaloids (scoulerine, reticuline) were isolated for the first time from this taxon. All isolated alkaloids were tested on their ability to inhibit erythrocyte acetylcholinesterase and further mathematical calculation established the value IC₅₀ for each isolated alkaloid.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grant No 203/06/0738 and Grant Agency of the Academy of Science of the Czech Republic, grant No IAA400720706.

REFERENCES

- Fabre N., Claparols C., Richelme S., Angelin M.-L., Fourasté I., Moulis C.: J. of Chrom. A, 904, 35, (2000).

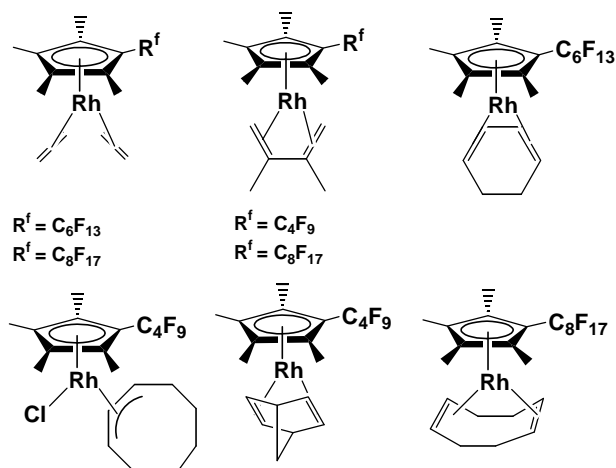
ALKENE AND DIENE COMPLEXES WITH [(C₅Me₄C_nF_{2n+1})Rh] FRAGMENT

JAN ČERMÁK, TOMÁŠ STRAŠÁK, ALENA KRUPKOVÁ a KATEŘINA AUEROVÁ

Institute of Chemical Process Fundamentals, ASCR, v.v.i., Rozvojová 135, 16502 Prague 6, Czech Republic, cermak@icpf.cas.cz

Recently, we prepared higher homologs of the Gassman tetramethyltrifluoromethylcyclopentadienyl ligand¹. These ligands of the formula C₅(CH₃)₄C_nF_{2n+1} (Cp^{+R^{fin}}) were found to be, similarly to the original Gassman ligand, electronically close to unsubstituted cyclopentadienyl ligand², independently of the length of perfluorinated chain (n = 4,6,8,10). Steric properties were appreciated by comparison of the hindrance caused to free rotation of triarylphosphine ligands by Cp^{+R^{fin}}Rh fragment with the known hindrance caused by Cp^{*}Rh fragment³. No rhodium(I) complexes with Cp^{+R^{fin}} ligands are known except some [Cp^{+R^{fin}} Rh(CO)₂] complexes; we report here synthesis and properties of new alkene and diene complexes with those ligands.

The complexes were prepared starting from [Rh(Cp^{+R^{fin}})Cl(μ-Cl)]₂ dimers by reduction in the presence of an unsaturated ligand and the following compounds (Scheme 1) were obtained.



Scheme 1

Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic is gratefully acknowledged for support (LC06070).

REFERENCES

- Gassman P.G., Mickelson J.W., Sowa J.R. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 6942.
- Čermák J., Auerová K., Nguyen H.T.T., Blechta V., Vojtišek P., Kvičala J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2001, 66, 382.
- Čermák J., Žádný J., Krupková A., Lopatová K., Vlachová A., Nguyen Thi T.H., Šauliová J., Sýkora J., Císařová I. *J. Organomet. Chem.* 2007, 692, 1557.

SELECTIVITY IN REDUCTIONS OF 7-KETOSTEROIDS WITH SODIUM BOROHYDRIDE

IVAN ČERNÝ^a, EVA ŠTASTNÁ^{a,b}, VLADIMÍR POUZAR^a, and HANA CHODOUNSKÁ^a

^aInst. Org. Chem. Biochem. AS CR, Flemingovo. 2, 166 10 Prague 6; ^bDept Org. Chem., Faculty of Science, Charles University in Prague Albertov 6, 128 43 Prague 2
cerny@uochb.cas.cz; stastna@uochb.cas.cz

The reduction reactions with sodium borohydride in tetrahydrofuran – methanol mixtures on 5 α -androstane, pregnane, or cholestane skeletons were studied (Figure 1). Instead of the expected equatorial 7 β -hydroxy product¹, the axial 7 α -hydroxy derivatives significantly prevailed. We have revealed that the selectivity of borohydride reduction can be reversed on addition of cerium(III) salts. Using K- or L-Selectride^{2,3} in tetrahydrofuran, the 7 α -hydroxy derivative was formed nearly exclusively.

The synthetic and stereochemical aspects will be discussed.

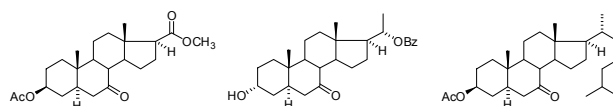


Figure 1.

This work was supported by the MŠMT project LC 06077, Grant Agency of the Czech Republic 203/08/1498 and Research Project of the AS CR Z4 055 0506.

LITERATURE

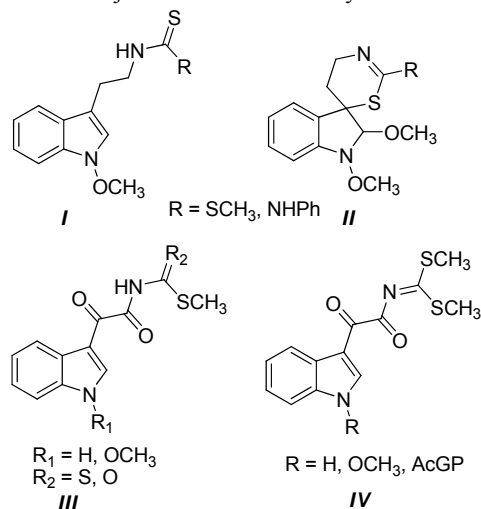
- Muruyama S., Ogihara N., Adachi I., Ohtawa J., Morisaki M.: *Chem. Pharm. Bull.* 35, 1847 (1987).
- Chodounská H., Kasal A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 1543 (1998).
- Pouzar V., Černý I., Hill M., Bičíková M., Hampl R.: *Steroids* 70, 739 (2005).

HOMO A OXOACETYL ANALÓGY INDOLOVÝCH FYTOALEXÍNŮV

ANDREJ SÝKORA^a, ZUZANA ČURILLOVÁ^a, PETER KUTSCHY^a, MARTINA PILÁTOVÁ^b a JÁN MOJŽIS^b

^aUniverzita P. J. Šafárika, PrF, Ústav chemických vied, Moyzesova 11, 040 01 Košice; ^bUniverzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta, Ústav farmakológie, Tr. SNP 1, 040 66 Košice
zuzana.curillova@upjs.sk

Pre výskum nových látok s protinádorovou aktivitou sú zaujímavými predlohovými štruktúrami indolové fytoalexíny izolované z rastlín čeľade *Križokveté*, keďže je známe, že ich konzumácia znižuje riziko vzniku rakoviny¹.



Predĺženie alkanového linkera u indolového fytoalexínu brasíninu vedie k zvýšeniu inhibície indolamín 2,3-dioxygenázy (IDO), ktorá je novým kancerimunopresivným cieľom². Významnú protinádorovú aktivitu *in vitro* a *in vivo*

mají i některé oxoacetylové deriváty indolov³. V této práci sme študovali syntézu homo- (**I**, **II**) a oxoacetyl- (**III**, **IV**) analógov niektorých indolových fytoalexínov a ich antiproliferatívnu aktivitu.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0514-06 a grantom VEGA č. 1/3365/06

LITERATURA

1. Steinmetz K. A., Potter J. D.: J. Am. Diet. Assoc, 10, 1027 (1996).
2. Gaspari P., Banerjee T., Malachowski W. P., Muller A. J., Prendergast G. C., DuHadaway J., Bennett S., Donovan A. M.: J. Med. Chem. 49, 6844, (2006).
3. Bacher G., Nickel B., Emig P., Vanhoefer U., Seeber S., Shandra A., Klenner T., Beckers T.: Cancer Res. 61, 392 (2001).

SYNTÉZA SELEKTIVNĚ DISUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ ALFA-CYKLODEXTRINU PRO CHEMOSEZORICKÉ APLIKACE

MARTIN DIVIŠ^a a JINDŘICH JINDŘICH

Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 43, Praha 2, jindrich@natur.cuni.cz

Cílem této práce je příprava chemosenzorické jednotky, která je schopna selektivně kopplexovat malé organické molekuly, které neabsorbují v UV oblasti. Chemosenzor bude možno navázat na pevnou fázi.

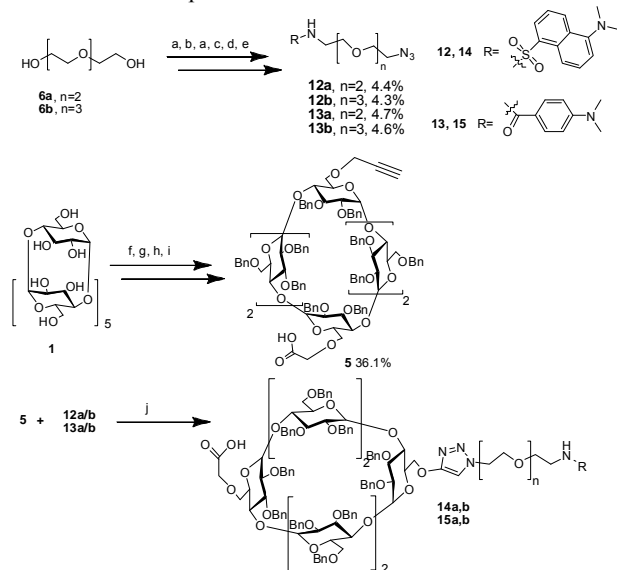


Schéma 1. a: TsCl, Et₃N, DCM; b: NaN₃, DMF 110 °C; c: ftalimid draselný, DMF, 80 °C; d: N₂H₄, MeOH, reflux 2h, poté konc. HCl, H₂O, reflux 1h; e: RCl, Et₃N, DCM, MeCN; f: BnCl, NaH, DMSO;

g: DIBAL-H (PhMe 1,5M); h: propargylbromid, NaH, THF; i: *tert*-butylbromacetát, NaH, DMF, 80 °C; j: CuI, DIEA, toluen, 80 °C.

Chemosenzorická jednotka se skládá ze 3 stavebních kamenů: 1) selektivně substituované jádro alfa-cyklohextrinu^{1,2}, 2) fluoroforní oligoethylenglykolový linker s modifikovatelnou délkou řetězce, 3) oligoethylenglykolový linker pro vázání na pevnou fázi. Tyto stavební kameny budou spojeny „click“ reakcemi³.

Tento projekt je podporován granty MSM0021620857.

LITERATURA

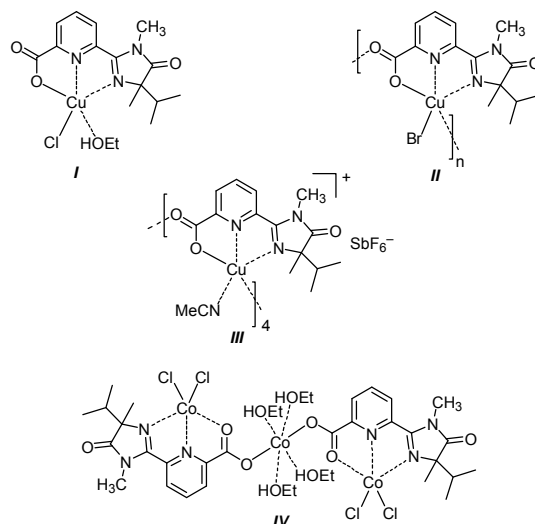
1. Lecourt T., Herauld A., Pearce A.J., Sollogoub M., Sinaý P.: Chem. Eur. J. 2004, 2960.
2. Bistri O., Lecourt T., Mallet J-M., Sollogoub M., Sinaý P.: Chem. Biodivers. 1, 129 (2004).
3. Marra A., Vecchi A., Chiappe C., Melai B., Dondoni A.: J. Org. Chem. 73, 2458 (2008).

KOBALTNATÉ A MĚDNATÉ KOMPLEXY 6-(4,5-DIHYDRO-1H-IMIDAZOL-5-ON-2-YL)PYRIDIN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY

PAVEL DRABINA^a, PETR FUNK^a, ALEŠ RŮŽIČKA^b a MILOŠ SEDLÁK^a

^aÚstav organické chemie a technologie a ^bKatedra obecné a anorganické chemie, FCHT, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice
Pavel.Drabina@upce.cz

Komplexy 4,5-dihydro-1H-imidazol-5-onů s kovy nacházejí uplatnění jako homogenní katalyzátory některých chemických procesů¹⁻³.



Připravili jsme kobaltnaté a měďnaté komplexy 6-(4-isopropyl-1,4-dimethyl-4,5-dihydro-1H-imidazol-5-on-2-yl)pyridin-2-

karboxylové kyseliny **I-IV**. Strukturu komplexů jsme analyzovali rentgenovou difrakcí, hmotnostní spektroskopií a elementární analýzou. Zjistili jsme, že v pevné fázi se měďnatý komplex s chloridovým atomem **I** vyskytuje v monomerní formě, zatímco měďnatý komplex s bromidovým atomem **II** vytváří polymerní strukturu. Z komplexu **I** jsme připravili komplex **III**, který v pevné fázi vytváří tetramer. Strukturní analýzou kobaltnatého komplexu **IV** jsme zjistili, že se jedná o trinukleární komplex, kde jeden atom kobaltu je vázán karboxylovými skupinami dvou molekul ligandu a další dva atomy kobaltu jsou koordinovány k jednotlivým ligandům.

Práce byla podpořena projektem MŠMT ČR, MSM 0021627501 a grantem GA ČR 203/08/P010.

LITERATURA

1. Sedlák M., Drabina P., Keder R., Hanusek J., Císařová I., Růžička A.: *J. Organomet. Chem.* 691, 2623 (2006).
2. Nečas D., Drabina P., Sedlák M., Kotora M.: *Tetrahedron Lett.* 48, 4539 (2007).
3. Drabina P., Sedlák M., Růžička A., Malkov A. V., Kočovský P.: *Tetrahedron: Asymmetry* 19, 384 (2008).

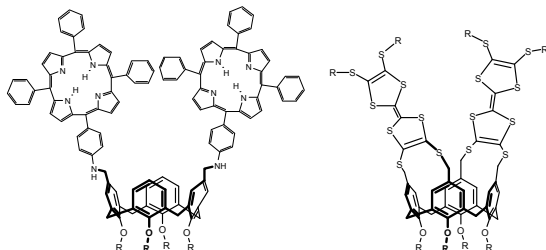
NOVÉ FULLERENOVÉ RECEPTORY NA BÁZI CALIX[4]ARENU

KAROLÍNA FLÍDROVÁ, ONDŘEJ KUNDRÁT, MICHAL HIML, JAN BUDKA, MICHAL VALÁŠEK*, IVAN STIBOR, PAVEL LHOTÁK

Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; *Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
flidrovk@vscht.cz

Calixareny a jejich deriváty jsou známy pro svou schopnost komplexovat ionty i neutrální molekuly. V současné době se zabýváme syntézou fullerenových receptorů na bázi porfyrin- a TTF-calixarenových derivátů. Nově jsme připravili derivát který na horním okraji nese porfyrinové jednotky a na spodním okraji dlouhé dialkylsulfidy umožňující tvorbu self-assembled monolayers (SAM) na povrchu zlata. Takové deriváty by mohly být v budoucnu použity při vývoji senzorů.

Dále se také intenzivně zabýváme přípravou dosud málo prozkoumaných TTF-calixarenových konjugátů. Naše první výsledky naznačují, že by se mohlo jednat o látky s pozoruhodnými komplexačními vlastnostmi nejen vůči fullerenům, ale i aromátům.



Obrázek 1: porfyrin- a TTF-calixarenové konjugáty

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (LC 06070 a COST D31 OC134).

LITERATURA

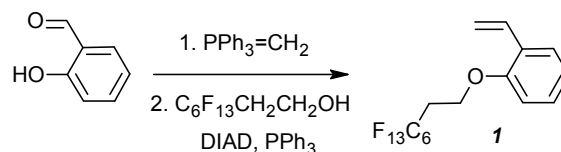
1. Kundrát O., Lhoták P.: *Tetrahedron Lett.* 48, 6620 (2007).
2. Ulman A.: *Chem. Rev.* 96, 1533 (1996).
3. Blesa M.-J., Zhao B.-T., Allain M., Mercier N., Sallé M.: *Phosph. Sulf. Silicon*, 180, 1475 (2005).

PŘÍPRAVA FLUOROVÝCH LIGANDŮ S VYUŽITÍM MITSUNOBUOVY REAKCE

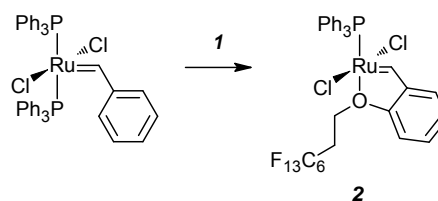
VERONIKA FRAŇKOVÁ, LAUDINE DUCROCQ, MARTIN SCHINDLER, MARKÉTA RYBÁČKOVÁ, MARTIN SKALICKÝ A JAROSLAV KVÍČALA

Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
frankov@vscht.cz; kvicalaj@vscht.cz

Cílem naší práce byla syntéza polyfluorovaných ligandů, které by dále mohly být využity pro tvorbu komplexů s přechodnými kovy. V rámci studia modifikace Grubbsova katalyzátoru jsme nejprve Wittigovou reakcí 2-hydroxybenzaldehydu a následnou Mitsunobuovou reakcí¹ s perfluorovaným alkoholem připravili ligand **1**.



Reakce ligandu **1** a Grubbsova katalyzátoru první generace vedla v analogii k publikované syntéze Hoveyda-Grubbsova katalyzátoru² ke komplexu **2**, novému katalyzátoru pro metateze olefinů.



Ve druhé části naší práce jsme pomocí ³¹P NMR a ¹⁹F NMR spektroskopie studovali Mitsunobuovu reakci 2,2,2-tripyrzolyethan-1-olu s fluorovanými alkoholy s cílem získat fluorovou variantu tripyrazolymethanového ligandu³.

Děkujeme Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (výzkumné centrum LC06070, výzkumný záměr č. 6046137301, projekt KONTAKT ME 857) a Grantové

agentúre Českej republiky (projekt č. 203/06/1511) za finančnú podporu tohoto projektu.

LITERATURA

1. Camp D., Jenkins I. D.: *J. Org. Chem.* 54, 3045 (1989).
2. Kingsbury J. S., Harrity J. P. A., Bonitatebus J., Hoveyda A. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 121, 791 (1999).
3. Trofimenko S.: *Chem. Rev.* 93, 943 (1993).

VYUŽITIE AKRIDONYL KARBOXYHYDRAZIDOVÝCH INTERKALÁTOROV PRI DERIVATIZÁCI NOVÝCH BIOLOGICKY ZAUJÍMAVÝCH AZOMETÍNŮV A 1,3,4-OXADIAZOLOV

ZDENKA FRÖHLICHOVÁ, JANA TOMAŠČIKOVÁ,
JÁN IMRICH, PAVOL KRISTIAN, IVAN DANIHEL,
DANICA SABOLOVÁ

Univerzita P. J. Šafárika, Prírodovedecká fakulta, Ústav chemických vied, Moyzesova 11, 040 01 Košice
zdenka.frohlichova@upjs.sk

Antikancerogénna účinnosť mnohých akridínových liečiv spočíva v inhibícii topoizomeráz¹. Nedávno boli publikované výsledky² screeningu akridínylkarboxamidov, ktoré nás podnietili k syntéze nových farmakofórov akridonyl karboxyhydrazidového typu.

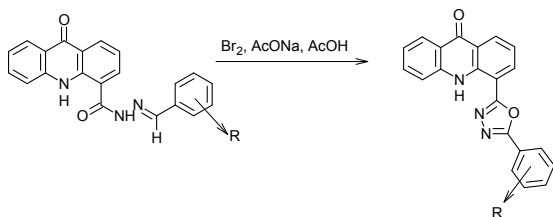


Schéma 1. Cyklizácia azometínu

Ako východiskový syntón sme použili ľahko dostupnú akridón-4-karboxylovú kyselinu, ktorej vhodnou derivatizáciou sme pripravili príslušný karboxyhydrazid. Ten po kondenzačnej reakcii s komerčne dostupnými aldehydmi poskytol azometíny. Následnou cyklizačnou reakciou v prítomnosti brómu a octanu sodného sme dostali konečný produkt 2,5-substituovaný 1,3,4-oxadiazol³. Syntetizované zlúčeniny boli charakterizované pomocou ¹H, ¹³C a ¹⁵N NMR, FTIR, UV-vis/fluorescenčnou spektroskopiou a kvantovo-chemickými výpočtami.

Predbežné biologické testy spočívali v stanovení interkalačného efektu študovaných zlúčenín s ctDNA (väzbová konštanta K = 9,2-5,3 × 10⁴ M⁻¹).

Táto práca vznikla za podpory grantovej agentúry VEGA (1/0476/08 a 1/0053/08) a štátneho programu NMR (2003SP200280203).

LITERATÚRA

1. Adams A., Guss J.M., Collyer C.H., Denny W.A., Prakash A.S., Wakelin L.P.G.: *Mol. Pharmacol.* 58, 649 (2000).
2. Harrison R.J., Reszka A.P., Haider S.M., Romagnoli B., Morrell M.A., Read M.A., Gowan S.M., Incles C.M., Kelland L.R., Neidle S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 5845 (2004).
3. Fröhlichová Z., Tomaščíková J., Imrich J., Kristian P., Danihel I., Böhm S., Sabolová D., Kožurková M., Klika K.D.: *Heterocycles*, v tlači.

BIKATALÝZA VE FARMACEUTICKEJ CHEMII

JOSEF HÁJÍČEK

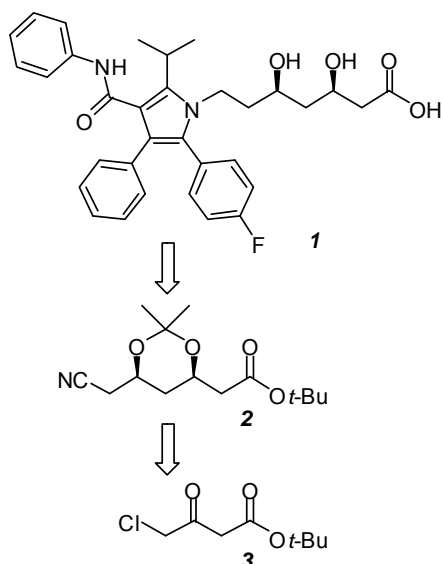
R&D Divize, Zentiva, a.s., U Kabelovny 130, 10237 Praha 10
josef.hajicek@zentiva.cz

Ty tam jsou doby, kdy nové přípravky, obsahující chirální farmaceuticky účinné látky (API), byly uváděny na trh v podobě racemátů. Významné z nich byly později vyráběny v opticky aktivní formě (chiral switches). Nově vyvíjené API mají často několik chirálních center, přičemž léčivá forma musí obsahovat jediný stereoisomer. Toto klade vysoké nároky na jejich syntézu.

K přípravě opticky aktivních sloučenin má nejen farmaceutický chemik k dispozici mohutný arzenál asymetrických procesů. Požadavky kladené na optickou čistotu API jsou však tak přísné, že je někdy ani obecně vysoce enantioselektivní reakce nedokážou splnit. A zde se otvírá pole pro aplikaci biokatalytických procesů, které v optimalizované podobě jsou stereospecifické. Enzymatické procesy si v současné době zaslouží pozornost jako plnohodnotné syntetické metody. Budou zmíněny a vyvráceny některé mýty, které jsou s biokatalyzátory spojeny. Na konkrétních příkladech aplikací ve výrobě budou diskutovány podmínky biokatalytických procesů, a jejich srovnání s chemickými procesy. Na enzymatické syntéze kyanesteru **2** z ketoesteru **3**, meziproductu výroby atorvastatinu (**1**), bude ukázáno, jak efektivní tyto reakce v optimální podobě mohou být. Budou zmíněna i ekonomická hlediska aplikací biokatalyzátorů.

LITERATURA

1. Faber K.: *Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook.* Springer, Berlin 2004.
2. Breuer M., Dittrich K., Habicher T., Hauer B., Kessler M., Stürmer R., Zelinski T.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 788 (2004).
3. Nakamura K., Yamanaka R., Matsuda T., Harada T.: *Tetrahedron Asym.* 14, 2659 (2003).
4. Nakamura K., Matsuda T.: *Curr. Org. Chem.* 10, 1217 (2006).
5. De Wildeman S. M. A., Sonke T., Schoemaker H. E., May O.: *Acc. Chem. Res.* 40, 1260 (2007).
6. Leresche J. E., Meyer H.-P.: *Org. Proc. Res. Dev.* 10, 572 (2006).

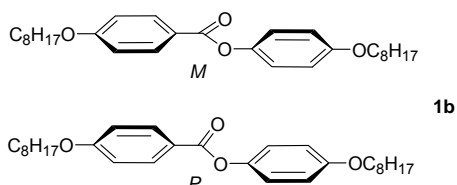


NOVÉ KAPALNÉ KRISTALY S LATERÁLNÍ SUBSTITUCÍ JÁDRA

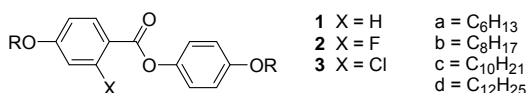
MICHAL ŠÁMAL^a, FRANTIŠEK HAMPL^a,
JIRÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b
a MILADA GLOGAROVÁ^b

^a VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^b Fyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
hamplf@vscht.cz

Nedávno se objevily práce diskutující podstatu vzniku chirálních domén ve smektické C fázi tvořené achirálním 4-(oktyloxy)fenyl-4-(oktyloxy)benzoátem (**1b**). Tento zajímavý jev vysvětlují autoři^{1,2} zvýšením bariéry rotace okolo vazeb rovnoběžných s podélnou osou "jádra" mesogenu v kapalně krystalickém stavu; domény jsou pak tvořeny chirálními konformery esteru **1b**. Toto vysvětlení však jiní autoři³ zpochybňují.



Předpokládali jsme, že laterální substituce v *ortho* polohách k esterové skupině by u látky **1** měla zvýšit bariéru rotace okolo vazeb, a tak podpořit vznik konformační chiralit v mesofázích. Pro studium mesomorfního chování uvedeného typu látek jsme syntetizovali jak homology esteru **1**, tak jeho halogenované analogy **2** a **3**.



Studium mesomorfního chování připravených látek bylo provedeno pomocí optické polarizační mikroskopie a kalorimetrických měření (DSC). Výsledky ukázaly, že pro laterální substituci jsou vhodné pouze atomy fluoru; substituce objemnějším chlorem vedla k potlačení mesofází. Zavedením atomu fluoru do molekuly mesogenu se výrazně snížily přechodové teploty u jednotlivých fází. Důkaz existence chirálních domén v mesofázích bude předmětem dalšího studia.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM6046137301.

LITERATURA

1. Kajitani T., Masu H., Kohmoto S., Yamamoto M., Yamaguchi K., Kishikawa K.: *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1124 (2005).
2. Choi S. W., Fukuda K., Nakahara S., Kishikawa K., Takanashi Y., Ishikawa K., Watanabe J., Takezoe H.: *Chem. Lett.* **35**, 896 (2006).
3. Walba D. M., Korblova E., Huang C. C., Shao R., Nakata M., Clark N. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 5318 (2006).

SROVNÁNÍ REAKTIVITY DERIVÁTŮ 1,2,4-DITHIAZOLU PŘI SULFURACI TRIFENYL-FOSFITU

JIRÍ HANUSEK

Univerzita Pardubice, FCHT, Ústav organické chemie a technologie, Nam. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice
Jiri.Hanusek@upce.cz

V poslední době roste význam a využití thiofosfátových analogů oligonukleotidů, a proto roste zájem i o syntézu těchto sloučenin. V nedávné minulosti bylo připraveno a úspěšně použito velké množství sulfuračních činidel vhodných pro zavedení atomu síry na fosfor v oxidačním stavu III. Jako nejvhodnější se jeví deriváty 1,2,4-dithiazolu. Doposud však nebylo provedeno kvantitativní srovnání jejich sulfuračních schopností s ohledem na jejich reaktivitu vůči P(III) sloučeninám, stabilitu a také jejich rozpustnost v různých rozpouštědlech. V tomto příspěvku je srovnána reaktivita 3-ethoxy-1,2,4-dithiazol-5-onu (*I*) (EDITH), 3-methyl-1,2,4-dithiazol-5-onu (*II*) (MEDITH), 3-fenyl-1,2,4-dithiazol-5-onu (*III*), 3-fenyl-1,2,4-dithiazol-5-thionu (*IV*), 3-amino-1,2,4-dithiazolidin-3,5-dionu (DTsNH) (*VI*) a 4-fenyl-1,2,4-dithiazolidin-3,5-dionu (*VII*) vůči trifenyl-fosfitu v acetonitrilu, dichlormethanu, methanolu a tetrahydrofuranu při 25 °C.

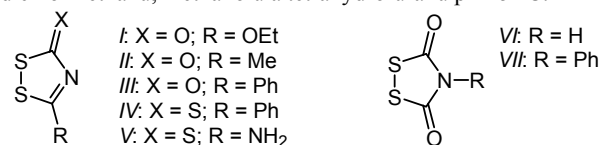


Schéma 1.

Jako nejlepší sulfurační činidlo, s ohledem na jeho vysokou reaktivitu, stabilitu a výbornou rozpustnost, se jeví 3-ethoxy-1,2,4-dithiazol-5-on (*I*). Pro tento derivát byla rovněž

studována sulfurační reakce s ohledem na vznikající vedlejší produkty, které by eventuálně mohly způsobovat komplikace při syntéze modifikovaných oligonukleotidů. Bylo zjištěno, že vedlejším produktem není v literatuře¹ zmíněný ethylkyanát a sirouhlík ale velmi reaktivní ethoxythiokarbonylsokyanát. Toto zjištění má rovněž zásadní význam pro návrh mechanismu sulfurace. Podobné chování^{2,3} vykazuje i 3-amino-1,2,4-dithiazol-5-thion (V).

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR č. 0002 162 7501.

LITERATURA

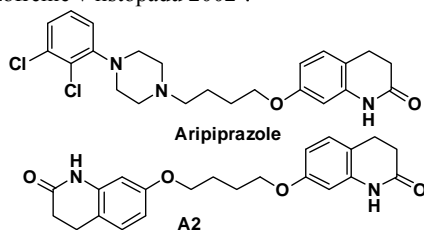
1. Chen L., Thompson T. R., Hammer R. P., Barany G.: *J. Org. Chem.* 61, 6639 (1996).
2. Hanusek J., Russel M. A., Laws A. P., Page M. I.: *Tetrahedron Lett.* 48, 417 (2007).
3. Hanusek J., Russell M. A., Laws A. P., Jansa P., Atherton J. H., Fettes K., Page M. I.: *Org. Biomol. Chem.* 5, 478 (2007).

ARIPIPAZOL – MODERNÍ ANTIPSYCHOTIKUM, NEČISTOTY VZNIKAJÍCÍ PŘI SYNTÉZE

LUDMILA HEJTMÁNKOVÁ a PETR LUSTIG

*Zentiva a.s., Dolní Měcholupy 130, 102 01 Praha
Ludmila.Hejtmankova@zentiva.*

Aripiprazol je antipsychotikum pro léčbu psychóz. Stejně jako u jiných antipsychotik, mechanismus účinku aripiprazolu není přesně znám. Zřejmě, jako jiná antipsychotika, blokuje některé nervové receptory v mozku před účinky příslušných neurotransmiterů (nízkomolekulární sloučeniny uvolňované z nervového zakončení na synapsi). Předpokládá se, že účinek aripiprazolu je založen na působení na dopaminové a serotoninové receptory. Ovlivnění těchto receptorů je komplexní, jedná se o jejich stimulaci, avšak nižší než u přirozeně se vyskytujících neurotransmiterů (proces se nazývá parciální agonismus). FDA povolila aripiprazol pro léčbu schizofrenie v listopadu 2002¹.



V literatuře je popsáno několik syntetických postupů přípravy Aripiprazolu^{2,3}. Jejich reprodukci jsme zjistili, že syntéza je komplikována vedlejšími reakcemi a získaný produkt obsahuje nečistoty, které snižují výtěžek a kvalitu API. Jednou z nejdůležitějších je sloučenina **A2** (viz obrázek). Proto jsme provedli izolaci, identifikaci a nezávislou syntézu vybraných nečistot. Dále jsme vyvinuli a optimalizovali vlastní

postup přípravy, kde je vznik těchto látek vyloučen, případně minimalizován⁴.

LITERATURA

1. www.medicinenet.com.
2. Oshiro Y., Sato S., Kurahashi N., US 5.006.528, 31.10.1988.
3. Banno K., Fujioka T., Kikuchi T., Oshiro Y., Hiyama T., Nakagawa K.: *Chem. Pharm. Bull.* 36, 4377 (1988).
4. Hejtmankova L., Dostalova J., Lustig P., CZ 299485, 18.4.2007.

THIOIMIDY: NOVÉ EFEKTIVNÍ REAGENTY PRO PŘÍPRAVU THIOESTERŮ Z KARBOXYLOVÝCH KYSELIN

ADAM HENKE a JIRÍ ŠROGL

*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, Praha – Dejvice,
jsrogl@uochb.cas.cz*

Thiolestery jsou důležitou skupinou látek nalézající uplatnění v medicíně jako části biologicky aktivních molekul, ale také v organické syntéze např. jako stabilní analoga acylhalogenidů v procesech katalyzovaných přechodnými kovy¹.

V minulosti byla vypracována celá řada metod přípravy thiolesterů využívající převážně velmi reaktivní acylační činidla. Hlavními výhodami našeho přístupu přípravy thiolesterů z thioimidů resp. substituovaných benzo[*d*]isothiazol-3-onů a karboxylových kyselin pomocí tributylfosfinu jsou velmi mírné nebazičké podmínky tolerující řadu funkčních skupin, krátký reakční čas, snadné zpracování a purifikace (schéma 1)². Touto metodou lze snadno získat celou řadu thiolesterů ve velmi dobrých výtěžcích, které by jinými metodami byly jen těžko syntetizovatelné.

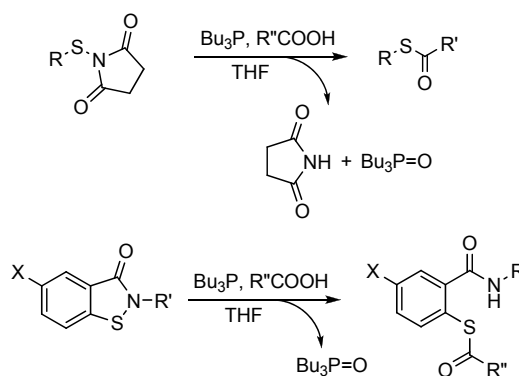


Schéma 1.

Tato práce vznikla za podpory GAČR (203/08/1318)

LITERATURA

1. a) Savarin C., Srogl J., Liebeskind L. S.: *Org. Lett.* 3, 91 (2001). b) Liebeskind L. S., Srogl J.: *J. Am. Chem. Soc.*

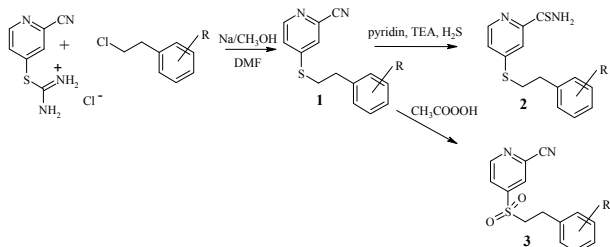
- 122, 11260 (2000). c) Villalobos J. M., Srogl J., Liebeskind L. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 15734 (2007)
2. Henke A., Srogl J.: *J. Org. Chem.* 2008, in press.

SYNTÉZA A ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA FENETHYLSULFANYLOVÝCH DERIVÁTŮ PYRIDINU

PETRA HERZIGOVÁ^a, LUKÁŠ SÝKORA^a, JARMILA KAUSTOVÁ^b a VĚRA KLIMEŠOVÁ^a

^aUK v Praze, FarmF v Hradci Králové, KAOCH, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; ^bNárodní referenční laboratoř pro *Mycobacterium kansasii*, ZÚ Ostrava, Partyzánské nám. 7, 702 00 Ostrava
herzigovap@faf.cuni.cz

Po prokázání antimykobakteriální aktivity 4-benzylsulfanylových derivátů pyridinu^{1,2} jsme se rozhodli prodloužit spojovací alifatický řetězec o jednu CH₂ skupinu a připravit tak fenethylsulfanylové deriváty. Byly připraveny na fenylu substituované série 4-fenethylsulfanylpyridin-2-karbonitrilu a 4-fenethylsulfanylpyridin-2-karbothioamidu. Další obměna látek byla oxidace sulfidické síry za vzniku sulfonů.



Připravené sloučeniny byly testovány na *Mycobacterium tuberculosis* a potenciálně patogení kmeny mykobakterií – *M. avium* a *M. kansasii* v podmínkách *in vitro*. Z hodnot minimálních inhibičních koncentrací (MIC) vyplynulo, že prodloužením délky spojovacího řetězce mezi pyridinovou a fenylou částí molekuly dochází k zvýšení aktivity látek.

Problematika byla řešena za podpory výzkumného záměru MSM 0021620822 a grantu GAUK 56807/B/2007.

LITERATURA

- Klimešová V., Svoboda M., Waisser K., Pour M., Kaustová J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 417 (1999).
- Klimešová V., Palát K., Waisser K., Klimeš J.: *Int. J. Pharm.* 207, 1 (2000).

PŘÍKLAD SYNTETICKÉHO VYUŽITÍ WEINREBOVA AMIDU

PETR HEZKÝ^a a JINDŘICH JINDŘICH^b

^aÚOCHB AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10, Praha 6;; ^bKatedra organické a jaderné chemie PŘF Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2
hezky@uochb.cas.cz; jindrich@natur.cuni.cz

Byla použita nová syntetická metodologie pro přípravu kyseliny (*S*)-*N*-Boc-2-amino-3-azidopropionové(**I**) z *N*-Boc-L-Serinu(**II**)¹. Klasická přímá syntéza azidoderivátu z methylesteru hydroxylátky **I** přes tosylderivát (respektive mesylderivát) a jeho reakcí s azidem sodným v tomto případě selhává. Z důvodu kyselosti α -vodíku je totiž upřednostněna eliminace před substitucí a majoritním produktem je nežádoucí α,β -nenasyčená kyselina, resp. její ester. Možným řešením je volnou karboxylovou kyselinu nejprve převést na *N*-methoxy-*N*-methylamid (tzv. Weinrebův amid), kyselost α -vodíku je tímto redukována a azidoderivát **II** vzniká standardním postupem ve vysokém výtěžku.

Látka **II** je meziproduktem pro přípravu třífunkčního spojovacího linkeru, použitelného pro konstrukci cyklodextrinového chemosenzoru s potenciální možností jeho kotvení na pevnou fázi.

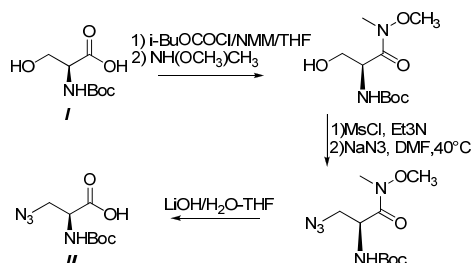


Schéma 1, NMM = *N*-methylmorfolin

Tato práce vznikla za podpory grantu MSM0021620857

LITERATURA

- Panda G., Rao N.V.: *Synlett* 4, 714 (2004)

COUPLINGOVÉ REAKCIE 1-ETYNYLDEOXYRIBÓZY

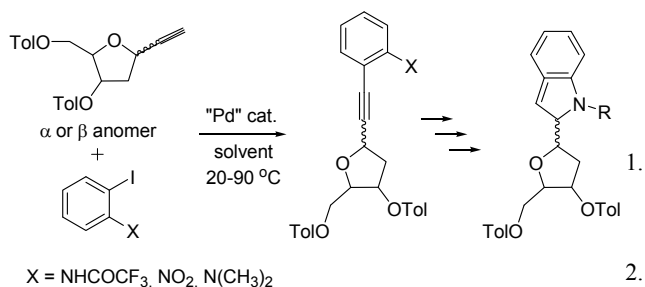
DENISA HIDASOVÁ^a, DAVID NEČAS^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
katora@natur.cuni.cz, david.necas@seznam.cz

Vzhľadom k vlastnostiam a potenciálnym aplikáciám C-heteroaryl nukleozidov, zvlášť teda indenylových derivátov, je ich syntéza zaujímavou oblasťou¹. Napríklad, bolo ukázané, že C-aryldeoxyribosidy môžu byť pripravené z príslušných α - a β -anomérov 1-etynyldeoxyribózy katalytickou cyklotrimerizáciou s rôznymi diýnmi².

Keďže čisté α - a β -anoméry 1-etynyldeoxyribózy môžu predstavovať ideálne východiskové zlúčeniny pre prípravu

rôznych C-derivátov, boli testované i pre syntézu 1-indenyldeoxyribózu, ako látok s potenciálnou biologickou aktivitou.³ Syntéza bola založená na Sonogashirovej reakcii 2-jódanilínov s 1-etynyldeoxyribózou nasledovaná intramolekulárnou adíciou aminoskupiny na trojitú väzbu. V uvedenej práci budú diskutované rôzne varianty ako couplingové reakcie, tak i cyklizácia za vzniku indolového fragmentu.



Projekt bol financovaný z Centra pro nová antivirovika a antineoplastika MŠMT (Projekt č. 1M6138896301).

LITERATÚRA

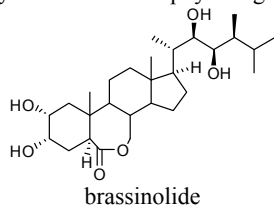
- Humphrey G. R., Kuethe J. T.: Chem. Rev. 106, 2875 (2006).
- (a) Novák P., Pohl R., Hocek M., Kotora M.: Org. Lett. 8, 2051 (2006). (b) Novák P., Číhalová S., Otmar M., Hocek M., Kotora M.: Tetrahedron 64, 5200 (2008).
- Kuethe J. T., Wong A., Qu C., Smitrovich J., Davies I. W., Hughes D. L.: J. Org. Chem. 70, 2555 (2005).

ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF NATURAL BRASSINOSTEROIDS

JANA OKLEŠŤKOVÁ^a, JANA STEIGEROVÁ^b,
LADISLAV KOHOUT^c a JAROSLAVA HNILÍČKOVÁ^c

^aLaboratory of Growth Regulators, Inst. Exp. Botany, AS CR, and Fac. Nat. Sci., Palacky University, Slechtitelu 11, 78371 Olomouc; ^bLab. Mol. Pathol., Inst. Pathol., Fac. Med., Palacky University, Hnevotinska 3, 77515 Olomouc; ^cIOCB AS CR, Flemingovo 2, 16610 Praha 6
jarka@uochb.cas.cz

Brassinosteroids are steroid plant hormones with important regulatory roles in various physiological processes¹.



Among plant hormones, brassinosteroids are structurally the most similar to vertebrate steroid hormones. The effect of

brassinosteroids on plant cell division has been shown to be mainly promotive.

We investigated effects of brassinosteroids on viability of normal and cancer cell lines of different histopathological origin to determine the basic anticancer structure activity relationships. Our results² provide the first evidence that brassinosteroids can inhibit the growth of several human cancer cell lines without affecting the growth of normal cells.

This work was supported by project LC06077 (MSMT), and by the research project Z4 055 0506 (UOCHB).

REFERENCES

- Sasse J., In: *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*; 219-262 Springer-Verlag, Tokyo, 1999; Khripach et al., *A new class of Plant Hormones*, p. 456 Academic Press; San Diego, 1999.
- CZ patent appl. 2007-571 (22.08.2007).

NUKLEOSIDY A NUKLEOSID TRIFOSFÁTY S MODIFIKOVANOU BÁZÍ A JEJICH ENZYMATICKÉ INKORPORACE DO DNA

Michal HOCEK

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Flemingovo nám. 2, 16610 Praha 6
hocek@uochb.cas.cz

Přednáška bude zahrnovat dva okruhy se společným základem v enzymatické inkorporaci modifikovaných nukleosid trifosfátů do DNA. První část bude zaměřená na design a syntézu nových C-nukleosidů, které jsou směřovány k rozšíření genetické abecedy a ke studiu molekulárního mechanismu specifity replikace DNA polymerasami. Ve druhé část bude diskutována naše nová dvoukroková chemoenzymatická metodika konstrukce funkcionalizovaných DNA.

Obecná modulární metodika syntézy nových C-nukleosidů vyvíjená v naší skupině spočívá v syntéze halogenovaných aryl-C-nukleosidových intermediátů a jejich následná derivatizace cross-coupling reakcemi, aminaceni a dalšími reakcemi (Schéma 1). Tímto způsobem byly syntetizovány série isomerních substituovaných benzenových, pyridinových a thiofenových C-nukleosidů (většinou v 2'-deoxyribo, ale některé i v ribo řadě)¹⁻⁴. Vybrané C-nukleosidy jsou dále převedeny na 5'-trifosfáty a je studována kinetika a selektivita jejich inkorporace DNA polymerasami.

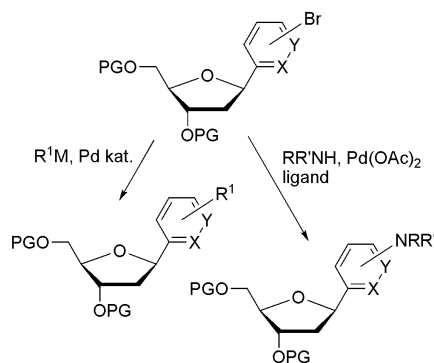


Schéma 1. Syntéza substituovaných aryl-C-nukleosidů

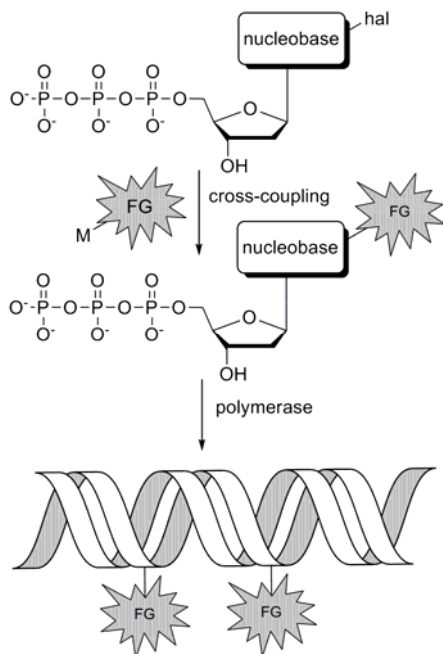


Schéma 1. Syntéza substituovaných aryl-C-nukleosidů

Nukleové kyseliny modifikované na nukleobázi různými funkčními skupinami mohou nalézt využití v diagnostice, chemické biologii i nanotechnologii. V naší laboratoři jsme vypracovali efektivní a obecnou metodiku jejich konstrukce ve dvou krocích (Schéma 2)⁵. Prvním krokem je cross-coupling reakce halogenovaných nukleosid trifosfátů ve vodném prostředí a následující enzymatické inkorporace DNA polymerasami (extenze primeru nebo PCR). Touto technologií byly připraveny DNA nesoucí např. aminokyselinové zbytky, amino- a nitrobenzen, ferrocen, Os- nebo Ru(bpy)₃ komplexy a některé byly využity pro elektrochemickou detekci v bioanalýze⁶⁻⁸.

Práce je součástí Výzkumného záměru Z4 055 0506 a byla podporována MŠMT (LC512), NIH Fogarty International Center (1R03TW007372-01) a firmou Gilead Sciences, Inc. Poděkování patří všem členům mé skupiny a spolupracujícím skupinám Doc. Fojty (BFU AVČR), Prof. Kuchty (UC Boulder)

a Prof. Romesberga (Scripps).

LITERATURA

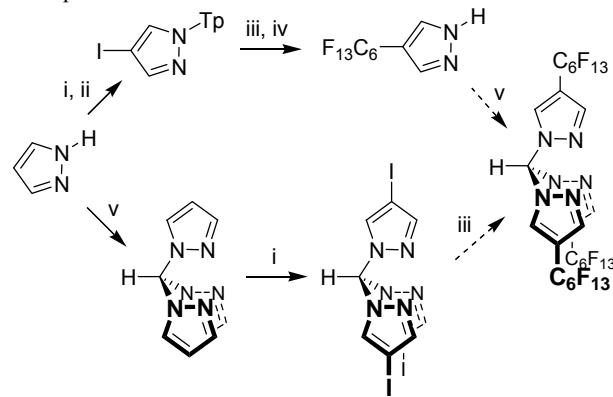
- Urban M., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: J. Org. Chem. 71, 7322 (2006).
- Joubert N., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: J. Org. Chem. 72, 6797 (2007).
- Bárta J., Pohl R., Klepetářová B., Ernsting N. P., Hocek M.: J. Org. Chem. 73, 3798 (2008).
- Štefko M., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: Eur. J. Org. Chem. 2008, 1689.
- Hocek M.; Fojta M.: Org. Biomol. Chem. 6, 2233 (2008).
- Čapek P., Cahová H., Pohl R., Hocek M., Gloeckner C., Marx A.: Chem. Eur. J. 13, 6196 (2007).
- Brázdilová P., Vrábel M., Pohl R., Pivoňková H., Havran L., Hocek M., Fojta M.: Chem. Eur. J. 13, 9527 (2007).
- Cahová H., Havran L., Brázdilová P., Pivoňková H., Pohl R., Fojta M., Hocek M.: Angew. Chem. Int. Ed. 47, 2059 (2008).

EXPERIMENTÁLNÍ A TEORETICKÁ STUDIE
PŘÍPRAVY PERFLUORALKYLOVANÝCH
TRIPYRAZOLYLMETHANŮ

MARTIN HOLAN, KRYŠTOF ŠIGUT,
MARTIN SKALICKÝ, MARKÉTA RYBÁČKOVÁ
a JAROSLAV KVÍČALA

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická
v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6;
holanm@vscht.cz; kvicalaj@vscht.cz

S cílem získat tripyrazolymethany substituované v poloze 4 pyrazolového kruhu perfluoralkylovými skupinami jsme využili dvě syntetické strategie: v první z nich jsme perfluoralkylací a následnou deprotekcí chráněného 4-jodpyrazolu připravili perfluoralkylovaný pyrazol, při druhé jsme studovali přímou perfluoralkylací tris(4-jodpyrazolyl)-methanu. Klíčová perfluoralkylační reakce využívá 2,2'-bipyridyl jako ligand a hexafluorbenzen jako korozpouštědlo¹.



i I₂, Ce(NH₄)₂(NO₃)₆, acetonitril; ii Ph₃CCl, NEt₃; iii C₆F₁₃I, Cu, 2,2'-bipy, C₆F₆, DMSO; iv HCl/H₂O; v CHCl₃, Na₂CO₃, PTC

Alternativně jsme podrobili oba jodované intermediáty nízkoteplotní lithiaci a následné reakci s polyfluoralkylovaným silanem.

V teoretické části práce jsme studovali pomocí DFT metod jednotlivé kroky třístupňové transformace chloroformu na tripyrazolylmethany s důrazem na porovnání reaktivity nesubstituovaných pyrazolů s pyrazoly substituovanými v poloze 4 perfluoralkylovým substituentem.

Děkujeme Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (výzkumné centrum LC06070, výzkumný záměr č. 6046137301, projekt KONTAKT ME 857) za finanční podporu tohoto projektu.

LITERATURA

1. Bhattacharyya P., Gudmunsen D., Hope E. G., Kemmitt R. D. W., Paige D. R., Stuart A. M.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1997, 3609.

POLYMERNÍ „DRUG DELIVERY“ SYSTÉMY PRO RADIOFARMAKA

MARTIN HRUBÝ^{a*}, ČESTMÍR KOŇÁK^a, JAN KUČKA^b, MIROSLAV VETRÍK^b, ONDŘEJ LEBEDA^b a KAREL ULBRICH^a

^aÚstav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ^bÚstav jaderné fyziky AV ČR, 250 68 Řež u Prahy
mhruby@centrum.cz

V polymerních systémech pro cílené doručování a řízené uvolňování farmak („drug delivery“) mají radiofarmaka některé výhody oproti chemickým léčivům. Především efektivní dávka radionuklidu je mnohem nižší než je tomu u chemického léčiva, což řádově snižuje potřebné množství polymerního nosiče, a v mnoha případech není potřeba uvolnit radionuklid z nosiče pro splnění požadované funkce. Kromě radioterapeutik se zde také, narozdíl od chemických léčiv, otvírá i možnost využít polymerních nosičů pro cílený transport radiodiagnostik metodami PET či SPECT podle volby radionuklidu¹. Připravili jsme některé polymerní nosičové systémy pro radiofarmaka²⁻⁴, jejichž struktury a vlastnosti budou diskutovány v přednášce.

Lokální aplikace radionuklidů je v medicíně využívána například v kloubních aplikacích pro léčbu chronických artritických zánětů (radiosynovektomie) či pro brachyterapii maligních pevných nádorů (zejména prostaty). Izotopicky značený termoresponsivní polymerní nosičový systém, který je ve vodném prostředí rozpustný za laboratorní teploty, ale při ohřátí dojde k jeho fázové separaci z roztoku a při teplotě lidského těla už je jeho fázová separace ukončena, má pro tento účel řadu výhod. Tyto výhody spočívají především ve snadné značitelnosti termoresponsivního polymeru v roztoku za laboratorní teploty, snadné aplikovatelnosti takového roztoku injekcí na místo působení místo chirurgické implantace a perzistenci aktivity v místě vpichu díky fázové separaci. Námí

připravený modelový systém² na bázi kopolymeru poly(*N*-isopropylakrylamidu) značeného ¹³¹I vykazoval v experimentu *in vivo* na myších kmene Balb/C významnou retenci radioaktivity na místě intramuskulární aplikace (cca 90 % 2 h po injekci), která zůstala na úrovni cca 80 % po dobu 14 dnů a pak zvolna klesala resolubilizací polymeru v důsledku rovnovážnosti fázové separace na cca 60 % za 42 dnů po aplikaci, kdy byl experiment ukončen (údaje jsou korigovány na rozpad nuklidu). Nebyla pozorována žádná orgánové specifická redistribuce radioaktivity uvolněné z místa aplikace a velká většina uvolněné radioaktivity byla rychle vyloučena močí a stolicí. Resolubilizaci polymeru lze řídit zavedením vhodné hydrolyticky degradovatelné monomerní jednotky do polymeru, pro což jsme využili hydrazonovou³ respektive *N*-glykosylaminovou hydrolyticky degradovatelnou vazbu.

Farmaka s afinitou ke kostní tkáni se kumulují v kostech díky jejich specifické interakci s minerální složkou kostí hydroxyapatitem. Akumulace těchto farmak je výrazně vyšší v oblastech kosti s vyšší remodelační aktivitou (pravděpodobně kvůli přístupnějšímu povrchu hydroxyapatitu v těchto oblastech), což je případ například osteolytických kostních metastáz, a umožňuje to radiodiagnostiku takových lézí. Známými cílicími jednotkami s vysokou specifitou ke kostní tkáni jsou hydroxybisfosfonáty. Vazba hydroxybisfosfonátových skupin na polymerní nosič by měla zvýšit selektivitu pro metastaticky napadenou kost oproti normální kosti díky zvýšené permeabilitě cév v nádorové neovaskulatuře a s tím souvisejícími jevy, tj. zvýšenou přístupností povrchu hydroxyapatitu v takové lézi a EPR (Enhanced Permeation and Retention) efektu. EPR efekt, hromadění systémů o vysoké skutečné (polymery) či zdánlivé (micely a nanočástice) molekulové hmotnosti ve tkáni pevných nádorů, je totiž způsoben právě vyšší permeabilitou nově vytvořených cév v nádorové tkáni a nedostatečně vyvinutým či zcela chybějícím odvodem lymfy z nádorové tkáně. Pro přípravu vodorozpustného polymerního nosičového systému⁴ jsme syntetizovali kopolymery *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu s hydroxybisfosfonátovými cílicími skupinami a ověřili vysokou afinitu a rychlou adsorpci značeného systému na hydroxyapatit jako *in vitro* model kostní tkáně. Jako radionuklidy jsme zvolili modely diagnostických β⁺ zářičů vhodných pro PET [⁸⁹Zr (*T*_{1/2} = 3.27 d) a ⁴⁴Sc (*T*_{1/2} = 3.93 h)] s delším poločasem rozpadu, a sice ¹⁸¹Hf (*T*_{1/2} = 42,4 d) a ⁴⁶Sc (*T*_{1/2} = 83,81 d), chelátované do hydroxybisfosfonátových skupin na polymeru.

Pro EPR efekt je rozhodující dostatečně vysoká molekulová hmotnost konjugátu; aby však byl polymerní nosič vyloučitelný z organismu ledvinami, je třeba, aby jeho molekulová hmotnost byla pod renálním prahem [cca 40 – 45 kDa pro (meth)akrylamidové polymery]. Micelární nosiče umožňují díky rovnováze unimer – micela dosáhnout dostatečně vysoké zdánlivé molekulové hmotnosti (micela) i vyloučitelnosti (unimer). Studované nosiče jsou založeny na termoresponsivním polymerním micelárním nosiči na bázi roubovaného kopolymeru, kde termoresponsivní i hydrofilní bloky mají molekulovou hmotnost pod renálním prahem.

Ačkoliv je v současné době věnováno mnoho pozornosti polymerům jako nosičům chemických léčiv, pro radiofarmaka jde o oblast dosud málo studovanou, přestože právě pro

radiofarmaka se zde nabízejí četné výhody. Jde tedy o oblast, která je do budoucna bezesporu perspektivní pro diagnostiku i terapii především nádorových onemocnění.

Dedikace grantová – Tato práce vznikla za podpory grantu GA AV ČR č. IAA400480616 a programu výzkumných center MŠMT ČR č. 1M0505/4635608802.

LITERATURA

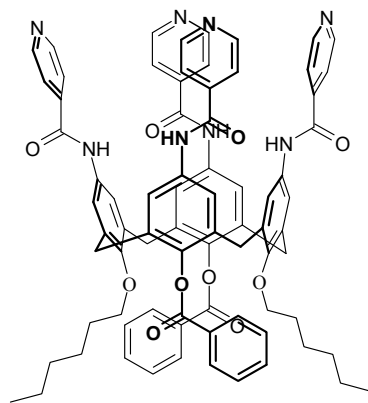
1. Hamoudech M., Kamleh M. A., Diab R., Fessi H.: Adv. Drug Delivery Rev. 60, 1329 (2008).
2. Hrubý M., Šubr V., Kučka J., Kozempel J., Lebeda O., Sikora A.: Appl. Radiat. Isot. 63, 423 (2005).
3. Hrubý M., Kučka J., Lebeda O., Macková H., Babič M., Koňák Č., Studenovský M., Sikora A., Kozempel J., Ulbrich, K.: J. Controlled Release 119, 25 (2007).
4. Hrubý M., Etrych T., Kučka J., Forsterovalá M., Ulbrich K.: J. Appl. Polym. Sci. 101, 3192 (2006).

NOVÉ DERIVÁTY CALIX[4]ARENŮ

**OLDŘICH HUDEČEK, ONDŘEJ KUNDRÁT,
JAN BUDKA a PAVEL LHOTÁK**

*Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28
Praha 6
hudecekl@vscht.cz.*

Deriváty calix[4]arenů v konické konformaci obsahující na horním okraji čtyři isonikotinoylamínoskupiny jsou schopny tvorby vzájemných asociátů podobných, jaké tvoří tetraureidoderiváty.[1] Proto byly připraveny sloučeniny s nesympetrickými spodními okraji, které byly použity pro 1H-NMR studie, které by měly objasnit, jakým způsobem k tvorbě těchto supramolekulárních struktur dochází. Během syntézy byla pozorována zajímavá regioselektivní substituce na horním okraji.



Tento projekt je podporován Grantovou agenturou ČR (grant 104/07/1242) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (COST D31 OC134).

LITERATURA

1. Palmer L. C., Rebek J. Jr.: Org. Biomol. Chem. 2, 3051 (2004).
2. Lhoták P., Stibor I., v knize: *Molecular design, kap. Calix[n]arenes and related molecules*, VŠCHT Praha 1997.

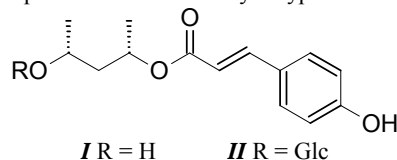
NOVÉ LÁTKY IZOLOVANÉ Z BRUSNICE BORŮVKY

SIMONA HYBELBAUEROVÁ^a a BOHUMÍR KOUTEK^b

*^aKatedra organické chemie a jaderné chemie PFF UK, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
simona.hybelbauerova@gmail.com*

Listy brusnice borůvky mají velice podobné účinky jako plody. Čaj z listů je vhodný pro mírné snížení hladiny cholesterolu v krvi. Má také příznivý vliv na ledviny a močové cesty, které čistí a dezinfikuje a pomáhá s odvodňováním při přílišném zadržování vody v organismu. Při vnější aplikaci zmírňuje projevy lupénky a dalších kožních nemocí. V diabetologii se využívá coby podpůrný prostředek při cukrovce. Droga také působí svíravě až desinfekčně. Odvar z listů se osvědčil při střevním kataru, žaludečních křečích, zánětu močového měchýře a tlustého střeva.

Ze získaného methanolickeho extraktu stonku brusnice borůvky byly vyizolovány dvě nové látky: 4R-hydroxypent-2S-yl-2E-3-(4-hydroxyl)prop-2-enoát **I** a 4R-β-D-glukopyranosyl-oxy-pent-2S-yl-2E-3-(4-hydroxyl)prop-2-enoát **II**. Absolutní konfigurace stereogenních center **I** byla určena na základě NMR spektroskopie s chirálním posunovým čidlem a porovnáním NMR spekter připravených standardů se spektry izolované látky **I**. U látky **II** byla absolutní konfigurace určena pomocí NMR spektroskopie a porovnáním s teoretickým výpočtem.



Vedle výše zmiňovaných látek byly v methanolickeho extraktu stonku brusnice borůvky identifikovány: α-amyrin, β-amyrin, oleanová kyselina, ursolová kyselina, glutinol, 3β,12α-dihydroxyoleanan-28→13-olid, 3β-sitosterol, monotropein, vitamin E, methyl-α-D-fruktofuranosid, methyl-β-D-fruktofuranosid, methyl-β-D-fruktopyranosid, sacharosa, 2-deoxyribono-1,4-lakton a (2R,4S)-2-O-β-D-glukopyranosyl-2,4-pentandiol^{2,3}.

Z methanolickeho extraktu listu brusnice borůvky byly izolovány následující látky: oleanová kyselina, ursolová kyselina, α-amyrin, β-amyrin, glutinol, 3β-sitosterol, 3β-sitosterolglukosid, vitamin E, myo-inositol, quercetin, methyl-β-D-fruktofuranosid.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR MSM 0021620857.

LITERATURA

1. Kaneko T., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki, Duc N.M.: *Phytochemistry* 259, 47 (1998).
2. Kanerva S., Kitunen V., Loponen J., Smolander A.: *Biol. Fert. Soils* 547, 44 (2008).
3. Witzell J., Gref R., Näsholm T.: *Biochem. Syst. Ecol.* 115, 31 (2003).

STUDIUM REAKTIVITY DISULFIDŮ V OXIDAČNÍCH REAKCÍCH KATALYZOVANÝCH TRANSITNÍMI KOVY

JAKUB HÝVL a JIŘÍ ŠROGL

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, Praha – Dejvice, jsrogl@uochb.cas.cz

V řadě biochemických systémů působí disulfidy jako oxidovadla¹. Mezi takovými disulfidy patří glutathion disulfid², homocystin², thioredoxin³ a lipoová kyselina⁴. Z hlediska organické syntézy se často jedná o velice zajímavé oxidativní transformace.

V naší práci se zabýváme aktivací C-H skupin karbonylových sloučenin. Disulfid zde vystupuje jako oxidační činidlo v reakci katalyzované transitními kovy. Měďné soli prokazují největší potenciál. Syntetický rozsah reakce byl demonstrován na přípravě benzothiazolů. (schéma 1).

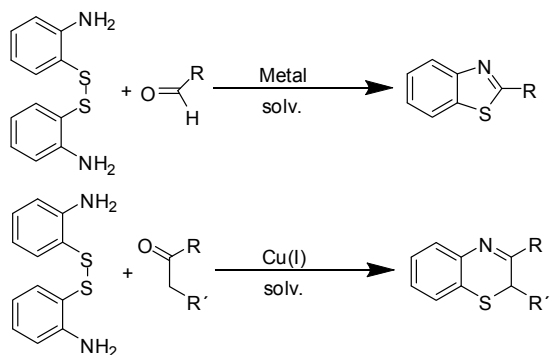


Schéma 1.

Tato práce vznikla za podpory GAČR (203/08/1318)

LITERATURA

1. Oae S., Okuyama T.: *Organic Sulfur Chemistry: Biochemical Aspects*. CRC Press, Inc. Boca Raton 1992.
2. Racker E.: *J. Biol. Chem.* 217, 867 (1955).
3. Berendt U.; Haverkamp T.; Prior A.; Schwenn J. D.: *Eur. J. Biochem.* 233, 347 (1995).
4. Perham R. N.: *Annu. Rev. Biochem.* 69, 961 (2000).

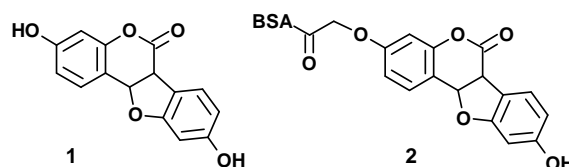
IMUNOAFINITNÍ SORBENTY PRO KUMESTANY

ELIŠKA CHYTILOVÁ, ELENA A. PROKUDINA, RADKA KOBLOVSKÁ a OLDŘICH LAPČÍK

Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Kumestany jsou podskupinou isoflavonoidů, metabolitů rostlin se zajímavými biologickými účinky. Kumestrol patří mezi neúčinnější fytoestrogeny. Nejvýznamnějším zdrojem kumestanů jsou bobovité rostliny (Leguminosae), avšak jejich přítomnost byla zjištěna rovněž v čeledích Poaceae, Compositae a Chenopodiaceae^{1,2}. V této práci jsme se zabývali přípravou imunoafinitního sorbentu určeného k přečištění rostlinných extraktů a zakoncentrování kumestrolu a jeho analogů před analýzou pomocí HPLC-MS.

Sorbent byl připraven imobilizací polyklonální králíčí protilátky proti konjugátu kumestrolu s hovězím sérovým albuminem (BSA)³ na pevný nosič Affi-Gel 10 (Bio-Rad laboratories)⁴. Kapacita sorbentu dosahovala 0,3 mg analytu na mililitr gelu. Byly zjištěny optimální podmínky eluce a vyvinut postup imunoafinitní extrakce. Metoda bude využita ke studiu výskytu kumestanů v bobovitých rostlinách a v dalších vytipovaných čeledích.



1 - kumestrol, 2 - imunogen

Poděkování: Práce vznikla za podpory projektů 525/06/0864 GAČR a MSM 6046137305.

LITERATURA

1. Lapčík O.: *Phytochemistry* 68, 2909 (2007).
2. Reynaud J., Guilet D., Terreux R., Lussignol M., Walchshofer N.: *Nat. Prod. Rep.* 67, 849 (2005).
3. Lapčík O., Štursa J., Kleinová T., Vítková M., Dvořáková H., Klejduš B., Moravcová J.: *Steroids* 68: 1147 (2003)
4. Vanková R., Gaudinová A., Sussenbeková H., Dobrev P., Štrnad M., Holík J., Lenfeld J.: *J. Chromatogr. A* 811, 77 (1998).

HYDROLYTICKÉ STUDIE ROZKLADU HYDRAZONOFORMAMIDOVÝCH PROLÉČIV ISONIAZIDU

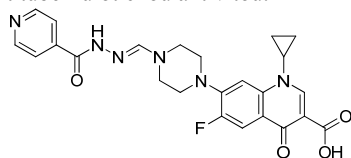
ALEŠ IMRAMOVSKÝ^{a,b}, JARMILA VINŠOVÁ^c, JUANA MONREAL FERRIZ^c a JOSEF JAMPÍLEK^d

^aUniverzita Hradec Králové, PedF, KCH, Nám. Svobody 301, 500 05 Hradec Králové, ^bUniverzita Pardubice, FCHT, ÚOCHT, Nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice 2, ^cFarmF

UK, KAOCH, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové,
^dZentiva a.s., U kabelovny 130, 102 37 Praha 10
 ales.imramovsky@uhk.cz

Nárůst bakteriální rezistence je obecně spjatý s používáním antibiotik resp. s bakteriální evolúci. Tuberkulóza (TB) jako chronické infekční onemocnění není výjimkou a je způsobena mutací chromozomální mutací DNA. Rezistentní kmen má pozmeněný nebo úplne chybějící gen, který pak limituje produkci proteinů, potřebných pro účinek antituberkulotik.

Příprava nových forem současných antituberkulotik zlepšující jejich fyzikálně chemické vlastnosti a působí synergicky s dalšími antituberkulotiky mohou výrazně usnadnit léčbu TB. U hydrazonoformamidových derivátů isoniazidu je známa tato synergická aktivita s isoniazidem (INH)¹. V případě, že druhou část molekuly tvoří též antituberkuloticky aktivní molekula (viz Obrázek 1), může docházet též k potencování účinku jednotlivých složek. Tyto látky jsou stabilní v tuhém stavu, ovšem působením enzymů, případně hydrolyzou může docházet k jejich rozkladu a uvolnění obou vázaných aktivních složek. Studium hydrolytické stability ve vodném prostředí přináší přehled o stabilitě těchto připravených derivátů s významnou antituberkulotickou aktivitou.²



Obrázek 1: Spojení INH s další antituberkuloticky aktivní molekulou

Grafický průběh, experimentální podmínky, stejně tak určení poločasů rozpadu $\tau_{1/2}$ pomocí RP-HPLC, stejně tak kinetické vyhodnocení průběhu rozkladu studovaných látek, budou součástí prezentace.

Autoři příspěvku děkují za finanční podporu grantu Grantu specifického výzkumu Univerzity Hradec Králové (řešitel Aleš Imramovský) GAUK 285/2006/B-CH/FaF a

LITERATURA

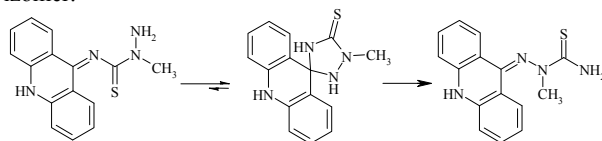
- Zhang Y., Wade M. M., Scorpio A., Zhang, H., Sun Z. H.: J. Antimicrob. Chemother. 52, 790 (2003).
- Imramovský A., Polanc S., Vinšova J., Kočevár M., Jampilek J., Rečková Z., Kaustová J.: Bioorg. Med. Chem. 15, 2551 (2007).

CYKLIZAČNÉ REAKCIE A VLASTNOSTI NOVÝCH 9-SUBSTITUOVANÝCH A 3,6-DISUBSTITUOVANÝCH AKRIDÍNŮV

JÁN IMRICH, EVA BALETOVÁ, LADISLAV JANOVEC, MÁRIA VILKOVÁ, and KAREL D. KLIKA

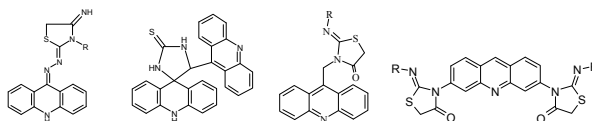
Univerzita P. J. Šafárika, Prírodovedecká fakulta, Ústav chemických vied, Moyzesova 11, SK 040 01, Košice
 jan.imrich@upjs.sk

Reakcia akridin-9-ylizotiokyanátu s Me- a Ph-hydrazinom prebiehala regioselektívne za vzniku zmesi tiosemikarbazidov a ich spiro foriem, pričom spirocyklus sa otváral na opačný izomér.



Opačne substituované tiosemikarbazidy, karbazidy a izotiosemikarbazidy, ktoré vykazovali rozsiahlu planaritu v dôsledku konjugácie 9,10-dihydroakridínu s 9-hydrazónovým substituentom sa získali reakciou akridin-9-ylhydrazínu s izotiokyanátmi a ich následnou oxidáciou a metyláciou. S metyl brómoacetátom vznikli stabilné 1,3-tiazolidin-4-óny, naproti tomu, s brómoacetonitrilom primárne vzniklé cykly prešmykovali (Dimroth) na regioizoméne 1,3-tiazolidin-4-imíny. Analogické reakcie akridin-9-ylmetyltioamocovin poskytli nové spiro[dihydroakridin-9-[10'H],5-imidazolidin]-2-tióny. Štruktúru zlúčenín potvrdila kryštalografická analýza a ¹H, ¹³C a ¹⁵N NMR v kvapalnom aj tuhom stave.

Väzbové konštanty novosyntetizovaných proflavín-ditiazolidinónov na CT a plazmidovú DNA sa testovali pomocou UV-Vis, fluorescenčnej and CD spektroskopie. Mierna *in vitro* cytotoxická aktivita sa potvrdila voči L1210 a HeLa bunkám.



Táto práca vznikla za podpory grantovej agentúry VEGA (1/0476/08) a štátneho programu NMR (2003SP200280203).

LITERATÚRA

- Klika K.D., Balentová E., Bernát J., Imrich J., Vavrušová M., Kleinpeter E., Pihlaja K., Koch A.: J. Heterocyclic Chem. 43, 633 (2006).
- Balentová E., Imrich J., Bernát J., Suchá L., Vilková M., Prónayová N., Kristian P., Pihlaja K., Klika K. D.: J. Heterocyclic Chem. 43, 645 (2006).
- Klika K. D., Imrich J., Vilková M., Bernát J., Pihlaja K.: J. Heterocyclic Chem. 43, 739 (2006).
- Janovec L., Sabolová D., Kožurková M., Paulíková H., Kristian P., Ungvarský J., Moravčíková E., Bajdichová M., Podhradský D., Imrich J.: Bioconjugate Chem. 18, 93-100 (2007).

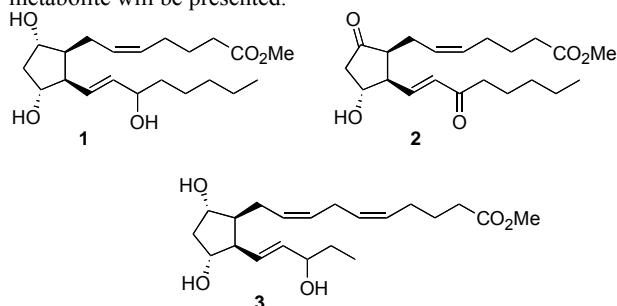
THE TOTAL SYNTHESIS OF ISOPROSTANES

ULLRICH JAHN^a, EMANUELA DINCA^b, and DANIEL GRIFFITH^b

^a IOCB AS CR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic; ^b Institut für Organische Chemie, Technische

Universität Braunschweig, Hagenring 30, D-38106
Braunschweig, Germany
jahn@uochb.cas.cz

Isoprostanes are important cyclic metabolites of polyunsaturated fatty acids.¹ They form via free radical pathways *in vivo*. So far only a few of the literally hundreds of known isoprostanes have been characterized with respect to their biological activity.² This is due to the fact that they occur as regio- and stereoisomeric mixtures which makes their study exceedingly difficult. To facilitate the further detailed investigation of their biological properties, total synthesis is the only way to produce significant amounts of these natural products. We report here the total synthesis of 15-F₂-IsoP **1**, and the synthesis of a potential metabolite of 15-E₂-IsoP **2**. The extension to approach 18-F₃-IsoP **3**, a potential food-derived metabolite will be presented.



REFERENCES

1. First isolation: Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F., Roberts II, L. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 9383 (1990).
2. Jahn, U., Galano, J.-M., Durand, T.: Angew. Chem. Ind. Ed., 47, 5894 (2008).

PŘÍPRAVA POLYSUBSTITUOVANÝCH TERFENYLŮ A KVARFENYLŮ TERMICKÝM PŘESMYKEM DEWAROVÝCH BENZENŮ A JEJICH REAKTIVITA

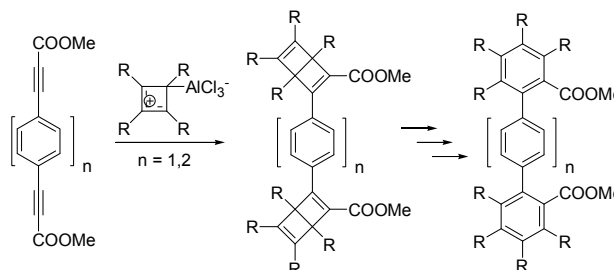
ŠTĚPÁNKA JANKOVÁ^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
jankovaS@seznam.cz; kotora@natur.cuni.cz

Dewarovy benzeny jsou valenční izomery benzenu, který může být připraven jejich termickým přesmykem¹. V naší předchozí práci jsme prokázali, že je možné připravit v dobrých výtěžcích Dewarovy benzeny reakcí cyklobutadienového komplexu AlCl₃ s různě substituovanými arylpropynoáty², popř. aktivovanými trojnými vazbami nesoucími i jiné aromatické sloučeniny jako ferroceny³. Dále jsme prokázali, že existuje spojitost mezi vlastnostmi substituentů na Dewarových benzenech a rychlostí jejich přesmyku na odpovídající benzen².

Naším dalším krokem bylo pokusit se o přípravu

polysubstituovaných terfenylů a kvarfenylů za použití stejného přístupu jako v případě již dříve publikovaných fenylsubstituovaných Dewarových benzenů. Reakce alkyl cyklobutadienového komplexu AlCl₃ s odpovídajícím diynylbenzenem či bifenylem poskytla očekávané bis-Dewarovy benzeny (schéma 1). Následným termickým přesmykem takto připravených bis-Dewarových benzenů byly získány odpovídající polysubstituované terfenyly a kvarfenyly.



Tato práce byla podpořena projektem MŠMT č. LC 06070 Struktura a syntetické aplikace komplexů přechodných kovů.

LITERATURA

1. van Tamelen E. E., Pappas S. P.: J. Am. Chem. Soc. 84, 3789 (1962).
2. Janková Š., Dračinský M., Císařová I., Kotora M.: Eur. J. Org. Chem. 47 (2008).
3. Janková Š., Štěpnička P., Kotora M.: rukopis v přípravě.

REDUKCE AMIDOVÝCH KONJUGÁTŮ

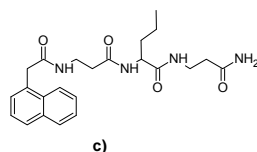
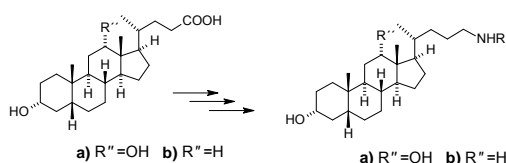
BEATA JONŠTOVÁ^a, ZDENA NOVÁKOVÁ^a,
MIROSLAV LEDVINA^b a PAVEL DRAŠAR^a

^aVŠCHT Praha, Ústav chemie přírodních látek, Technická 5, 166 28 Praha 6; UOCHB AV ČR vvi, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
beata.jonsztova@vscht.cz

Cílem naší práce je syntéza steroidních konjugátů s polyaminy. V současné době jsou tyto látky využívány k přípravě polykationových aktivních přenašečů negativně nabitých nukleových kyselin podílejících se na genové terapii a vývoji DNA vakcinaci, která přináší nové možnosti pro léčbu velkého počtu onemocnění jako je rakovina, infekční onemocnění nebo při poruchách metabolismu¹.

Příprava steroidních derivátů vychází z kyseliny lithocholové (**b**) a deoxycholové (**a**). Syntéza byla zjednodušena použitím činidla TOTU². Oligopeptidy (**c**) jsou syntetizovány na pevném nosiči. Jednotlivé Fmoc-aminokyseliny kondenzují pomocí činidel DIPEA a HBTU.

Zvláštní pozornost je věnována redukci peptidové vazby. Byla popsána řada metod, z nichž se zdá použití boranu³ jako jedna z možností slibující dobré výsledky.



Práce vznikla za podpory MŠMT 6046137305, 1P04OCD31.001, OC08043 (NPFM-II), 2B06024 NVP-II Suprafyt, GAČR 2003/06/0006 a NATO grant CBP.EAP.CLG.982972.

LITERATURA

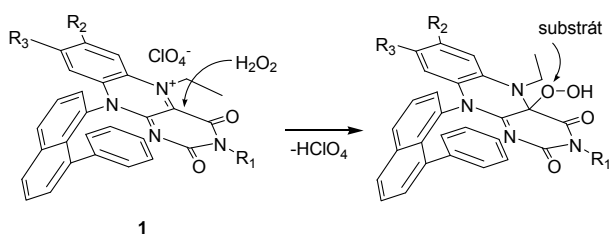
1. Kirby A.J., Camileri P., McGregor C., Ronsin G., Kremer A.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 42, 1448 (2003).
2. Ghossoub A., Lehn J. M.: *Chem. Commun.*, 2005, 5763.
3. Pistia G.: *Carb. Res.* 328, 467 (2000).

PLANÁRNĚ CHIRÁLNÍ FLAVINIOVÉ SOLI JAKO KATALYZÁTORY OXIDAČNÍCH REAKCÍ

RADEK JUROK a RADEK CIBULKA

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
 jurokr@vscht.cz; cibulka@vscht.cz.

Flaviniové soli představují nadějně organokatalyzátory pro oxidaci sulfidů, terciárních aminů a Baeyer-Villigerovy oxidace, s použitím peroxidu vodíku jako stechiometrického oxidačního činidla¹. Oxidace katalyzované flaviniovými solemi probíhají s velkou chemoselektivitou a za mírných podmínek. Vlastním oxidačním činidlem je příslušný flavin-4a-hydroperoxid vznikající reakcí flaviniové soli s peroxidem vodíku. Příkladem použití chirálních flaviniových solí jako katalyzátorů enantioselektivních oxidací však bylo dosud v literatuře publikováno jen málo².



Navrhli jsme proto planárně chirální flaviniové soli **1**, ve kterých je přístup peroxidu vodíku i substrátu z jedné strany katalyzátoru blokován benzenovým jádrem připojeným rigidní naftalenovou spojkou. Flavinový skelet jsme současně deriva-

tizovali s výhledem na modifikování katalytických vlastností a resoluci enantiomerů převedením na diastereomery.

S připravenými racemickými flaviniovými solemi jsme provedli kinetická měření oxidace modelových substrátů (sulfidy, terciární aminy, 3-fenylcyklobutanon).

Pro stereoselektivní oxidace byly připravené racemické směsi flavinů rozděleny na enantiomery pomocí chirální HPLC popř. jejich diastereomery sloupcovou chromatografií a poté kvarternizovány.

Autoři děkují Grantové agentuře České republiky (projekt č. 203/07/1246) za finanční podporu.

LITERATURA

1. Gelalcha F.G.: *Chem. Rev.* 107, 3338 (2007).
2. Shinkai S., Yamaguchi T., Manabe O., Toda F.: *Chem. Commun.* 1399 (1988); Murahashi S.-I.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 34, 2443 (1995); Murahashi S.-I., Ono S., Imada Y.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2366 (2002).

SYNTÉZA A VYUŽITÍ NOVÝCH BIPYRIDIN-*N,N'*-DIOXIDŮ V ASYMETRICKÉ SYNTÉZE

ANETA KADLČÍKOVÁ^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
 daise@seznaml.cz kotora@natur.cuni.cz

Deriváty chirálních bipyridinů jsou často využívány jako katalyzátory v asymetrické syntéze, kde vystupují jako Lewisovské báze. V rámci vývoje nových katalyzátorů bipyridinového typu^{1,2,3} bychom chtěli představit novou metodu pro přípravu nesymetricky substituovaných bipyridinů a jejich derivátů. Tato metoda spočívá v [2+2+2] kocyklotrimerizaci tetraynu, jenž byl připraven z 1,7-oktadiynu, s dvěma nitrily katalyzované CpCo(CO)₂. Jako typický příklad slouží reakce s benzonitrilem a (*R*)-tetrahydrofuran-2-karbonitrilem za vzniku nesymetricky substituovaného bis(tetrahydroisochinolinu).

Schéma 1

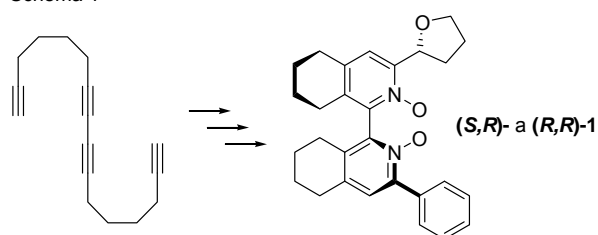
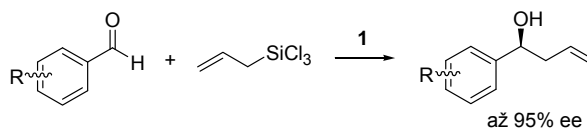


Schéma 2



Vzniklá sloučenina byla oxidována kyselinou *meta*-chlorperoxybenzoovou na diastereoizomerní směs dvou bipyridin-*N,N'*-dioxidů **1** (schéma 1) Oba diastereoizomery bylo možné od sebe oddělit jednoduchou chromatografií na sloupci silikagelu. Katalytická aktivita a schopnost asymetrické indukce výše uvedených bipyridin-*N,N'*-dioxidů **1** byla vyzkoušena v allylačních reakcích s různě substituovanými benzaldehydy (schéma 2). Homoallylalkoholy vnikaly s enantioselektivitou až do 95% ee.

Tato práce vznikla za podpory Centra základního výzkumu MŠMT (projekt č. LC06070, Struktura a syntetické aplikace komplexů přechodných kovů GA ČR (projekt č. 203/08/0350).

LITERATURA:

- Hrdina, R.; Kadlčíková, A.; Valterová, I.; Hodačová, J.; Kotora, M.: *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 3185 (2006).
- Hrdina, R.; Valterová, I.; Hodačová, J.; Kotora, M.: *Adv. Synth. Catal.* 349, 822 (2007).
- Hrdina, R.; Dračinský, M.; Valterová, I.; Hodačová, Císařová, I.; Kotora, M.: *Adv. Synth. Catal.* 350, 1449 (2008).

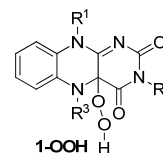
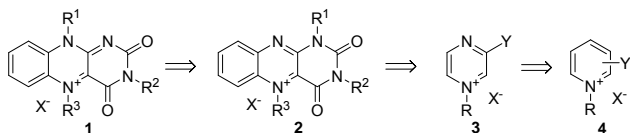
PYRAZINIUM SALTS AS SIMPLE ANALOGUES OF FLAVIN DERIVATIVES

FRANTIŠEK KAFKA^a a RADEK CIBULKA^b

^aIOCB AS CR, Flemingovo 2, 166 10 Prague 6

^bDepart Org. Chem., Institute of Chemical Technology, Prague, Technická 5, 16628 Prague 6
kafka@uochb.cas.cz; cibulka@vscht.cz

Flavinium salts **1** have been previously reported^{1,2} as effective and environmentally benign catalysts in hydrogen peroxide mediated oxidation of various organic substances (e.g. sulfides, cyclic ketones and tertiary amines). Flavin-4a hydroperoxide **1-OOH**, formed in situ by reaction of flavinium salt **1** with hydrogen peroxide, is the reactive species which directly oxidizes the substrate. Other types of electron-poor heteroarenium salts are also capable to form adducts with nucleophiles³, but systematic studies in this field have not been performed yet. We reduced the complexity of the flavinium system to simple pyrazinium derivatives **3** and pyridinium salts **4**. Their catalytic behavior towards hydrogen peroxide mediated oxidation of model substrates was tested. The catalytic ability of some pyrazinium derivatives is comparable with the most efficient flavin-based catalysts **2**.



REFERENCES

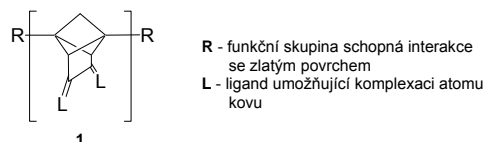
- Gelalcha F. G.: *Chem. Rev.* 107, 3338 (2007).
- Minidis A. B. E., Bäckvall J.-E.: *Chem. Eur. J.* 7, 297 (2001).
- Rieche, A.; Schmitz, E.; Dietrich, P. *Chem. Ber.* 92, 2244 (1959).

LATERÁLNĚ SUBSTITUOVANÉ BICYKLO[1.1.1]PENTANY – PREKURZORY „MOLEKULÁRNÍCH VYPÍNAČŮ“?

JIŘÍ KALETA^a, CTIBOR MAZAL^a a JOSEF MICHL^b

^aÚstav chemie, PřF, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 61137 Brno, ^bDepartment of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, Colorado 80309-0215.
kaleta@mail.muni.cz

Současné trendy miniaturizace elektronických zařízení staví vědce před nelehký úkol, kterým je syntéza molekul, jež budou schopny nahradit nejprve jednoduché a později i složitější elektronické součástky (vodiče, diody, odpory...). Náš výzkum je zaměřen na syntézu vhodně laterálně substituovaných derivátů bicyklo[1.1.1]pentanu **1** (n = 1) a následně i jejich oligomerů – [n]staffanů (n ≥ 2), které by mohly nalézt uplatnění jako budoucí molekulární vypínače.¹ Vhodnou substitucí v polohách 1 a 6 bude poté možné tato zařízení ukotvit na povrch zlatých elektrod, zjistit jejich elektronické vlastnosti a případně je začlenit do sofistikovanějších molekulárních zařízení.



Bylo testováno několik cest, jež měly směřovat k 1,3,4,6-substituovaným tricyklo[3.2.0.0^{2,6}]heptanovým skeletům **1**. Doposud nejvhodnějším se ukázal postup využívající jako meziprodukt již dříve publikovaný propellan **2** (Schéma 1).²⁻⁴

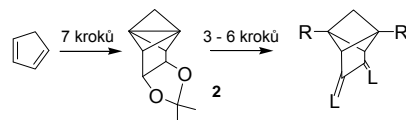


Schéma 1.

Prozatím jsou celkové výtěžky těchto mnohastupňových pohříchu lineárních syntéz velmi nízké (pod 1%), nicméně je zřejmé, že touto cestou lze připravit monomerní jednotky

budoucích molekulárních zařízení a také další slibné deriváty, jejichž vlastnosti budou testovány.

Projekt KONTAKT ME 857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy a National Science Foundation (USA), s podporou SONY, GmbH.

LITERATURA

1. Mazal C., Škarka O., Kaleta J., Michl J.: *Org. Lett.* 8, 749 (2006).
2. Katz T. J., Roth R. J., Acton N., Carnahan E. J.: *J. Org. Chem.* 64, 7663 (1999).
3. Christl M., Leninger H., Kemmer, P.: *J. Chem. Ber.* 117, 2963 (1984).
4. Stulgies B., Pigg D. P., Kaszynski P., Kudzin Z. H.: *Tetrahedron.* 61, 89 (2005).

ÚČINNOST ZHÁŠENÍ FLUORESCENCE NOVÝM STRUKTURNÍM TYPEM ZHÁŠEČŮ ZE SKUPINY AZAFTALOCYANINŮ

KAMIL KOPECKÝ, PETR ZIMČÍK, MIROSLAV MILETÍN a VERONIKA NOVÁKOVÁ

*Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
kopek9aa@faf.cuni.cz*

Zhášeče fluorescence se používají především v laboratořích molekulární biologie a genetiky. Jejich využití je především pro monitorování a kvantifikaci PCR. Dále jsou pak využívány pro stanovení specifických sekvencí DNA/RNA, příp. oligopeptidů *in vitro* a *in vivo*. Komerčně dostupné zhášeče mají mnoho nevýhod, mezi něž patří chemická nestabilita při syntéze a deprotekcii oligonukleotidů (prakticky vždy jsou vázány na 3'-konci, ze kterého probíhá syntéza oligonukleotidu *in vitro*) a především pak nedostatečná účinnost zhášení fluoroforů s fluorescencí o vlnové délce nad 700 nm.

Alkylaminoderiváty azaftalocyaninů (AzaPc) na rozdíl od jiných ftalocyaninů a AzaPc nevykazují žádnou fluorescenci a mají téměř nulovou produkci singletového kyslíku, což jsou obecně známé vlastnosti těchto sloučenin. U zhášečů je právě nepřítomnost vlastní fluorescence podmínkou pro použití. Singletový kyslík je reaktivní forma kyslíku, který způsobuje degradaci biomolekul, a jeho přítomnost je nežádoucí.

Účinnost zhášení lze změřit smícháním dvou komplementárních sekvencí oligonukleotidů¹, kdy jeden řetězec nese na 3'-konci zhášeč fluorescence (AzaPc) a druhý nese na 5'-konci fluorofor, v našem případě jsme použili často používaný fluorescein (FAM) a indocyanin Cy5[®]. Pro měření jsme použili 3 sekvence nesoucí zhášeč, které se od sebe lišily vždy o 5 bazí T vložených mezi zhášeč a specifickou sekvencí DNA.

Všechna měření byla provedena a porovnána paralelně i s komerčně dostupným zhášečem Black Hole Quencher-2[®] (BHQ-2[®]).

Tato práce vznikla za podpory grantu GA UK 41107/B/2007.

LITERATURA

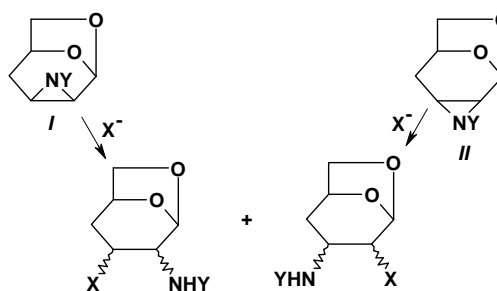
1. Marras S. A., Kramer F. R., Taygi S.: *Nucleic Acids Res.* 21, 30 (2002).

REAKTIVITA DEOXYEPIMINŮ 1,6-ANHYDROHEXOS

JIŘÍ KROUTIL^a a JINDŘICH KARBAN^b

*^aKatedra organické a jaderné chemie PŘF UK, Albertov 6, 12843, Praha 2; ^bÚstav chemických procesů AV ČR, Rozvojová 135, 16502 Praha 6
kroutil@natur.cuni.cz karban@icpf.cas.cz*

N-Nosyl a *N*-tosyl deriváty 1,6-anhydro-2,3,4-trideoxy-2,3-epimino-β-D-hexopyranos¹ konfigurace *lyxo* a *ribo* **I** a **II** byly podrobeny nukleofilnímu štěpení aziridinového cyklu halogenidovými anionty (HF₂⁻, Cl⁻, Br⁻, and I⁻). *N*-nosylepiminy poskytly produkty *trans*-diaxiálního i *trans*-diekvatoriálního štěpení aziridinového cyklu. Poměr obou stereoizomerů závisel na reakčních podmínkách (halogenidy amonné nebo halogenovodíky) i na konfiguraci epiminu. *N*-Tosylepiminy kromě zmíněných produktů poskytly při některých reakcích rovněž produkty s *cis*-uspořádáním tosylamidogrupy a halogenu. Tento stereochemický průběh reakce je při štěpení epiminohexopyranos zcela neobvyklý².



Tato práce je financována grantem IAA400720703 Grantové agentury Akademie věd ČR.

LITERATURA

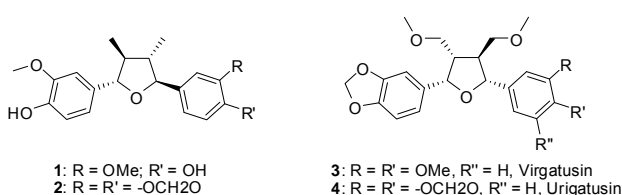
1. Karban J., Buděšínský M., Kroutil J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 1939 (2004).
2. Karban J., Kroutil J.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 60, 27 (2006).

SYNTHESIS OF TETRAHYDROFURAN CONTAINING LIGNANS

YVONNE KAVANAGH and **ULLRICH JAHN**

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
kavanagh@uochb.cas.cz*

Lignans are a large and diverse group of natural products that have received interest for their wide range of biological activities¹. For example, (+)-fragransin **1** is an inhibitor of NO production², while (–)-talaumidin **2** exhibits neurotrophic effects³. The synthesis of members of this important class of compounds has been limited and in general these have been multistep sequences⁴. Simpler, more resourceful synthetic methodologies are required in order to access compounds from this class, also with the aim of accessing more potent and efficacious analogues.



We report here a more flexible and much shorter synthetic route to these types of lignans⁵. This involves novel tandem/domino reactions⁶, which take advantage of the less common combination of intermediates with different oxidation states. We report preliminary results of the extension on this type of chemistry aimed at the synthesis of 2,4-diaryl lignans of the type **1** to **4**.

REFERENCES

1. a) Saleem M., Kim H. J., Ali M. S., Lee Y. S., Nat. Prod. Rep. 696, 22 (2005), b) Lee K. H., Xiao Z., Phytochem. Rev. 341, 2 (2003).
2. Konishi T., Konoshima T., Daikonya A., Kitanaka S., Chem. Phar. Bull. 121, 53 (2005).
3. Esumi T., Hojyo D., Zhai H., Fukuyama Y., Tetrahedron Lett. 3979, 47 (2006).
4. a) Sellars, J. D., Steel P. G., Eur. J. Org. Chem. 3815 (2007), b) Sefkow M., Top. Curr. Chem. 185, 243 (2005).
5. For a preliminary result, see: Jahn U., Rudakov D., Org. Lett. 4481, 8 (2006).
6. Jahn U., Müller M., Aussieker S., J. Am. Chem. Soc. 5212, 122 (2000).

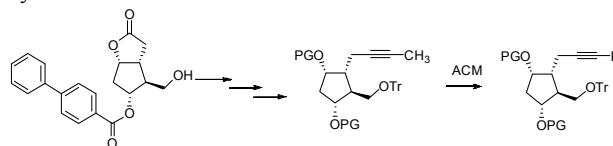
METATEZE ALKYNŮ: SYNTÉZA DERIVÁTU PROSTAGLANDINŮ Z COREYHO LAKTONU

ROMAN KEDER a **DALIMIL DVOŘÁK**

*VŠCHT, Fakulta chemicko-technologická, Ústav organické chemie, Technická 5, 166 28 Praha 6
Roman.Keder@vscht.cz*

V posledních letech získala metateze alkynů na důležitosti v organické syntéze^{1,2}. Metateze alkynů a následná hydrogenace přináší cenný přístup v syntéze organických látek obsahujících dvojnou vazbu s definovanou geometrií. Ten to přístup byl nedávno použit pro zavedení nenasyceného postranního řetězce do molekuly prostaglandinu s konfigurací *cis*- na dvojně vazbě³.

Vypracovali jsme nový přístup k prostaglandinovým derivátům s bočním alkynovým řetězcem z komerčně dostupného Coreyho laktonu. S těmito deriváty byla úspěšně provedena křížná metateze alkynů za homogenní katalýzy systémem Mo(CO)₆/fenol. Tento katalytický systém je na rozdíl od běžně používaných wolframových a molybdenových katalyzátorů, které jsou citlivé na vzdušnou vlhkost a atmosférický kyslík, vhodnější pro případné průmyslové využití.



Tento projekt byl podpořen výzkumným centrem Ministerstva školství, mládeže a sportu „Struktura a Syntetické využití komplexů přechodných kovů“ LC06070, MŠMT 6046137301.

LITERATURA

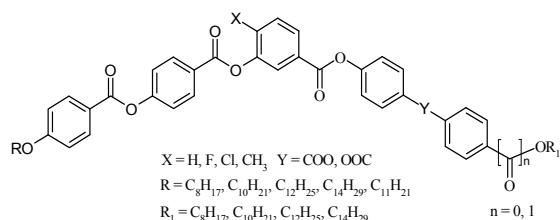
1. Mortreux A., Coutelier O.: J. Molecular Catalysis A 254, 96, (2006).
2. Fürstner A., Davies P. W.: Chem. Commun. 2307 (2005).
3. Fürstner A., Grell K., Mathes Ch., Lehmann Ch. W.: J. Am. Chem. Soc. 122, 11799 (2000).

DESIGN A SYNTÉZA LOMENÝCH KAPALNÝCH KRYSTALŮ NA BÁZI 3-HYDROXYBENZOOVÉ KYSELINY

MICHAL KOHOUT^a, JIŘÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b a MILADA GLOGAROVÁ^b

^aÚstav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bFyzikální ústav Akademie věd ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8

michal.kohout@vscht.cz Lomené kapalné krystaly patří mezi stále se intenzivně rozvíjející oblast materiálové chemie. V naší laboratoři jsme pro syntézu nových kapalných krystalických materiálů využili již několik nových typů centrálního jádra¹. Cílem presentované práce bylo, s ohledem na předchozí výsledky, připravit nové typy nesymetrických lomených kapalných krystalů odvozených od 3-hydroxybenzoové kyseliny (Obr. 1) a studovat jejich mesomorfní chování pomocí DSC, studií textur a rentgenostrukturní analýzou.



Obr. 1

Budou diskutovány rozdíly způsobené laterální substitucí centrálního jádra, délkou postranních řetězců a orientací esterových spojek na celkové změny v mesomorfním chování jednotlivých kapalných krystalů. Získané výsledky budou dále porovnány s materiály na bázi naftalenu².

Projekt výzkumu byl podporován vnitřním grantem VŠCHT Praha č. 110080015, MŠMT (projekt COST OC176 a výzkumným záměrem MSM 6046137301) a Grantovou agenturou České republiky grantem IAA100100710.

LITERATURA

1. Svoboda J., Novotná V., Kozmík V., Glogarová M., Weisslog W., Diele S., Pelzl G.: J. Mater. Chem. 13, 2104 (2003).
2. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: Liq. Cryst., 33, 41, (2006).

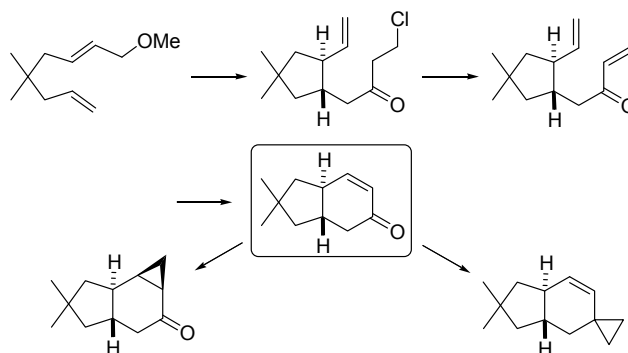
NOVÁ SYNTETICKÁ STRATEGIE PŘÍPRAVY SESKVITERPENOIDŮ

ALEŠ KOROTVIČKA^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
katora@natur.cuni.cz

Tricyklické terpenoidy s cyklopropanovým a cyklobutanovým kruhem vykazují zajímavé biologické účinky a proto tyto látky můžeme považovat za potenciální farmaka¹. Důvodem jsou zejména cytotoxické, fungicidní a antibakteriální vlastnosti těchto substancí. Zmíněná skupina látek je pozoruhodná i z chemického hlediska, neboť se jedná o seskupení s kondenzovaným pěti-, šesti- a pnutým trojčlenným (nebo čtyřčlenným) kruhem. Toto strukturální seskupení je přitažlivým námětem pro hledání a aplikaci nových syntetických postupů.

Význam použité metodiky podtrhuje i její možná aplikace na celou řadu příbuzných či polycyklických sloučenin. Klíčovým krokem je cyklizace 1-methoxy-2,7-oktadienu pomocí dibutylzirkonocenu² následovaná acylací za vzniku haloketonu. Jeho dehydrochlorace poskytla ketodien, jenž byl převeden metathetickou reakcí na bicyklický enon. Získaný enon posloužil jako klíčový meziprodukt k přípravě tricyklických látek s marasmanový a illudanový skelet.



Projekt byl financován z Centra pro nová antivirotika a antineoplastika MŠMT (Projekt č. 1M6138896301).

LITERATURA

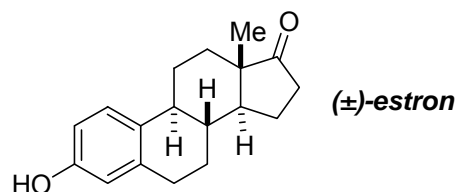
1. Abraham, W. R. Curr.: Med. Chem. 8, 583 (2001).
2. (a) Herrmann P., Kotora M., Buděšínský M., Šaman D., Čísařová I.: Org. Lett. 8, 1315 (2006). (b) Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: J. Org. Chem. 73, 6202 (2008).

VYUŽITÍ ORGANOKOVOVÉ CHEMIE V SYNTÉZE ESTRONU

MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
katora@natur.cuni.cz

Estron díky svým biologickým vlastnostem a strukturálnímu uspořádáním vždy byl a stále je zajímavým cílem jak pro biochemická studia, tak pro aplikaci nových syntetických metod. V uplynulých 60 letech byla publikována řada syntetických studií založených na různých přístupech výstavby steroidního skeletu. Klasické syntetické metody byly většinou založené na kondenzačních reakcích nebo na kationové cyklizaci polyenového prekurzoru. Rozvoj organokovové chemie (založené jak na stechiometrických, tak katalytických reakcích) koncem 60tých a začátkem 70tých let umožnil vypracovat nové a efektivnější strategie výstavby steroidního skeletu.



Pro syntézu estronu či molekul s obsahující jeho základní kostru byla použita metodiky založená na využití sloučenin celé řady přechodných kovů. Mezi nejzajímavější syntetické postupy patří cyklotrimerizace vhodně substituovaných alkenů

katalyzované sloučeninami kobaltu či na opakované použití Heckovy reakci katalyzované komplex palladia. Mezi zcela nové postupy výstavby estronového skeletu patří využití různých druhů cyklizací substituovaných dienů zprostředkované zirconocenovými sloučeninami (Cp_2ZrBu_2) a následované alkylací.¹⁻³

V uvedeném přehledu bude provedeno jak zhodnocení klíčových syntetických kroků, tak i srovnání celkových strategií z hlediska efektivity.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 1M0508.

LITERATURA

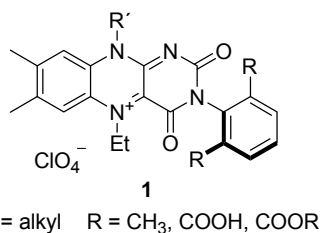
- Herrmann P., Katora M., Buděšínský M., Šaman D., Císařová I.: *Org. Lett.* 8, 1315 (2006).
- Herrmann P., Buděšínský M., Katora M.: *Chem. Lett.* 36, 1268 (2007).
- Herrmann P., Buděšínský M., Katora M.: *J. Org. Chem.* 73, 6202 (2008).

N-ARYLACE FLAVINŮ V POLOZE 3- ZA PODMÍNEK CHANOVA-LAMOVA COUPLINGU

HANA KOTOUČOVÁ^a a RADEK CIBULKA^b

^aPedagogická fakulta UK v Praze, M.D. Rettigové 4, 11639, Praha 1, ^bVŠCHT Praha, Technická 5, 16628 Praha 6
hana.kotoucova@seznam.cz; cibulka@vscht.cz

Flaviniové soli představují slibné organokatalyzátory oxidací využívajících peroxid vodíku nebo kyslík jako stechiometrické reagenty¹. Naším cílem je příprava atropoizomerních flaviniových solí typu **1**, které by mohly být využity při enantiosektivních *N* a *S* oxidacích.



Pro přípravu flavinových derivátů s arylovou skupinou v poloze 3- jsme navrhli přímou arylaci nesubstituovaného flavinu za podmínek Chanova-Lamova couplingu boronovu kyselinou v přítomnosti stechiometrického množství síranu měďnatého^{2,3}. Tento přístup byl z hlediska výtěžku reakce účinnější než paralelně vyvíjený postup využívající acetat měďnatý⁴. Jeho použití je však zatím omezeno na *m*- a *p*- substituované boronové kyseliny.

Autoři děkují Grantové agentuře České republiky (projekt č. 203/07/1246)

LITERATURA

- Feyissa Gadissa Gelalcha: *Chem. Rev.* 107, 3338 (2007)

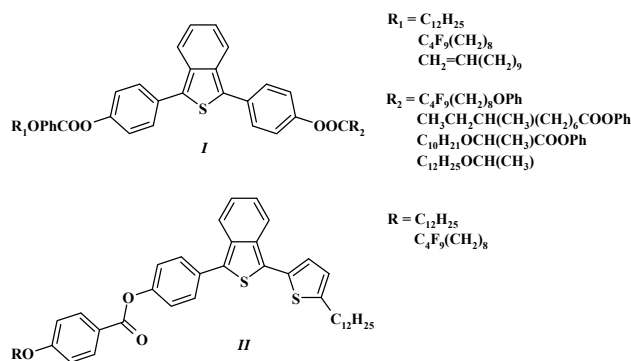
- Yang Yue, Zhang-Guo Zheng, Bo Wu, Chuan-Qin Xia, Xiao-Qi Yu: *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 5154.
- Patric Y. S. Lam, Guillaume Vincent, Charles G. Clark, Sophie Deudon and Prabhakar K. Jadhav: *Tetrahedron Letters* 57, 3415 (2001).
- Bianca Attenberger, Harald Schmaderer, Burkhard König: *Synthesis* 11,1767 (2008).

KAPALNÉ KRYSYALY ODVOZENÉ OD BENZO[C]THIOFENU – SYNTÉZA, FYZIKÁLNÍ A FLUORESCENČNÍ VLASTNOSTI

**ANNA KOVÁŘOVÁ^a, JIŘÍ SVOBODA^a,
VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b, MILADA GLOGAROVÁ^b,
MIREK SALAMONCZYK^c, EWA GORECKA^c,
a DAMIAN POCIECHA^c**

^aÚstav organické chemie, VŠCHT Praha., Technická 5, Praha 6, 166 28; ^bFyzikální ústav AV ČR, Na Slovance 2, Praha 8, 182 21; ^cChemistry Department, Warsaw University, Al. Zwirky i Wiguri 101, 02-089 Warsaw, Poland
kovarova@vscht.cz

V této práci bude představena syntéza a fyzikální vlastnosti kapalných krystalů odvozených od 1,3-diarylbenzo[*c*]thiofenů. Vedle základních symetrických materiálů, které vykazovaly pouze nematickou kapalně krystalickou fázi¹, byly připraveny i látky nesymetrické, resp. látky s chirálním prvkem v molekule **I**, které vykazovaly polymorfismus. S cílem modifikovat optické vlastnosti byly připraveny také materiály s centrálním jádrem obsahující další thiofenovou jednotku **II**.



Fyzikální vlastnosti nových materiálů byly studovány optickou polarizační mikroskopií, studiem textur a pomocí DSC. U vybraných látek byly studovány fluorescenční vlastnosti.

Práce byla podporována vnitřním grantem VŠCHT Praha 110080015, MŠMT (projekt COST OC176 a výzkumným záměrem MSM 6046137301) a Grantovou agenturou České republiky (grantem IAA100100710).

LITERATURA

1. A. Kovářová, J. Svoboda, V. Novotná, M. Glogarová, M. Salamonczyk, E. Gorecka and D. Pocięcha: Poster PA11, ECLC 2007 – 9th European Conference on Liquid Crystals, Lisbon, Portugal.

**AMIDINY JAKO EXO- I ENDO- RECEPTORY
V TEKTONOVÉ SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMII:
STUDIUM PŘÍPRAVY, KOORDINAČNÍCH
SCHOPNOSTÍ A SCHOPNOSTI TVORBY
SUPRAMOLEKULÁRNÍCH STRUKTUR**

PETR KOVAŘÍČEK a ROMAN HOLAKOVSKÝ

VŠCHT Praha, Ústav organické chemie, Technická 5, Praha 6,
166 28

petr.kovaricek@vscht.cz

Amidiny jako dusíkaté deriváty karboxylových kyselin se těší veliké oblibě v oborech koordinační a supramolekulární chemie díky jejich schopnosti tvořit jak donor-akceptorové, tak vodíkové vazby, včetně charge-transfer vodíkových vazeb^{1,2,3}. Přesto pro přípravu specifických amidinů není znám univerzální postup a vždy je třeba pro daný konkrétní případ hledat vhodnou cestu přípravy.

Jednou z takových cest přípravy cyklických amidinů je reakce nitrilu s diaminem za katalýzy sulfidem fosforečným. Ačkoliv je tato reakce citována mnohými publikacemi^{4,5}, mechanismus účinku není doposud bezpečně známý a je přijato obecné přesvědčení, že dochází k in situ tvorbě thioamidu, který následně ochotně podstupuje nukleofilní adici aminem. Tato hypotéza byla testována IČ spektroskopii a v určitých případech tuto skutečnost potvrdila⁶. Byla provedena optimalizační studie za účelem stanovení optimálních podmínek a trendu v reakci homologu a specifických struktur (calix[4]arenů). Struktury jak volných, tak cyklických amidiniových solí dále byly testovány na schopnost tvorby koordinačních sloučenin a supramolekulárních sítí.

Bylo zjištěno, že sloučeniny typu α -(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)- a α -(carboxamidino)-pyridinu jsou schopny vytvářet velmi stabilní komplexy, které ochotně krystalují z vodných roztoků. Tyto sloučeniny jsou nadále intenzivně studovány díky možnosti tvořit v sekundární koordinační sféře druhotné interakce, ať již vodíkové vazby či charge-transfer vodíkové vazby k akceptorům vodíkových vazeb. Simultánně je studován postup přípravy cyklometalačních komplexů, které jsou amidiny také schopny vytvářet.

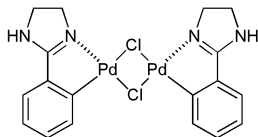


Schéma 1: Cyklometalační komplexy amidinů

LITERATURA

1. Félix O., Hosseini M.W.: Chem. Commun. 2000, 281.
2. Ferlay S., Holakovský R.: Chem. Commun. 2003, 1224.
3. Braga D., Maini L., Grepioni F., De Cian A., Félix O., Fischer J., Wais Hosseini M.: N. J. Chem. 7, 547, (2000).
4. Anastassiadou M. et al.: Bioorg. Med. Chem. 9, 585 (2001)
5. Oxley P., Short W. F.: J. Chem. Soc. 1946, 147.
6. Kovaříček P., Bakalářská práce, VŠCHT Praha (2008).

**NOVÉ ORGANICKÉ POLYMERY ODVOZENÉ OD
KONDENZOVANÝCH THIOFENŮ**

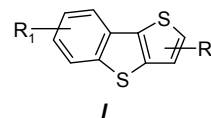
**VÁCLAV KOZMÍK^a, JIŘÍ SVOBODA^a, CH. LO^b,
ALAIN ADENIER^b, FRANCOIS MAUREL^b, KATHLEEN
CHANE-CHING^b a JEAN-JACQUES AARON^b**

^aÚstav organické chemie, VŠCHT, Technická 5, 16628 Praha 6 ; ^bITODYS, Université Paris 7, 1 Guy de la Brosse, Paris, France

Vaclav.Kozmik@vscht.cz

V poslední době je věnována velká pozornost přípravě nových vodivých organických polymerů a rozšíření jejich aplikace v elektronických zařízeních, luminiscenčních systémech, tenkovrstvých transistorech, atd., zvláštní pozornost byla dosud věnována derivátům polythiofenu¹.

Na základě těchto výsledků se autoři v této práci zaměřují na syntézu a polymeraci zcela nových monomerů obecného vzorce I.



V práci je diskutována syntéza vhodných monomerů, metody polymerace, charakterizace připravených polymerů a optické vlastnosti takto připravených nových materiálů.

Projekt výzkumu byl podporován MŠMT (projekt COST OC176 a výzkumným záměrem MSM 6046137301).

LITERATURA

1. Wegner G., Mullen K.: *The Oligomer Approach*, VCH Publisher, Weinheim, 1997.
2. Mězlová M., Aaron J. J., Svoboda J., Adenier A., Maurel F., Chane-Ching K.: J. Electroanal. Chem. 581, 93 (2005).
3. Lo Ch., Adenier A., Chane-Ching K., Maurel F., Aaron J. J., Košata B., Svoboda J.: Synth. Met. 156, 256 (2006).
4. Lo Ch., Adenier A., Maurel F., Aaron J. J., Kozmík V., Svoboda J.: Synth. Met. 158, 6 (2008).

S-ARYLACE METHYL-N-ACETYLCYSTEINÁTU A DIMETHYL-N,N'-DIACETYLCYSTEINÁTU**JAN KROUŽELKA^a a IGOR LINHART^a**^aÚstav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
krouzelj@vscht.cz

Fenylmerkapturová kyselina je prokázaným metabolitem benzenu¹, který slouží jako biologický indikátor jeho expozice². Vzniká slučováním metabolicky aktivovaného benzenu ve formě benzenoxidu s glutathionem *in vivo* a následnými biotransformačními přeměnami¹. *S*-Arylace methyl-*N*-acetylcysteinátu pomocí arylboronových kyselin v přítomnosti octanu měďnatého a pyridinu se jeví jako vhodná metoda pro přípravu fenylmerkapturové kyseliny jakož i řady dalších arylmerkapturových kyselin. Dle literatury se cysteinová struktura měďnatými ionty oxiduje na cystinovou a teprve na té dochází k arylaci, při níž se aryluje pouze jeden atom síry výchozího cystinu³. Navrhovaný mechanismus však neodpovídá pozorování, neboť výtěžky reakce z methyl-*N*-acetylcysteinátu přesahují zmíněnou hranici. Použitím dimethyl-*N,N'*-diacetylcysteinátu jako výchozí látky a octanu měďného jsme dosáhli lepších výtěžků arylmerkapturových kyselin, než v případě methyl-*N*-acetylcysteinátu a octanu měďnatého. (Schéma 1)

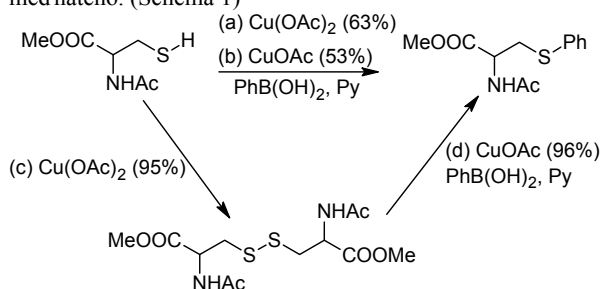


Schéma 1

Navrhli jsme nový mechanismus *N*-arylace v němž oba atomy síry v *N*-acetylcysteinátu jsou arylvány a z jednoho molu *N*-acetylcysteinátu tak vznikají dva moly arylmerkapturátu.

Autoři děkují za finanční podporu granty BIOMUK Národního programu výzkumu II (MSM 2B08051) a LC06070 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

LITERATURA

1. Snyder R., Hedli C. C.: *Env. Health. Persp.* 104 (Supp. 6), 1165 (1996).
2. Inoue O, Kanno E., Kakizaki M., Watanabe T, Higashikaw K., Ikeda M.: *Industrial Health* 38, 195 (2000).
3. Savarin C., Šrogl J. a Liebeskind L. S.: *Org. Lett.* 4, 4309 (2002).

PŘÍPRAVA 6-ALKENYLPURINŮ S VYUŽITÍM SONOGASHIROVY REAKCE A NÁSLEDNÉ HYDROSTANNACE**MARTIN KŘOVÁČEK, MARTIN KLEČKA, TOMÁŠ TOBRMAN a DALIMIL DVOŘÁK**

Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28, Praha 6.

krovacem@vscht.cz

Purinový skelet představuje důležitý strukturální motiv, vyskytující se jako součást základních stavebních bloků nukleových kyselin ve všech živých organismech. Není proto překvapující, že řada purinových derivátů vykazuje rozmanitou biologickou aktivitu. Mezi takové látky patří i puriny nesoucí uhlíkaté substituenty v polohách 2, 6 a 8 (lit.¹).

6-Alkenylpuriny představují tedy molekuly, které mohou jednak samy vykazovat biologickou aktivitu, zároveň je přítomnost dvojné vazby výhodná pro další funkcionalizaci, např. adicí nukleofilů².

Stále větší uplatnění v syntéze C-substituovaných purinů nacházejí palladiem katalyzované *cross-coupling* reakce. Pro syntézu 6-alkenylpurinů lze využít např. Suzuki-Miyaura nebo Stilleho reakce. Tyto metody však v některých případech narážejí na špatnou dostupnost odpovídajících boronových kyselin, resp. sloučenin organostannanů. Rozhodli jsme se využít alternativní reakční sekvenci, tj. Sonogashirovu reakci s následnou redukcí trojné vazby:

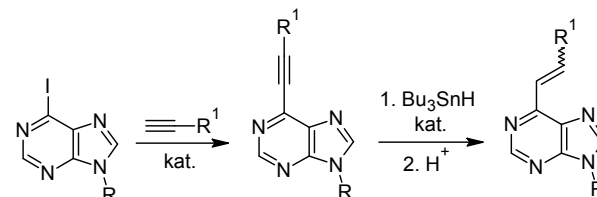


Schéma 1.

Zjistili jsme, že Sonogashirovu reakci lze v některých případech provést bez použití mědi a následná redukce poskytuje v případě použití vhodného katalyzátoru alken s definovanou konfigurací a dobrou stereoselektivitou.

Tato práce byla podporována Centrem základního výzkumu LC06070: "Struktura a syntetické aplikace komplexů přechodných kovů" Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

LITERATURA

1. Legraverend M., Grierson D. S.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 3987 (2006).
2. Kuchař M., Pohl R., Votruba I., Hocek M.: *Eur. J. Org. Chem.* 2006, 5083.

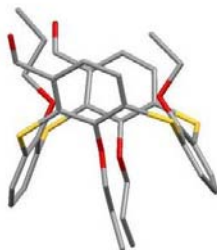
**NOVÉ OBJEVY V CHEMII THIA[4]CALIXARENŮ:
META-SUBSTITUCE**

**ONDŘEJ KUNDRÁT^a, JAN KROUPA^a,
HANA DVORÁKOVÁ^b, VÁCLAV EIGNER^c,
MICHAELA POJAROVÁ^c, IVANA CÍSAŘOVÁ^d,
JAN BUDKA^a, STANISLAV BŮHM^a, IVAN STIBOR^a
a PAVEL LHOTÁK^a**

^aÚstav organické chemie, ^bLaboratoř NMR spektroskopie, ^cÚstav chemie pevných látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^dKatedra anorganické chemie, PřF UK, Hlavova 8, 128 43 Praha 2
kundrao@vscht.cz

Thiacalix[4]areny substituované na horním okraji mohou sloužit jako cenné syntetické intermediáty při designu a syntéze složitějších supramolekulárních struktur. Protože dosud je známa jediná práce zabývající se S_E aromatickou tetraalkylovaného derivátu thiacalixarenu, zaměřili jsme se na tento typ reakcí.

Byl proveden systematický výzkum nitrace a přímé formylace tetrapropoxyderivátů thiacalix[4]arenu immobilizovaných ve třech konformacích, a to kónické, částečně kónické a 1,3-alternující. V závislosti na konformaci výchozí látky byla získána řada unikátních nitro-/formyl-derivátů. Vůbec poprvé byly syntetizovány deriváty s aldehydickými resp. nitroskupinami v *meta*-polohách a také zcela výjimečný thiacalixaren přemostěný methylenovou spojkou. Výsledky různých přímých formylačních metod jako Vilsmeier-Haackova (PhN(CH₃)CHO, POCl₃), Duffova (urotropin, TFA) nebo Grossova metoda (Cl₂CHOCH₃, SnCl₄ nebo TiCl₄) a podmínky nitrace budou diskutovány. Výsledky těchto reakcí v calixarenové chemii poskytují výhradně jen *para*-substituované aldehydy.



Tento výzkum byl podpořen Grantovou agenturou ČR (grant 104/07/1242) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (COST D31 00134).

Literatura:

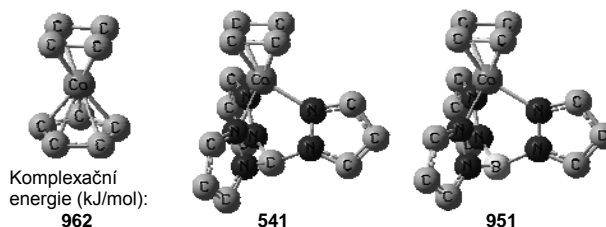
1. Morohashi N., Narumi F., Iki N., Hattori T., Miyano S.: Chem. Rev. 106, 5291 (2006).
2. Lhotak P.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 1675.
3. Desroches C., Kessler V. G., Parola S.: Tetrahedron Lett. 45, 6329 (2004).

**TEORETICKÁ STUDIE ISOMETALLOCEŇŮ NA BÁZI
TRIPYRAZOLYLMETHANŮ NEBO ŠKORPIONÁTŮ A
BUTADIENOVÝCH DIANIONTŮ.**

**JAROSLAV KVÍČALA, MARTIN SKALICKÝ
a MARKÉTA RYBÁČKOVÁ**

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6;
kvicalaj@vscht.cz

Kobaltové čtvercové isometalloceny na bázi cyklopentadienového a cyklobutadienového ligandu patří mezi perspektivní komplexy využitelné pro konstrukci organizovaných povrchů^{1,2}. Škorpionáty (tripyrazolyboráty) a tripyrazolylmethany jsou isoelektronické s cyklopentadienovým ligandem, existuje však jediné krátké sdělení o syntéze isometalocenů obsahujících tyto ligandy³. Paralelně s experimentální přípravou polyfluoralkylovaných tripyrazolylmethanů jako ligandů interagujících s fluorofilními povrchy jsme pomocí DFT metod s korekcí chyby superpozice sady bazových funkcí (BSSE) porovnali komplexační energie cyklopentadienových, škorpionátových a tripyrazolylmethanových ligandů. Přitom jsme u pyrazolových ligandů studovali vliv substituce trifluormethylou skupinou v poloze 3 nebo 4 pyrazolového kruhu.



Z komplexačních energií spodního patra isometalocenů na obrázku je zřetelný stabilizační vliv záporného náboje cyklopentadienového a škorpionátového ligandu.

Trifluormethylace v poloze 4 pyrazolového ligandu má pouze malý vliv na komplexační energii, naproti tomu trifluormethylace v poloze 3 má za následek zvýšené sterické nároky ligandu. V případě substituovaných cyklobutadienových ligandů, jako je tetramethylcyklobutadien, tak dochází ke ztrátě trikoordinace tripyrazolylmethanového ligandu s výrazným poklesem komplexační energie.

Děkujeme Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (výzkumné centrum LC06070, výzkumný záměr č. 6046137301, projekt KONTAKT ME 857) za finanční podporu tohoto projektu.

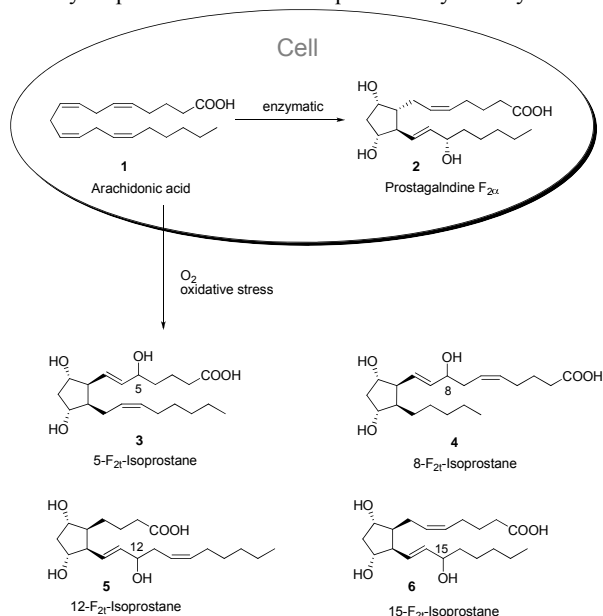
LITERATURA

1. Pospíšil L., Varaksa N., Magnera T. F.; Brotin T., Michl J.: Langmuir 23, 930 (2007).
2. Bunz U. H. F.: J. Organomet. Chem. 683, 269 (2003).
3. O'Sullivan D. J., Lalor F. J.: J. Organomet. Chem. 57, C58 (1973).

TOWARD THE TOTAL SYNTHESIS OF 5-, 8-, 12- AND 15-F₂₁-ISOPROSTANETANJA LAU^{a,b} and ULLRICH JAHN^b

^aInstitut für Organische Chemie, TU Braunschweig, Hagenring 30, D-38106 Braunschweig, Germany; ^bIOCB AS CR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic
lau@uochb.cas.cz

Isoprostanes **3-6**, which are produced from arachidonic acid **1** via autooxidative pathways in the human body, are diastereomers to the well known prostaglandins **2**. Since they have been discovered at the beginning of the nineties^{1,2}, it has been shown that they display significant biological activities.³ Their increase in formation is related to a variety of diseases like stroke, pulmonary disorders, atherosclerosis or Alzheimer's syndrome. There is firm evidence that monitoring isoprostanes constitutes the "gold standard" in the diagnostics of oxidative stress and its relation to human diseases. For further research isomerically pure material is required, which can only be provided in sufficient quantities by total synthesis³.



We present here initial results on the development of a unified strategy toward modular syntheses to 5-, 8- and 12-F₂₁-isoprostane.

REFERENCES

- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F., Roberts II, L. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *87*, 9383 (1990).
- Morrow, J. D., Awad, J. A., Boss, h. J., Blair, I. A., Roberts II, L. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *89*, 10721 (1992).
- Jahn, U., Galano, J.-M., Durand, T. Angew. Chem. Ind. Ed., *47*, 5894 (2008).

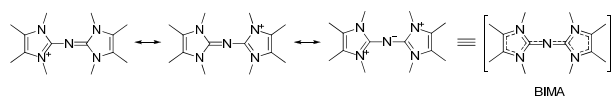
SYNTHESIS, STRUCTURE AND PROPERTIES OF BIS(N,N'-DIALKYLIMIDAZOLIUM)-AMINES, NEW HIGHLY STABLE LIPOPHILIC ORGANIC CATIONS.

ILYA M. LYAPKALO*, ROMAN A. KUNETSKIY

IOCB AS CR, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic
ilya.lyapkalo@uochb.cas.cz

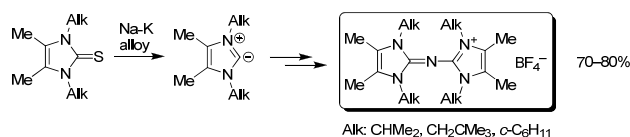
Lipophilic organic cations in molar or catalytic amounts are indispensable auxiliaries for solubilization of anionic reagents in organic media. The catalytic application, phase-transfer catalysis, has become an essential methodology particularly for industrial processes¹. Among these the most important processes are base catalyzed; they often utilize aqueous alkali hydroxides as second phase. In this respect, stability of the organic cation towards the aqueous base under the reaction condition is of primary concern. Recent development along this line has culminated in synthesis of phosphazanium cations with maximum base resistance among the organic cations known to date². In particular, ball-shaped [(Me₂N)₃P=N]₄P⁺X⁻ has been commercialized and already found broad application².

Nevertheless, we felt that synergetic combination of relevant steric and electronic effects might lead to design and synthesis of structures with even greater stability towards bases / nucleophiles. We envisaged that, if formation of the cationic pattern is accompanied by *aromatisation* of the structure, it may impart substantial thermodynamic and kinetic stability to the cation and further increase the base resistance. Taking into account a pronounced aromatic character of imidazole core, we decided to synthesize new organic cations, bis(imidazolium)amines (BIMA):



Simple analysis of the resonance structures of BIMA reveals symmetrical distribution of the positive charge between two imidazolium rings thereby enabling maximum delocalisation.

The synthesis of BIMA salts was carried out according to the following scheme:



The tetraalkyl BIMA·BF₄ obtained are stable, non-hygroscopic salts soluble in chlorinated hydrocarbons and polar organic solvents.

We were delighted to find out that stability of tetraalkyl BIMA towards 50% aqueous alkali base to be far greater than that of the commercially available P₅-phosphazanium salt² [(Me₂N)₃P=N]₄P⁺X⁻.

Synthesis, stability tests and structural features making possible the enhanced stabilities of the BIMA cations obtained will be discussed.

REFERENCES

- Halpern M. E.: Proc. Chem. Pharm. Ind. 1999, 283.; Makosza M., Fedorynski M. in: *Interfacial Catalysis* (Ed.: A. G. Volkov), Dekker, New York, Basel, 2003, pp. 159 – 201; Albanese D. in: *Interfacial Catalysis* (Ed.: A. G. Volkov), Dekker, New York, Basel, 2003, pp. 203 – 226.
- Schwesinger R., Link R., Wenzl P., Kossek S., Keller M.: Chem. Eur. J. 2006, 429 and reference cited therein; R Schwesinger., Link R., Wenzl P., Kossek S., *ibid.* 438.

POLYETHYLENGLYKOLOVÉ KONJUGÁTY AMFOTERICINU B – SYNTÉZA A HODNOCENÍ

MILOŠ SEDLÁK^a, KAREL VENTURA^a, PETR JÍLEK^b, MARCELA VEJSOVÁ^b, LENKA KUBICOVÁ^b a MILOŠ MACHÁČEK^b

^a Univerzita Pardubice, FCHT, nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice; ^b Univerzita Karlova v Praze, FarmF fakulta v Hradci Králové; Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové machacek@faf.cuni.cz

Amfotericin B (AmB) je polyenové antibiotikum, které se používá ve formě koloidní disperze s natrium-deoxycholátem pro systémovou terapii mykóz. K dispozici jsou i přípravky, v nichž je AmB vázán na lipidový nosič¹. Další možnosti, jak modifikovat vlastnosti léčiva, je jeho navázání na polymerní nosič, např. polyethylenglykol („PEGylace“)².

Konjugáty AmB s polyethylenglykolem byly připraveny, jak je uvedeno ve schématu.

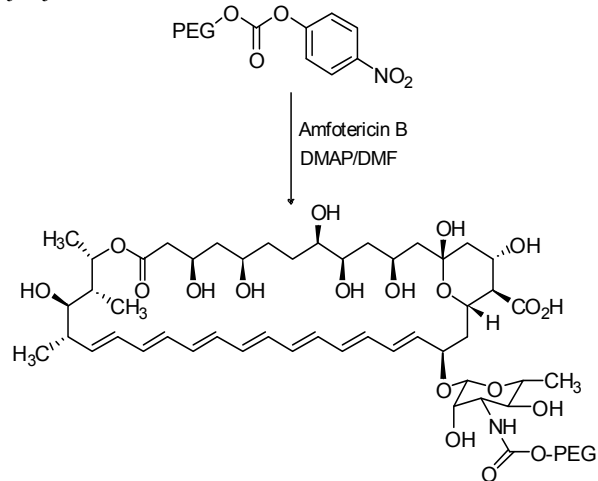


Schéma. PEG = CH₃O[CH₂CH₂O]_nH, HO[CH₂CH₂O]_nH (M(PEG) = 5 000, 10 000, 20 000)

U připravených látek byl studován vliv pH na jejich stabilitu, resp. na uvolňování AmB. Hodnocení antimykotické aktivity *in vivo* bude provedeno pomocí modelu systémové kandidózy u myši premedikovaným cyklofosfamidem.

Tato práce vznikla za podpory projektu MŠMT ČR 0021627501 a grantu GAČR 203/06/0583.

LITERATURA

- Kubicová L., Pravda M., Buchta V., Vopršalová M., Sedlák M.: Cent. Eur. J. Public Health 12 Suppl., S54 (2004).
- Sedlák M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 70, 269 (2005).

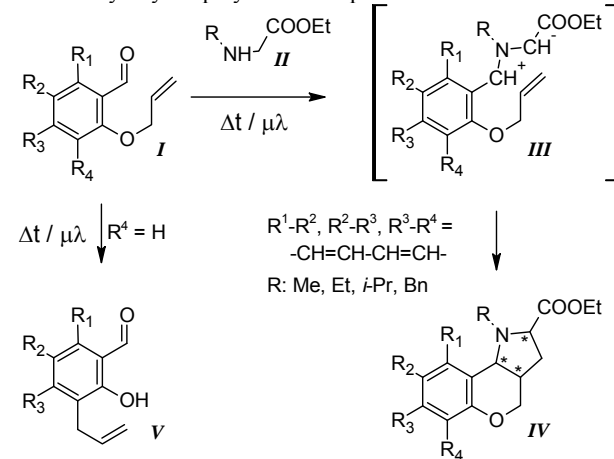
VYUŽITÍ MIKROVLNNÉ INICIACE PŘI SYNTÉZE SUBSTITUOVANÝCH HEXAHYDROCHROMENO[4,3-*b*]PYROLŮ

STANISLAV MAŇ, LUKÁŠ RÝČEK, LUKÁŠ TENORA, a MILAN POTÁČEK

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, Brno, 611 37 sten@chemi.muni.cz

Na našem pracovišti se dlouhodobě zajímáme o využití mikrovlnného záření v organické syntéze. Zejména se jedná o přípravu nových heterocyklických sloučenin cestou 1,3-dipolárních cykloadičních reakcí azomethin ylidů^{1,2}.

Potřebný azomethin ylid **III** se získává *in situ* reakcí aldehydu **I** se sekundárním aminem **II** nesoucím akceptorní skupinu v α poloze vůči dusíku. V dalším kroku dochází k intramolekulární reakci takto vzniklého dipólu s násobnou vazbou allyloxy skupiny za vzniku produktu **IV**^{3,4}.



Pokud se jako výchozí sloučenina **I** použije derivát benzenu, probíhá reakce při teplotě ~ 200 °C v mikrovlnném poli s dobrými výtěžky jediného diastereomeru. Naopak, pokud se použijí různé deriváty naftalenu, dochází za stejných podmínek ke vzniku jen malého množství produktu **IV**. Jako

hlavní směr reakce je v tomto případě Claisenův přesmyk a případně vznik dalších rozkladných produktů. Tuto pro nás vedlejší reakci je možno potlačit snížením reakční teploty, což na druhé straně vede k prodloužení reakční doby a navíc je pozorována tvorba směsi diastereomerů.

Tato práce vznikla za podpory grantu COST OC08052 MŠMT ČR.

LITERATURA

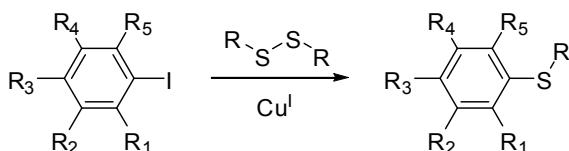
1. Bashiardes G., Safir I., Mohamed A. S., Barbot F., Laduranty J.: *Org. Lett.* 5, 4915 (2003).
2. Neuschl, M., Bogdal D., Potáček M., *Molecules* 12, 49 (2007).
3. Pospíšil J., Potáček, M.: *Tetrahedron* 63, 337 (2007).
4. Pospíšil J., Potáček, M.: *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 710.

PÁR MĚŤ / ASKORBOVÁ KYSELINA JAKO KATALYTICKÝ SYSTÉM PRO REDUKTIVNÍ CROSS-COUPLING ARYLJODIDŮ S DISULFIDY. STUDIUM OBECNOSTI A SYNTETICKÉHO VYUŽITÍ REAKCE.

MAREK MARTÍNEK a JIŘÍ ŠROGL

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, Praha – Dejvice, jsrogl@uochb.cas.cz

Organické disulfidy^{1,2,3} jsou jedním ze základních kamenů organické chemie. Cílem naší práce je podrobná studie jejich reaktivity v reduktivní cross-couplingové reakci s organickými halogenidy katalyzované měďnými solemi⁴. 3-Methylsalicylát měďný, který se ukázal jako nejvhodnější katalyzátor, je udržován v aktivním stavu pomocí L-askorbátu sodného⁵. Nejlepší konverze bylo dosaženo za použití vody jako rozpouštědla a přítomnosti katalyzátorů fázového přenosu. V této práci byla studována obecnost reakce vzhledem k použitým výchozím látkám.



Tato práce vznikla za podpory GAČR (203/08/1318)

LITERATURA

1. Huxtable R. J. Ed.: *Biochemistry of Sulfur*. Plenum Press, New York 1986.
2. Oae S., Okuyama T.: *Organic Sulfur Chemistry: Biochemical Aspects*. CRC Press, Inc. Boca Raton 1992.

3. Oae S., Okuyama T.: *Organic Sulfur Chemistry: Structure and Mechanism*. CRC Press, Inc. Boca Raton 1992.
4. Taniguchi N., Onami T.: *J. Org. Chem.* 69, 915 (2004).
5. Korf M.: *Diplomová práce*, VŠCHT Praha, 2008.

Pd-KATALYZOVANÁ SYNTÉZA BICYKLIČKÝCH PENTENOLIDŮ

ELIŠKA MATOUŠOVÁ a MILAN POUR

Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové matoe2aa@faf.cuni.cz

Přírodní látky obsahující dienolidové strukturální seskupení se vyznačují širokým spektrem biologických aktivit, které zahrnují antitumorózní¹, insekticidní² a významné antifungální účinky³. Jedná se například o antifungální látku CR 377 (**1**), která byla izolována z extraktu houby *Fusarium sp.*, a podobné strukturální uspořádání lze nalézt i v podolaktonech (**2**) izolovaných z různých druhů rodu *Podocarpus*.

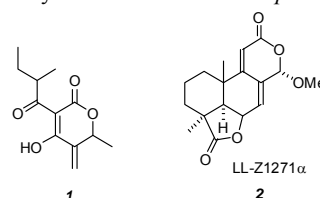


Schéma 1.

Cílem práce je dále studovat nenasyčené šestičlenné laktony po chemické i biologické stránce. Postup přípravy analog polycyklických laktonů vyplývá ze schématu 2. Využívá se při ní Pd-katalyzované karbopaladační reakce zakončené laktonizací⁴.

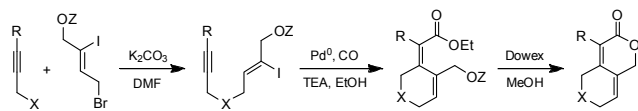


Schéma 2.

X = O, N-Ts, C(COOMe)₂

Touto metodou byl připraven dusíkatý a karbocyklický derivát bez substituce v poloze 4 (R = H) a obě látky byly otestovány na antifungální a cytotoxickou aktivitu. Kyslíkatý analog prozatím připraven nebyl, odpovídající enyn (X = O) jsme získali pouze v nízkých výtěžcích.

Práce vznikla za podpory Centra pro výzkum nových antivirotik a antineoplastik, podporovaného MŠMT ČR (1M0508), Grantové agentury ČR (projekt č. 203/07/1302), Grantové agentury UK (289/2006/B-CH/FaF) a výzkumného záměru MŠMT ČR (MSM0021620822).

LITERATURA

1. Hembree J. A., Chang C., McLoughlin J. L., Cassady J. M., Watts D. J., Wenkert E., Fonseca S. F., De Paiva Campello J.: *Phytochemistry* 18, 1691 (1979).

- Singh P., Russell G. B., Hayashi Y., Gallagher R. T., Fredericksen S.: *Entomol. Exp. Appl.* 25, 121 (1979).
- Hosoe T., Nozawa K., Lumley T. C., Currah R. S., Fukushima K., Takizawa K., Miyaji M., Kawai K.: *Chem. Pharm. Bull.* 47, 1591 (1999).
- Schiller R., Pour M., Fáková H., Kuneš J., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 69, 6761 (2004)

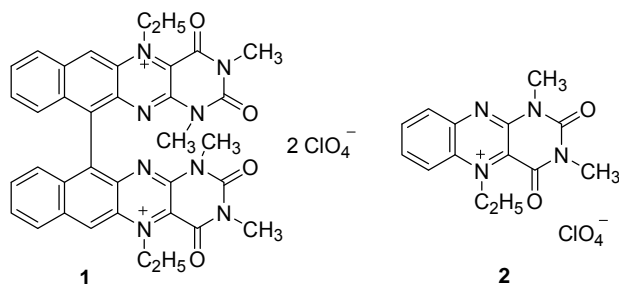
PŘÍPRAVA A VLASTNOSTI CHIRÁLNÍCH FLAVINIOVÝCH SOLÍ ODVOZENÝCH OD 1,1'-BINAFTALEN-2,2'-DIAMINU

PETRA MÉNOVÁ a **RADEK CIBULKA**

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 16628 Praha 6
petra.menova@seznam.cz; cibulka@vscht.cz.*

Jednu z nových účinných metod pro chemoselektivní oxidace sulfidů, terciárních aminů a Baeyer-Villigerovy oxidace představuje oxidace peroxidem vodíku katalyzovaná flaviniovými solemi. V literatuře¹ bylo doposud popsáno pouze několik chirálních flaviniových solí využívaných jako katalyzátory pro enantioselektivní oxidace substrátů.

My jsme navrhli axiálně chirální flaviniovou sůl **1** odvozenou od 1,1'-binaftalen-2,2'-diaminu, který je dostupný v enantiomerně čisté podobě z 2-naftolu. Výhodou tohoto přístupu je, že pokud vycházíme z opticky čisté výchozí látky, žádný z reakčních kroků by neměl způsobit změnu konfigurace.



Klíčovým krokem pro přípravu soli **1** byla reakce 1,1'-binaftalen-2,2'-diaminu se substituovaným 6-chloruracilem. Tuto reakci, dosud využívanou jen pro syntézu izomerních isoalloxazinů², jsme optimalizovali pro přípravu alloxazinů a úspěšně ji aplikovali na syntézu kvarterních bisflaviniových solí (*R*)-**1** a (*S*)-**1**. Následně jsme připravenou bisflaviniovou sůl **1** testovali jako katalyzátor oxidace sulfidů a terciárních aminů peroxidem vodíku s využitím modelových substrátů. Účinnost látky **1** jsme porovnávali s jednoduchou alloxaziniovou solí **2**. Pozornost jsme rovněž věnovali vyhodnocení enantioselektivity při oxidaci modelových substrátů.

Autoři děkují Grantové agentuře České republiky (projekt č. 203/07/1246) za finanční podporu.

LITERATURA

- Shinkai S., Yamaguchi T., Manabe O., Toda F.: *Chem. Commun.* 1988, 1399; Murahashi S.-I.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 34, 2443 (1995); Murahashi S.-I., Ono S., Imada Y.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2366 (2002).
- Yoneda F., Sakuma Y., Ichiba M., Shinomura K.: *J. Am. Chem. Soc.* 98, 830 (1976).

BIOTECHNOLOGICKÁ VÝROBA ORÁLNĚ PODÁVANÝCH AKTIVNÍCH FARMACEUTICKÝCH SUBSTANCÍ (API)

MARIE MÉZLOVÁ, **MIROSLAVA ČIKOŠOVÁ**,
VIKTOR MALANÍK, **ALENA KOSTEČKOVÁ**
a **JANA FORMÁNKOVÁ**

*Lonza Biotec s.r.o., Okružní 134, 281 61 Kouřim
Marie.Mezlova@lonza.com*

Orálně podávané aktivní farmaceutické ingredience (API) vyráběné biotechnologickým postupem jsou obecně označovány jako biofarmaceutika. Tyto látky tvoří přibližně 25% trhu s biotechnologicky vyráběnými produkty, mezi které dále patří antibiotika, průmyslové enzymy a potravinové a krmivářské doplňky.

Biofarmaceutika můžeme rozdělit podle dvou základních kritérií podle toho, jak vznikly a jakou mají molekulovou hmotnost. Biofarmaceutika mohou být vyráběny buď takzvanou biosyntézou, tedy úplným vytvořením nové sloučeniny ze vstupních surovin za pomoci mikrobiálního kmene, nebo biotransformací, kdy mikrobiální kmen změní část molekuly vstupní suroviny do požadované struktury, např. vytvořením nebo změnou chirálního centra v molekule. Podle molekulové hmotnosti můžeme rozdělit biofarmaceutika na malé molekuly, peptidy a enzymy.

Výroba malých molekul i enzymů biotechnologickým postupem je určována především výběrem mikrobiálního kmene, parametry množení tohoto kmene tzv. fermentace a zpracováním vzniklé fermentační pŕůdy. Při výběru vhodných mikroorganismů se může jednat o kmen původní nebo geneticky modifikovaný (GMO), o plísně, bakterie, kvasinky, řasy, houby a někdy i viry. Jejich fermentace je ovlivňována především složením a teplotou fermentačního média, pH a vzdušením roztoku. Izolace API většinou zahrnuje zpracování fermentační pŕůdy kontinuální centrifugací, ultrafiltrací získaných roztoků přes různé typy membrán s definovanou porozitou a chromatografií. Konečná úprava API může být prováděna sprejovým sušením, lyofilizací a krystalizací.

Nedílnou součástí výroby API je dodržování zásad GMP, tedy správné výrobní praxe. Obecně vyžaduje především dokumentování a zpětné dohledání všech parametrů výroby včetně dat dokládajících čištění a konečnou kvalitu vyrobené API. Kvalita a čistota API může být prokazována pouze analytickými metodami plně validovanými pro příslušnou API.

Výroba API biotechnologickým postupem je velmi zajímavým, ale složitým procesem, který nikdy nekončí a který v sobě slučuje mnoho různých chemických oborů od

mikrobiologie a biochemie, přes chemické inženýrství, technologie až k fyzikální a analytické chemii.

Toto krátké sdělení vzniklo za podpory Lonzy Biotec s.r.o. která také dodala podklady k jeho přípravě.

LITERATURA

1. Q7A Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients; <http://www.fda.gov/CDER/guidance/4286fnl.htm> (staženo 23. 10. 2008).
2. 3AB1a Production and quality control of medicinal products derived by recombinant DNA technology; www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/3ab1aen.pdf (staženo 23. 10. 2008).

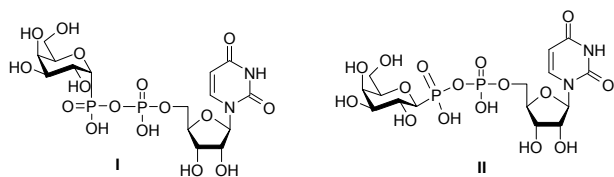
DEOXYFLUORGALAKTOSYLFOSFONÁTY

JITKA MORAVCOVÁ^a, IREKHJARGAL JAMBAL^a, KAREL KEFURT^a, KATEŘINA KULOVÁ^a, SIMONA SILLINGOVÁ^a a KATRIN GUENTHER^{a,b}

^aVysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bUniversita Postupim, Německo
Jitka.Moravcova@vscht.cz

Nahrazení difosfátové vazby v biologicky aktivních látkách vazbou fosfonofosfátovou je oblíbená syntetická taktika při hledání potenciálních léčiv. Vedle velice aktivních acyklických fosfonátů nukleosidů i nukleobazí by mohly být perspektivními strukturami rovněž glykosylfosfonáty. V nedávné době byly fosfonáty obsahující v organické části molekuly atom fluoru identifikovány jako nadějně sloučeniny se zajímavou biologickou aktivitou¹.

Jako součást předcházejícího studia inhibitorů galaktosyltransferas jsme připravili fosfonofosfáty **I** a **II**. Posledním krokem syntesy byl fosfomorfolidátový kaplink příslušného fosfonátu² a uridin-monofosfátu³. V další práci jsme se zaměřili na přípravu deoxyfluor- $\alpha(\beta)$,D-galaktopyranosylfosfonových kyselin, v nichž je atom fluoru zaveden postupně do polohy 2, 3, 4 a 6. To, že jejich příprava nebyla jednoduchá a vždy úspěšná, budeme předvádět v našem příspěvku.



Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6046137303.

LITERATURA

1. Romanenko V. D., Kukhar V. P.: Chem Rev. 106, 3868 (2006).

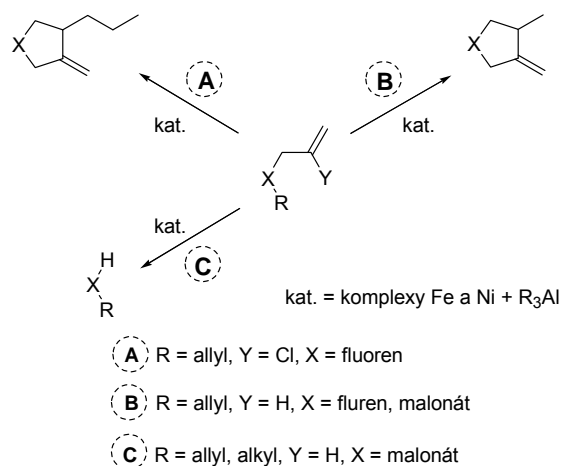
2. Heissigerová H., Kočalka P., Hlaváčková M., Imberty A., Breton C., Chazalat V., Moravcová J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 71, 1659 (2006).
3. Wittmann V., Wong C. H.: J. Org. Chem. 62, 2144 (1997).

OD ŽELEZA K NIKLU – CESTA PLNÁ PŘEKVAPENÍ

DAVID NEČAS^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
dauid.necas@seznam.cz; kotora@natur.cuni.cz.

Tvorba a štěpení C-C vazeb katalyzované pomocí komplexů přechodných kovů je v současné době bezesporu jednou z nejzajímavějších a nejintenzivněji zkoumaných oblastí výzkumu spjatého s organickou syntézou¹. Během několika předchozích let jsme publikovali několik katalytických systémů umožňujících právě tvorbu, či naopak, štěpení C-C vazeb. Tyto systémy sou založené na komplexech levných přechodných kovů, Fe či Ni, v kombinaci s organohlinitými sloučeninami (Et₃Al, Et₂AlCl) a vhodné pro alkylovací cyklizaci α,ω -halodienů^{2,3}, cyklizaci α,ω -dienů^{4,5} či štěpení neaktivované C-C vazby u allyl malonátů^{3,6,7}.



Tato práce byla podpořena projektem MŠMT č. LC 06070 Struktura a syntetické aplikace komplexů přechodných kovů.

LITERATURA

1. Activation of Unreactive Bonds and Organic Synthesis, Top. Organomet. Chem. 3, 1 (1999).
2. Nečas D., Kotora M., Císařová I.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 1280.
3. Nečas D., Drabina P., Sedlák M., Kotora M.: Tetrahedron lett. 48, 4539 (2007).
4. Nečas D., Turský M., Kotora M.: New. J. Chem. 30, 671 (2006).
5. Nečas D., Ramella D., Rudovská I., Kotora M.: J. Mol.

Catal. A: Chemical 274, 78 (2007).

6. Nečas D., Turský M., Kotora M.: J. Am. Chem. Soc. 126, 10222 (2004).
7. Turský M., Nečas D., Drabina P., Sedlák M., Kotora M.: Organometallics 25, 901 (2006).

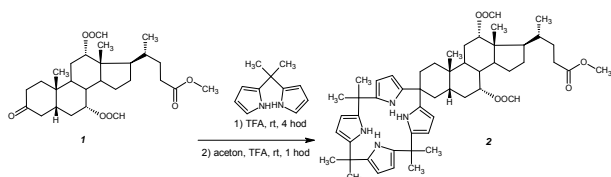
SYNTEZA KALIX[4]PYRROLU NA BÁZI CHOLOVÉ KYSELINY - DVA KONDENZAČNÍ KROKY V JEDNÉ BAŇCE

NGUYEN THI THU HUONG^a, DAGMAR ROČKOVÁ^a, a PAVEL DRAŠAR^b

^aKatedra chemie, PřF UJEP v Ústí nad Labem, České mládeže 8, 400 96 Ústí nad Labem; ^bVŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
nguyen@sci.ujep.cz, Pavel.Drasar@vscht.cz.

V posledních letech se steroidní struktury stávají stále důležitějšími v mnoha oborech jako je farmakologie, supramolekulární chemie a také nanotechnologie. Řazení steroidů mezi přírodní látky je věcí historickou, protože dnes už je přírodních steroidů izolovaných z přírody méně než steroidů připravených v laboratořích parciální či totální syntézou. Obměna struktury vede k látkám vhodnějších vlastností, popř. k látkám zcela nových účinků. U systémů tetrapyrrolového makrocyklu se spiroanelovaným steroidním substituentem lze očekávat nové a velmi cenné vlastnosti např. komplexotvorné a schopnost selektivní molekulární interakce, fluorescenční a schopnost v excitovaných tripletových stavech podílet se v elektronové výměně. Tyto molekuly mohou mj. sloužit jako selektivní molekulární receptor na organické i anorganické sloučeniny, dále by se daly využít např. v oblastech chemie molekulového rozpoznání, k výstavbě iontových kanálů pro přenos iontů a nebo ve fotodynamické terapii (PDT). Jako příklad lze uvést steroidní kalix[4]pyrroly, které vykazují schopnost enantioselektivní rozpoznání aprotických organických aniontů¹⁻⁶.

Práce předkládá syntézu nového steroidního spiroanelovaného kalix[4]pyrrolu na bázi cholové kyseliny a to kysele katalyzovanou kondenzací steroidního ketonu **1** s 5,5-dimethyldipyromethanem a následnou kondenzací vzniklého produktu s acetonem. Oba tyto kroky byly uskutečněny v jedné baňce. Kondenzační produkt **2** vzniká s celkovým výtěžkem 51%. Studium vlastností konečného produktu bude předmětem další práce. Cílem další práce bude mj. také studium stereochemie spiroanelovaných makrocyklů.



Práce na projektu byla financována grantem GA ČR 203/06/0006 a MŠMT 6046137305.

LITERATURA

1. Dukh M., Šaman D., Lang K., Pouzar V., Černý I., Drašar P., Král V.: Org. Biomol.Chem. 1, 3458 (2003).
2. Drašar P., Nguyen Thi T. H., Klímková P.: Czech Pat. Appl. PV 2007-868 (2007).
3. Drašar P., Nguyen Thi T. H., Klímková P.: Czech Pat. Appl. PV 2007-869 (2007).
4. Drašar P., Nguyen Thi T. H., Klímková P.: Czech Pat. Appl. PV 2008-367 (2008).
5. Nguyen Thi T. H., Klímková P., Drašar P.: Chem. Listy 101, 960 (2007).
6. Klímková P., Nguyen Thi T. H., Šauliová J., Drašar P.: Chem. Listy 100, 649 (2006).
7. Nguyen Thi T. H., Ročková D., Drašar P.: ChemZi. 1, 198 (2007).

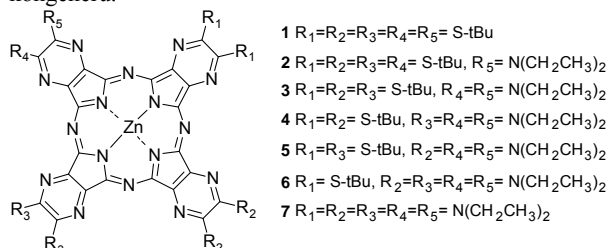
„PHOTO-INDUCED ELECTRON TRANSFER“ U DERIVÁTŮ AZAFTALOCYANINŮ

VERONIKA NOVÁKOVÁ, PETR ZIMČÍK, KAMIL KOPECKÝ a MIROSLAV MILETÍN

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze
veronika.novakova@faf.cuni.cz

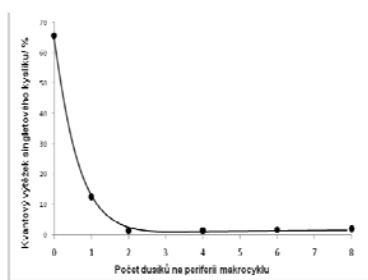
„Photo-induced Electron Transfer“ (PET) a jeho vliv na fluorescenci a produkci singletového kyslíku byl podrobně sledován u derivátů azaftalocyaninů. Jedná se o přenos elektronů vyvolaný excitací molekuly světlem, kdy se molekula tímto navrácí do svého základního stavu. Děj probíhá za předpokladu, že se v blízkosti sebe vyskytuje donor i akceptor elektronů. PET snižuje kvantové výtěžky singletového kyslíku i fluorescence, protože snižuje pravděpodobnost výskytu molekuly AzaPc v excitovaném stavu.

Byla připravena série zinečnatých AzaPc lišících se na periférii počtem donorových atomů, konkrétně terciárních dusíkových atomů. Tyto látky se připravují cyklizací příslušných prekurzorů metodou statistické kondenzace. Zjistili jsme, že optimální postup přípravy je cyklizace v prostředí butanolátu hořečnatého, následné odkovení pomocí slabé kyseliny, separace jednotlivých kongenerů chromatografickými metodami a zavedení zinku do centra molekul jednotlivých kongenerů.



Z naměřených kvantových výtěžků je patrné, že PET se výrazně uplatňuje už při jednom donorovém atomu na periférii makrocyklu a dva způsobí pokles téměř k nulovým hodnotám (Graf 1). Předpoklad, že excitované stavy jsou zhaseny

probíhající PETem, byl potvrzen na základě závislosti kvantových výtěžků na polaritě prostředí, blokací donorů pro PET a sterickým bráněním přenosu elektronu¹.



Graf 1

Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK 41107/B/2007.

LITERATURA

- Novakova V., Zimcik P., Kopecky K., Miletin M., Kuneš J., Lang K.: Eur. J. Org. Chem 19, 3260 (2008).

FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI KONJUGÁTŮ AMINOFENANTHROLINU SE STEROIDNÍMI KYSELINAMI

ZDENA NOVÁKOVÁ^a, DONATO MONTI^b a PAVEL DRAŠAR^a

^aVŠCHT Praha, Ústav chemie přírodních látek, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bDipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Univ. Roma "Tor Vergata", I-00133, Rome, Italy
Zdena.Novakova@vscht.cz

Cílem naší práce bylo připravit amidy žlučových kyselin s 5-amino-1,10-fenanthrolinem, vyzkoušet jejich možnou komplexaci s kovy a pomocí různých měření (UV, Fluorescence, CD) zjistit jejich fyzikální a také potenciální samoskladné vlastnosti. Také jsme testovali, zda jsou tyto sloučeniny schopné tvořit gel z různých rozpouštědel¹.

Syntézu popsanou v literatuře² jsme nahradili využitím činidla TOTU³, čímž jsme vylepšili výtěžky reakcí a také zjednodušili syntézu (Schéma 1).

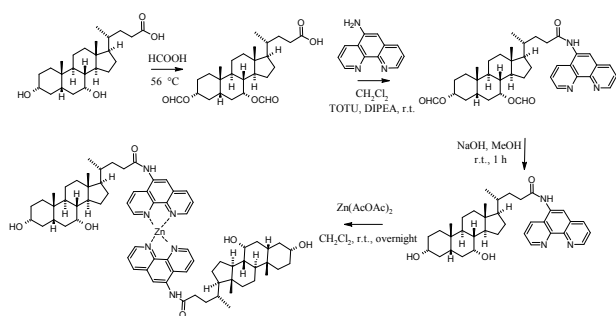


Schéma 1

Práce vznikla za finanční podpory MŠMT 6046137305, IP04OCD31.001, OC08043 (NPFM-II), 2B06024 NVP-II Suprafyt, GAČR 2003/06/0006 a NATO grant CBP.EAP.CLG.982972.

LITERATURA

- Virtanen E., Kolehmainen E.: Eur. J. Org. Chem. 16, 3385 (2004).
- Dukh M., Šaman D., Kroulík J., Černý I., Pouzar V., Král V., Drašar P.: Tetrahedron 59, 4069 (2003).
- Ghoussoub A., Lehn J. M.: Chem. Commun., 2005, 5763.

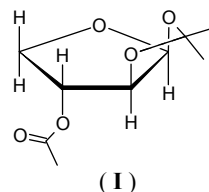
KOMBINOVANÁ VCD, IČ A NMR SPEKTRÁLNÍ A VÝPOČETNÍ STUDIE JEDNODUCHÝCH MONOSACHARIDŮ

IVAN RAICH^{*a}, VÍT NOVÁK^a, VLADIMÍR SETNIČKA^b, MARIE URBANOVÁ^c

^aÚstav chemie přírodních látek, ^bÚstav analytické chemie, ^cÚstav fyziky a měřicí techniky, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Ivan.Raich@vscht.cz.

Kromě běžně využívaných metod ve strukturní analýze jako IČ, NMR a hmotnostní spektroskopie se však rozvíjejí i mnohé další metody jako například vibrační cirkulární dichroismus, kombinující chiroptické a spektroskopické metody. Interpretace spekter všech těchto experimentálních metod se v současnosti běžně provádí v kombinaci s výpočetními postupy, především na *ab initio* nebo DFT úrovni.

Pro připravenou 3-*O*-acetyl-1,2-*O*-isopropyliden-β-D-threofuranosu (**I**) byla změřena IČ, NMR a VCD spektra v chloroformu a zároveň byl proveden jejich teoretický výpočet v programu Gaussian 03W. Výpočtu spekter předcházela detailní geometrická optimalizace, která byla provedena hybridní DFT metodou na úrovni B3LYP/6-31G(d,p) v chloroformu s použitím solvatačního modelu CPCM. Zastoupení výsledných konformerů bylo vypočítáno na základě Boltzmannových populací. Výpočty IČ a VCD spektra byly prováděny na úrovni B3LYP/6-31G(d,p). Výpočet chemických posunů ¹H NMR spektra byl prováděn na úrovni MP2/6-31G(d,p). Všechna vypočtená spektra byla detailně porovnána s experimentálními. ¹H NMR chemické posuny měly podle očekávání poměrně dobrou shodu s experimentálními. Vypočtená IČ spektra se po škálování také shodovala dobře, po škálování vlastní škálovací funkcí se shoda ještě zlepšila. Stejně škálování bylo použito i pro vypočtené frekvence ve VCD spektru a i zde se vypočtené spektrum až na relativní intenzity některých signálů shodovalo s experimentálním velmi dobře.



Tato práce vznikla za podpory grantu GA AVČR číslo IAA400550702 a MŠMT 6046137305.

VLIV STRUKTURY NA AKCELERAČNÍ AKTIVITU U DERIVÁTŮ TRANSKARBAMU 12.

**MICHAL NOVOTNÝ, KATEŘINA VÁVROVÁ
a ALEXANDR HRABÁLEK**

UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra anorganické a organické chemie, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové
Michal.Novotny@faf.cuni.cz.

Transdermální podání léčiv je systémové podání léčiv přes kůži do krevního či lymfatického oběhu. Jen omezené množství léčiv je schopno projít přes kůži v dostatečném množství k dosažení terapeutické koncentrace. Příčinou je omezeně propustná kožní bariéra, nacházející se v nejsvrchnější vrstvě kůže – ve stratum corneum. Jedna z možností překonání této kožní bariéry je použití akceleračních transdermálních penetračních činidel.

Výchozí modelovou strukturou pro chemické obměny byl transkarbam (T12). Byla studována akcelerační aktivita dvou sérií látek – hydrochloridů^{1,2} a karbamátů, přičemž celková délka řetězce – 20 uhlíků – zůstala zachována, jen se měnila poloha esterové vazby uprostřed molekuly. Tyto dvě série látek mají stejnou kationickou část, liší se pouze strukturou částí anionické. U hydrochloridů je to chloridový anion, u karbamátů je to organický anion odvozený od kyseliny karbámové. Předpokládá se, že právě tento karbamátový anion je z velké části zodpovědný za výjimečnou akcelerační aktivitu těchto látek. Přímé porovnání aktivit hydrochloridů a odpovídajících karbamátů by mělo pomoci tuto myšlenku potvrdit či vyvrátit. Celkem bylo připraveno 11 látek.

U připravených sloučenin jsme studovali jejich schopnost urychlit vstup modelového léčiva theofylinu přes prasečí kůži plně tloušťky. Pokusy byly prováděny in vitro pomocí Franzovy difúzní cely. Jako vehikulum jsme zvolili 60% propylenglykol.

Výsledky permeačních pokusů potvrzují hypotézu, že karbamátový anion je pro akcelerační účinek důležitý. V hodnocení schopnosti urychlit permeaci modelového léčiva theofylinu přes kůži byly karbamáty výrazně účinnější. Hydrochloridy ω -aminokyselin vykazovaly také určitou schopnost urychlit vstup látky přes kůži avšak pozorovaná aktivita hydrochloridů zřejmě souvisí s jejich povrchově-aktivními vlastnostmi, které mohou vyvolat i efekt zvýšeného průchodu léčiv přes zdravou kůži.

Práce vznikla s podporou grantu GAUK 79607/2007/B-CH/FaF a grantu ministerstva školství MSM 0021620822.

LITERATURA

1. Doležal P., Hrabálek A., Semecký V.: Pharm Res. 10, 1015 (1993)

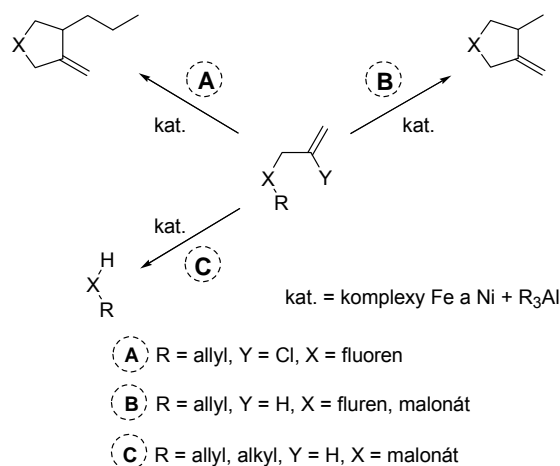
2. Hrabálek A., Doležal P., Roman M., Macháček M., Šklubalová Z.: Pharmazie 49, 325 (1994).

OD ŽELEZA K NIKLU – CESTA PLNÁ PŘEKVAPENÍ

DAVID NEČAS^a a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2; ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
david.necas@seznam.cz; kotora@natur.cuni.cz

Tvorba a štěpení C-C vazeb katalyzované pomocí komplexů přechodných kovů je v současné době bezesporu jednou z nejzajímavějších a nejintenzivněji zkoumaných oblastí výzkumu spjatého s organickou syntézou¹. Během několika předchozích let jsme publikovali několik katalytických systémů umožňujících právě tvorbu, či naopak, štěpení C-C vazeb. Tyto systémy jsou založené na komplexech levných přechodných kovů, Fe či Ni, v kombinaci s organohlutnými sloučeninami (Et₃Al, Et₂AlCl) a vhodné pro alkylovací cykлизaci α,ω -halodienů,^{2,3} cykлизaci α,ω -dienů^{4,5} či štěpení neaktivované C-C vazby u allyl malonátů^{3,6,7}.



Tato práce byla podpořena projektem MŠMT č. LC 06070 Struktura a syntetické aplikace komplexů přechodných kovů.

LITERATURA

1. Activation of Unreactive Bonds and Organic Synthesis, Top. Organomet. Chem. 3, 1 (1999).
2. Nečas D., Kotora M., Čiřáková I.: Eur. J. Org. Chem. 2004, 1280.
3. Nečas D., Drabina P., Sedlák M., Kotora M.: Tetrahedron lett. 48, 4539 (2007).
4. Nečas D., Turský M., Kotora M.: New. J. Chem. 30, 671 (2006).
5. Nečas D., Ramella D., Rudovská I., Kotora M.: J. Mol. Catal. A: Chemical 274, 78 (2007).
6. Nečas D., Turský M., Kotora M.: J. Am. Chem. Soc. 126, 10222 (2004).

7. Turský M., Nečas D., Drabina P., Sedlák M., Kotora M.: *Organometallics* 25, 901 (2006).

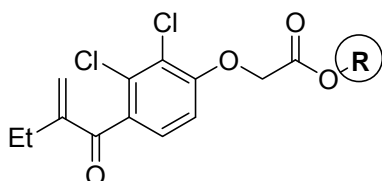
SYNTEZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK NA BÁZI KYSELINY ETAKRYNOVÉ

**STANISLAV OPEKAR^a, MARTINA SPIŠÁKOVÁ^b,
PRAKASH SHANKARAN^b, ZORA MĚLKOVÁ^b
a MARTIN KOTORA^{a,c}**

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Havova 8, 128 43 Praha 2; ^b Ústav imunologie a mikrobiologie 1.LF a VFN UK, Studničkova 7, 128 00 Praha 2, ^cÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6
stanislav.opekar@post.cz, zmelk@lfl.cuni.cz, kotora@natur.cuni.cz

Kyselina etakrynová je zejména známá jako diuretikum a látka na snížení krevního tlaku. Nicméně v poslední době bylo též zjištěno, že samotná či její deriváty jsou též účinnými inhibitory glutathion S-transferázy P1-1,¹ což je enzym odpovědný za konjugaci glutathionu s celou řadou sloučenin včetně chemoterapeutik a tím dochází k jejich deaktivaci. Tato nově objevená vlastnost kyseliny etakrynové z ní a jejích derivátů činí zajímavý objekt pro další studium.

V našem případě je cílem příprava různých derivátů kyseliny etakrynové a pozornost byla zaměřena hlavně na různě substituovaný postranní řetězec **R** (fluorované deriváty, násobné vazby, metaloceny, atd.). Některé takto získané sloučeniny pak sloužily jako výchozí látky pro přípravu derivátů s rozvětvenějším postranním řetězcem hlavně za pomoci metathetických reakcí. Získané deriváty byly testovány na protivirové účinky proti viru vakcinie a na cytotoxicitu.



Tato práce vznikla za podpory grantů VZ MSM0021620806, MSM0021620857 a GACR 310/05/H53.

LITERATURA

1. Aronson J K.: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 64, 563 (2007).

NOVÉ BIOLOGICKY AKTIVNÍ 1-FENYL-3,3-DIMETHYLGUANIDINY SUBSTITUOVANÉ NA BENZENOVÉM JÁDŘE.

**KAREL PALÁT^a, EVGHENIA EMELIN^a,
VLADIMÍR BUCHTA^a a JARMILA KAUSTOVÁ^b**

^aFarmF Univerzity Karlovy, Katedra anorganické a organické chemie, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové;

^bZdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Partyzánské nám. 7, CZ-702 00 Ostrava
palat@faf.cuni.cz

V návaznosti na dříve syntetizované sloučeniny¹ byla několikastupňovou syntézou vycházející ze 4-substituovaného nitrobenzenu^{1,2} připravena série titulních látek (viz Schéma 1).

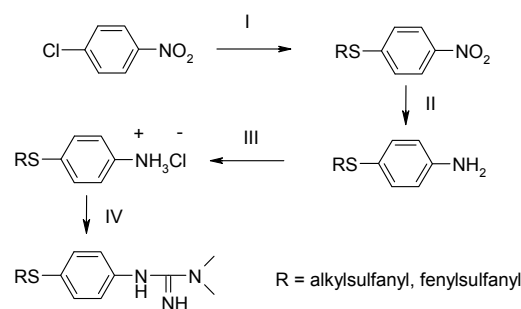


Schéma 1. I – thiol, akt. měď, uhlíčan draselný, DMF¹; II – chlorid cinnatý²; III – chlorovodík; IV – 1. N,N-dimethylguanamid¹

U připravených látek byly studovány závislosti mezi strukturou a biologickou aktivitou. Byly provedeny testy na antifungální a antimykobakteriální aktivitu.

Sloučeniny s alkylsulfanylsubstitucí s délkou řetězce C7-C16 vykazují dobrou biologickou aktivitu. Minimální inhibiční koncentrace dosahuje u neúčinnějších sloučenin hodnot 1,95-7,81 μmol/l v antifungálních testech a 4-8 μmol/l v testech antimykobakteriálních. Aktivita sloučenin je přibližně stejná u všech kmenů plísní a rovněž se téměř neliší u různých testovaných kmenů mykobakteria.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 0021620822 a grantem GAUK 299/2006/B-CH/FaF.

LITERATURA

1. Braunerová G.; Buchta V.; Silva L.; Kuneš J.; Palát K.: *Farmaco* 59, 443 (2004).
2. Bellamy F. D., Ou K.: *Tetrahedron Lett.* 25, 839 (1984).

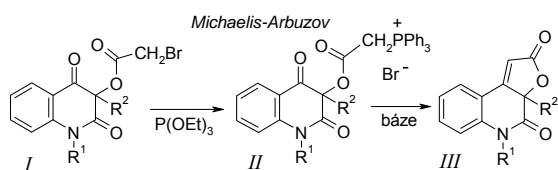
PERKOWOVA REAKCE – NEŽÁDOUCÍ KOMPLIKACE V ANELACÍCH NA CHINOLIN-2,4-DIONECH

**KAREL POMEISL^a, JAROSLAV KVÍČALA^b
a OLDŘICH PALETA^b**

^aÚOCHB AVČR, Flemingovo 2, 16610 Praha 6; e-mail:
^bÚstav organické chemie, VŠCHT, Technická 5, 16628 Praha 6
jaroslav.kvicala@vscht.cz, pomeisl@uochb.cas.cz,
oldrich.paleta@vscht.cz

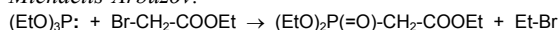
V odborné literatuře je velký počet příkladů olefinace Wittigova-Hornerova typu. Řada aplikací se týká syntéz

nových heterocyklů anelační metodou. K nim patří anelační syntézy potenciálních nesteroidních protizánětlivých látek *III* vycházející ze substituovaných chinolin-2,4-dionů (*I*).

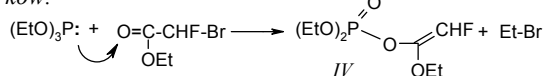


Anelace může být zkomplikována nebo zcela zabráněna tím, že meziprodukt *II* reakcí *Michaelise-Arbuzova* nevznikne, je-li použit jako výchozí *I* ester silnější kyseliny. Důvodem je tzv. *Perkowova reakce*¹, v níž trialkyl-fosfit atakuje kyslík karbonylové skupiny podle schématu:

Michaelis-Arbuzov:

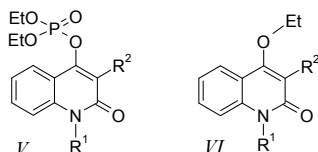


Perkow:



Perkowovou substituční reakcí, kdy odstupuje atom halogenu, vznikne enol-fosfát typu *IV*, který již nepodléhá Wittigově-Hornerově olefinační syntéze.

Podrobnějším studiem reakcí esterů typu *I* s $\text{P}(\text{OEt})_3$ jsme objevili², že odstupující skupinou v Perkowově reakci může být halogenacylová skupina. Protože v chinolidionech *I* je několik karbonylových skupin včetně esterové, vzniká zpravidla směs produktů *V* a *VI*:



V přednášce je diskutován pravděpodobný mechanismus vzniku nečekaných látek *V* a *VI*.

Za podporu výzkumu děkujeme VŠCHT Praha a Ministerstvu školství ČR (Výzkumný záměr č. 6046137301). Svým kolegům A. Kláskovi a S. Kafkovi děkujeme za poskytnutí vzorků výchozích chinolin-2,4-dionů a V. Kubelkovi, J. Havličkovi a J. Čejkovi za provedení strukturálních analýz.

LITERATURA

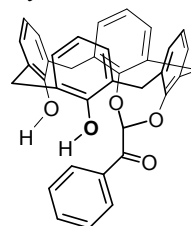
1. Perkow W.: Chem. Ber. 87, 755 (1954).
2. Pomeisl K., Kvičala J., Paleta O., Klásek A., Kafka S., Kubelka V, Havliček J., Čejka J.: Tetrahedron 63, 10549 (2007).

SYNETICKÁ STUDIE NEOBÝVKLE PŘEMOSTĚNÝCH DERIVÁTŮ CALIX[4]ARENU

ROMANA PÁLKOVÁ^a, MARKÉTA BUDKOVÁ^a,
JAN BUDKA^a, MICHAELA RÖBSTECKOVÁ^b,
IVAN STIBOR^a a PAVEL LHOTÁK^a

^aÚstav organické chemie, ^bÚstav chemie pevných látek,
VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
palkovar@vscht.cz

Prvotním záměrem projektu bylo alkylování calix[4]arenu pomocí jodacetofenonu připravit derivát v 1,3-alternující konformaci, který měl být využit pro intramolekulární McMurryho reakci. Reakce vedla k překvapivému produktu – calix[4]arenu přemostěnému velmi krátkou jednouhlíkatou spojkou (obr.1). Syntéza byla optimalizována a navržen mechanismus vzniku neobvyklého produktu. Získané poznatky byly využity při alkylování dalších derivátů calix[4]arenu a rovněž vedly k zajímavým výsledkům, které budou v prezentaci diskutovány.



Tento projekt je podporován Grantovou agenturou ČR (grant č. 104/07/1242) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (Výzkumné centrum LC06070).

PŘÍPRAVA POTENCIÁLNÍCH ORGANOKATALYZÁTORŮ NA BÁZI 2-PROLINYL-4,5-DIHYDRO-1H-IMIDAZOL-5-ONU

ILLIA PANOV, PAVEL DRABINA a MILOŠ SEDLÁK

Ústav organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice
Ilja.Panov@upce.cz

Deriváty prolinu tvoří významnou skupinu enantioselektivních organokatalyzátorů, které nacházejí uplatnění v rozličných asymetrických syntézách¹. Cílem této práce bylo připravit prolinové deriváty obsahující 4,5-dihydro-1H-imidazol-5-onový skelet²⁻⁴. Tyto sloučeniny představují nový typ prolinových derivátů, u kterých lze předpokládat značnou enantiokatalytickou aktivitu.

Při syntéze se vycházelo z L-Boc-prolinu, který byl po aktivaci ethylchloroformiátem podroben reakci s chirálními i achirálními 2-aminoalkanamidy. Získané prolin-amidy *I* byly následně podrobeny bázičky katalyzované cyklizaci na 4,5-dihydro-1H-imidazol-5-onové deriváty *II*. Za uvedených podmínek (Schéma) dochází k racemizaci v prolinové části molekuly, proto jsme se v dalším výzkumu zaměřili na optimalizaci cyklizační reakce tak, aby nedocházelo k racemizaci.

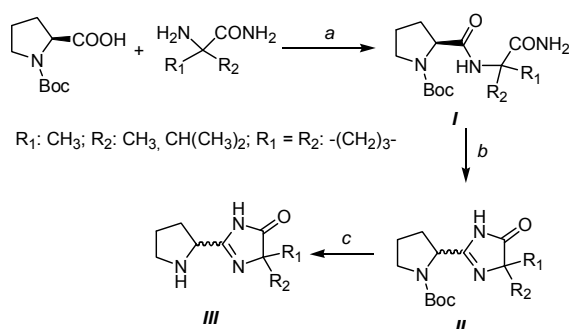


Schéma 1. Činidla a reakční podmínky: *a* – EtOCOCI/TEA/CH₂Cl₂; *b* – CH₃ONa/CH₃OH; *c* – CF₃COOH/CHCl₃

Práce byla podpořena projektem MŠMT ČR, MSM 0021627501 a grantem GA ČR 203/08/P010.

LITERATURA

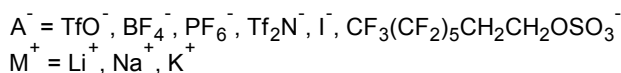
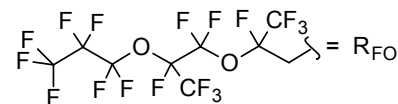
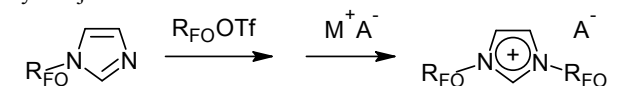
1. Kotsuki H., Ikishima H., Okuyama A.: *Heterocycles* 75, 493 (2008).
2. Sedlák M., Drabina P., Císařová I., Růžička A., Hanusek J., Macháček M.: *Tetrahedron Lett.* 45, 7723 (2004).
3. Sedlák M., Drabina P., Keder R., Hanusek J., Císařová I., Růžička A.: *J. Organomet. Chem.* 691, 2623 (2006).
4. Drabina P., Sedlák M., Růžička A., Malkov A. V., Kočovský P.: *Tetrahedron: Asymmetry* 19, 384 (2008).

FLUOROVÉ IONTOVÉ KAPALINY NA BÁZI PERFLUOROVANÝCH POLYETHERŮ

JANA PATEROVÁ, ONDŘEJ KYSILKA, MARTIN SKALICKÝ, MARKÉTA RYBÁČKOVÁ a JAROSLAV KVÍČALA

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; paterovj@vscht.cz; kvicalaj@vscht.cz

Iontové kapaliny na bázi imidazoliových solí jsou perspektivními rozpouštědly díky jejich vysoké účinnosti, recyklovatelnosti a nízkému zatížení životního prostředí. Imidazoliové soli s jedním polyfluoralkylovým řetězcem vykazují nízkou fluorofilitu¹.



Bis(polyfluoralkylované) imidazoliové soli vzhledem k vysoké teplotě tání nemohou být využity jako iontové

kapaliny². Naším cílem byla příprava iontových kapalin s vysokou fluorofilitou, které by usnadnily separaci produktů nebo provedení reakcí ve fluorovém prostředí.

Základem těchto nových typů imidazoliových solí jsou stavební bloky na bázi trimeru HFPO. Ke kvarternizaci imidazolového kruhu dochází reakcí s triflátem příslušného alkoholu obsahujícího polyfluorpolyetherový řetězec. Následnou metatezí aniontů jsme získali nové iontové kapaliny, které jsou vysoce fluorofilní a za laboratorní teploty prakticky nemísitelné s většinou organických rozpouštědel a vysoce rozpustné v perfluorovaných alkanech.

Vedle iontových kapalin s běžnými anionty, jako jsou hexafluorofosfátový nebo tetrafluorboritanový anion³, jsme syntetizovali nový typ iontové kapaliny s fluorovým kationtem i aniontem. Klíčový [2-(perfluoralkyl)ethyl]sulfátový anion jsme připravili Grignardovou reakcí perfluoralkylmagnesiumhalidů s 1,3,2-dioxathiolan-2,2-dioxidem.

Děkujeme Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (výzkumné centrum LC06070, výzkumný záměr č. 6046137301) a Grantové agentuře České republiky (projekt č. 203/06/1511) za finanční podporu tohoto projektu.

LITERATURA

1. Merrigan T. L., Bates E. D., Dorman S. C., Davis, J. H., Jr.: *Chem. Commun.* 2000, 2051.
2. Xu L.; Chen W.; Bickley J. F.; Steiner A.; Xiao J.: *J. Organomet. Chem.* 598, 409 (2000).
3. Kysilka O.: Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2008.

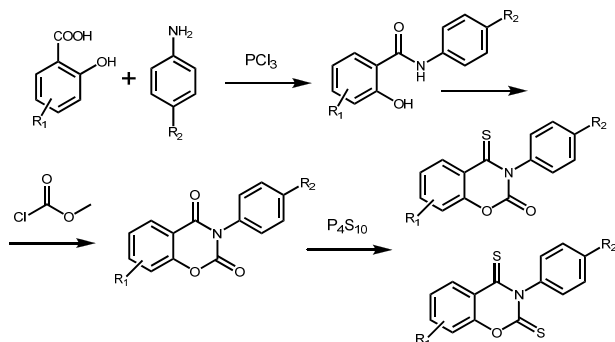
NOVÁ POTENCIÁLNÍ ANTITUBERKULOTIKA S THIOXO SKUPINOU

EVA PETRÍKOVÁ, KAREL WAISSER, HANA DIVÍŠOVÁ, PETRA HUSÁKOVÁ a JARMILA KAUSTOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra anorganické a organické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; Eva.Petrikova@faf.cuni.cz

Byla syntetizována nová skupina halogenovaných ($R_1 =$ halogen) *N*-(4-alkylfenyl)salicylamidů, 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů, 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů.

U těchto sloučenin byla testována *in vitro* antimykobakteriální aktivita proti kmenům *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. avium* CNCTC My 330/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80 a klinicky izolovaného kmenu *M. kansasii* My 6509/96. Tato práce navazuje na dřívější publikaci³. Bylo zjištěno, že po zavedení síry došlo k významnému zvýšení účinku. Při zavedení alkyly ethyl a *sek*-butyl se dosáhlo mimořádné účinnosti látek. Aktivita těchto 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů vůči *M. tuberculosis* převyšuje soudobá používaná léčiva.



Projekt je částí výzkumného projektu Ministerstva školství a mládeže ČR, No. MSM0021620822.

LITERATURA

1. Macielag M. J. a kol.: J. Med.Chem. 41, 2939 (1998).
2. Waisser K., Matyk J., Divišová H., Husáková P., Kuneš J., Klimešová V., Kaustová J.: Arch. Pharm. Life Sci., 340, 264 (2007).
3. Waisser K., Matyk J., Kuneš J., Doležal R., Kaustová J., Dahse H. M.: Arch. Pharm. Life Sci, v tisku.

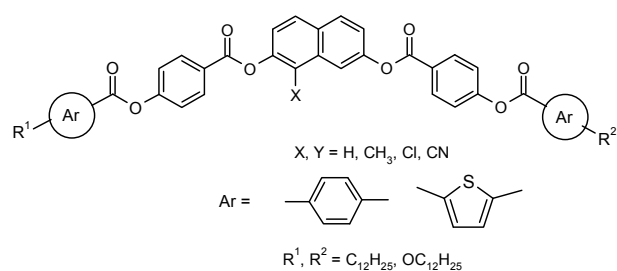
LOMENÉ KAPALNÉ KRÝSTALY S THIOFENOVÝM JÁDREM V PRODLUŽUJÍCÍM RAMENI

PETR POLÁŠEK^a, MICHAL KOHOUT^a, ANNA KOVÁŘOVÁ^a, VÁCLAV KOZMÍK^a, JIRÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b a MILADA GLOGAROVÁ^b

^aÚstav organické chemie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bFyzikální ústav, Akademie věd ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8

Nedávno objevená nová skupina termotropních kapalných krystalů s lomenou molekulární strukturou je předmětem intenzivního studia. Doposud bylo identifikováno 8 typů tzv. B-fází, některé z nich vykazují antiferro- či ferroelektrické fáze potenciálně využitelné v zobrazovací technice.

Většina doposud zkoumaných materiálů má symetrickou molekulární strukturu, kde jsou k centrálnímu jádru připojeny dvě totožná prodlužující ramena. Pro design takovýchto kapalných krystalů jsme již dříve úspěšně využili jako centrální jádro 1-substituovaný naftalen-2,7-diol¹⁻³.



I

V přednášce budou prezentovány výsledky syntézy a studia nové série nesymetrických lomených kapalných krystalů obecného vzorce **I** obsahující v prodlužujících ramenech thiofenovou jednotku.

Projekt výzkumu byl podporován MŠMT (projekt COST OC176 a výzkumným záměrem MSM 6046137301) a Grantovou agenturou České republiky grantem IAA100100710.

LITERATURA

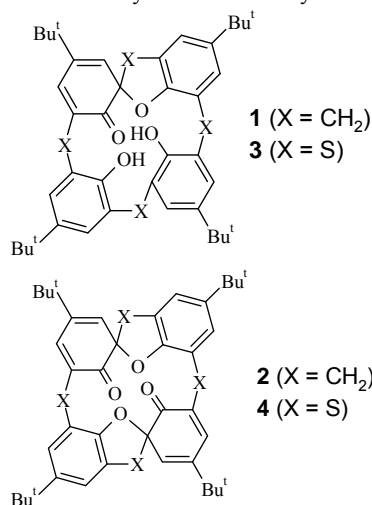
1. Svoboda J., Novotná V., Kozmík V., Glogarová M., Weissflog W., Diele S., Pelzl G.: J. Mater. Chem. 13, 2104 (2003).
2. Kozmík V., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Baumeister U., Diele S.: Liq. Cryst. 32, 1151 (2005).
3. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: Liq. Cryst. 33, 41 (2006).
4. Svoboda J., Novotná V., Žurek J., Kozmík V., Glogarová M.: 21st International Liquid Crystal Conference, Keystone, July 2-7, 2006, USA.

SPIRODIENONE DERIVATIVES OF THIACALIX[4]ARENES

K. POLIVKOVA, M. SIMANOVA a P. LHOTAK

Dept. of organic chemistry, ICT Prague, Technická 5, Prague 6

Mono (**1**) and bis(spirodienone) *p*-*tert*-butylcalix[4]arenes (**2**) have been used to obtain derivatives of calix[4]arenes with selectively modified lower or upper rim [1,2]. Many of these derivatives cannot be synthesized directly.



The presence of carbonyl group and the disorganisation of one or two aromatic systems enable carrying out reaction such as nucleophilic addition or ipso substitution. We have implemented these reactions on spiro derivatives of thiacalix[4]arenes (**3,4**), which have a bit different properties

than classical derivatives. Due to steric hindrance, addition of organometallic compounds has been achieved only with alkyl groups smaller than butyl. Surprisingly lithium and magnesium salts lead to diverse isomeric forms of the product. Subsequent rearomatisation of such products conduces to *p*-*tert*-butylthiacalix[4]arenes in which one or two OH groups are replaced with alkyl groups. Application of conditions, which should lead to replacement of *tert*-butyl group with chlorine, yielded an unexpected product.

Financial support was provided by grant agency MSMT: D31 OC134.

REFERENCES

1. Van Gelder J. M., Brenn J., Thondorf I., Biali S. E.: *J. Org. Chem.* 62, 3511 (1997).
2. Litwak A. M., Grynszpan F., Aleksiuik O., Cohen S., Biali S. E.: *J. Org. Chem.* 58, 393 (1993).
3. Wöhnert J., Brenn J., Stoldt M., Aleksiuik O., Grynszpan F., Thondorf I., Biali S. E.: *J. Org. Chem.* 63, 3866 (1998).

PRŮKAZ ISOFLAVONOIDŮ V ČELEDI ANNONACEAE

**ELENA A. PROKUDINA^a, PETRA LANKOVÁ^a,
LADISLAV KOKOŠKA^b a OLDŘICH LAPČÍK^a**

^a *Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6;* ^b *Institut tropů a subtropů, ČZU, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátka*

Čeď láhevnikovitě (Annonaceae) zahrnuje tropické a subtropické rostliny Jižní a Střední Ameriky, Asie a Afriky. Ekonomicky důležité jsou druhy rodů *Annona*, *Rollinia*, *Cannanga* a *Asimina*, které jsou pěstovány kvůli požitelným plodům. Láhevnikovitě obsahují sacharidy, tuky, proteiny a aminokyseliny, alkaloidy, terpeny, esenciální oleje a polyfenoly. Z polyfenolů jsou to zejména fenolické kyseliny, proanthokyanidiny, taniny a flavonoidy¹. Isoflavonoidy zatím v čeledi Annonaceae nebyly studovány.

Vodno-methanolvé extrakty listů a plodů rostlin rodů *Annona* a *Rolima* (*A. lutescens*, *A. muricata*, *A. cherimola*, *A. reticulata*, *R. mucosa*) byly analyzovány HPLC-MS-SIM a sérií ELISA metod specifických pro daidzein, genistein, biochanin A a jejich deriváty². Imunoreaktivitu signalizující přítomnost isoflavonů byly zaznamenány ve všech extraktech ze studovaných druhů čeledi Annonaceae. Chromatograficky byly na základě srovnání s retenčními časy molekulovými ionty standardů prokázány daidzein, genistein, formononetin a biochanin A v listech *Annona lutescens*. Přítomnost isoflavonoidů byla zaznamenána již dříve ve dvou ze šesti čeledí patřících k řádu Magnoliales (Myristicaceae a Magnoliaceae)^{3,4}, v čeledi Annonaceae se ale jedná o první průkaz této skupiny sekundárních metabolitů.

Poděkování: Práce vznikla za podpory projektů 525/06/0864 GAČR a MSM 6046137305.

LITERATURA

1. Leboeuf M., Cavé A., Bhaumik P.K., Mukherjee B., Mukherjee R.: *Phytochemistry*, 21, 2783 (1982).
2. Koblavská R., Lapčík O.: *Phytochem. Anal.* 19, 64 (2008).
3. Reynaud J., Guilet D., Terreux R., Lussignol M., Walchshofer N.: *Nat. Prod. Rep.*, 22, 504 (2005).
4. Macková Z., Koblavská R., Lapčík O.: *Phytochemistry* 67, 849 (2006).

ŘÍZENÁ FUNKCIONALIZACE A ATRP ROUBOVÁNÍ CELULOSY V HOMOGENNÍ FÁZI

**VLADIMÍR RAUS*, PETRA LÁTALOVÁ, JAROSLAV
KRÍŽ, JIRÍ DYBAL, MIROSLAV JANATA a PETR
VLČEK**

*Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského náměstí 2, 162 06 Praha 6
raus@imc.cas.cz*

Celulosa, jakožto nejrozšířenější přírodní polymer, je již dlouhou dobu předmětem jak vědeckého, tak průmyslového zájmu. V posledních letech se pozornost soustřeďuje na řízené metody jejího roubování syntetickými polymery vedoucí k materiálům s potenciálně zajímavými aplikačními vlastnostmi. Většina těchto postupů byla použita pro roubování v heterogenní fázi na površích celulosových částic či vláken¹, kde lze však s těžší zajištění rovnoměrné rozmístění roubov. V homogenní fázi byly až donedávna roubovány pouze deriváty celulosy (např. diacetát)².

V příspěvku je diskutována acylace celulosy 2-bromisobutyryl bromidem ve směsi *N,N*-dimethylacetamid/LiCl s důrazem na stechiometrické řízení stupně substituce a s ohledem na využití různých metod aktivace celulosy. Získané polyfunkční makroiniciátory s různou hustotou iniciačních center byly následně metodou radikálové polymerizace s přenosem atomu (ATRP) v DMSO řízené roubovány styrenem a methyl methakrylátem. Takto byly připraveny kopolymery s různou hustotou roubování a délkou roubov. Oba tyto důležité parametry bylo možno pomocí vhodně zvolených reakčních podmínek kontrolovaně měnit v širokém rozmezí.

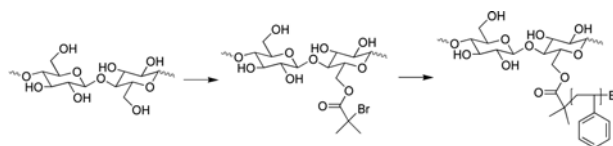


Schéma 1. Acylace celulosy a následné roubování vzniklého makroiniciátoru styrenem

Tato práce vznikla za podpory GA AV (AVOZ 4050913) a grantu GA ČR (IAA410820601).

LITERATURA

1. Lindqvist J., Malmström E.: *J. Appl. Polym. Sci.* 100, 4155 (2006).

2. Vlček P., Janata M., Látalová P., Kříž J., Čadová E., Toman L.: *Polymer* 47, 2587 (2006).

1-METOXYDERIVÁTY KAMALEXÍNU A BENZOKAMALEXÍNU

MÁRIA REPOVSKÁ^a, PETER KUTSCHY^a, MARTINA PILÁTOVÁ^b, JÁN MOJŽIŠ^b a ROMAN MEZENCEV^c

^aUniverzita P. J. Šafárika v Košiciach, PrF, Ústav chemických vied, Moyzesova 11, 040 01 Košice; ^bUniverzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta, Ústav farmakológie, Tr. SNP 1, 040 66 Košice; ^cGeorgia Institute of Technology, School of Biology, Cherry Emerson Building, 310 Ferst Drive, Atlanta, GA 30332-0230, USA
maria.repovska@upjs.sk

Kamalexín [3-(2'-tiazolyl)indol, **I**] bol izolovaný ako fytoalexín Laničníka siateho (*Camelina sativa*, Křížokveté)¹. V roku 1997 bola opísaná jeho cytotoxická aktivita proti ľudským rakovinovým bunkám prsníka SKBr3². Viaceré indolové fytoalexíny (napr. brasínin a 1-metoxybrasínin) boli izolované s nesubstituovaným indolovým dusíkom a tiež ako *N*-metoxyderiváty. 1-Metoxyderivát kamalexínu doteraz nebol opísaný a preto sme sa, s cieľom overiť biologické vlastnosti tejto substance, zamerali na štúdium možností jeho syntézy. Bola vypracovaná syntéza 1-metoxykamalexínu **II** a 1-metoxybenzokamalexínu **IV** z 1-metoxyindol-3-karbaldehydu³ ako základnej východiskovej látky (Schéma 1) a študovala sa ich protinádorová aktivita v porovnaní s nesubstituovanými zlúčeninami **I** a **III**.

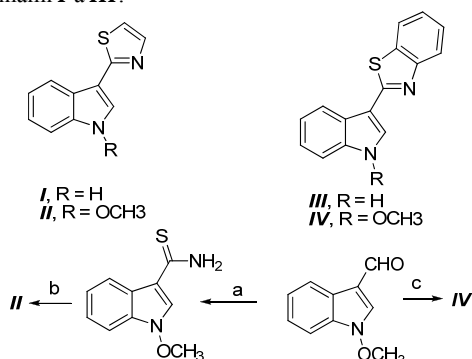


Schéma 1. a) i, NaClO₂; ii, PCl₃; iii, NH₃; iv, Lawessonovo činidlo; celková výťažnosť 60%. b) Brómactaldehyddietylacetál, 60%. c) 2-Aminotiofenol, BF₃·OEt₂, 42 %.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0514-06 a grantom VEGA č. 1/3365/06.

LITERATÚRA

- Browne L. M., Conn K. L., Ayer W. A., Tewari J. P.: *Tetrahedron* 47, 3909 (1991).
- Moody Ch. J., Roffey J. R. A., Stephens M. A., Stratford I. J.: *Anti-Cancer Drugs* 8, 489 (1997).
- Somei M.: *Heterocycles* 50, 1157 (1999).

REGIOSELEKTIVNÍ VINYLACE 5-SUBSTITUOVANÝCH TETRAZOLŮ

JAROSLAV ROH a ALEXANDR HRABÁLEK

*Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta UK v HK, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové
Jaroslav.Roh@faf.cuni.cz*

Chemie tetrazolů zaznamenává v posledních desetiletích nebývalý rozmach. Toto uskupení nachází uplatnění ve farmaceutické chemii, v koordinační chemii jako ligand, ve speciálních výbušninách a konečně i jako předstupeň syntézy dalších heterocyklů.

2-vinyl-5-aryltetrazoly představují významný meziprodukt při syntéze 3-arylpyrazolů. Rozkladem 2-vinyl-5-aryltetrazolů (**I**) vznikají *N*-vinylarylnitriliminy (**II**), které cyklizují přes nearomatické 3-aryl-4H-pyrazoly (**III**) na 3-arylpyrazoly (**IV**) (schéma 1)¹.

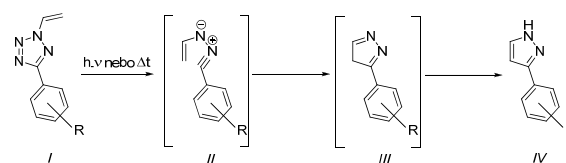


Schéma 1.

Existuje niekoľko rôznych postupů prípravy 2-vinyl-5-aryltetrazolů, každá z nich však má značné nevýhody. Konkrétne se jedná o přímé vinylace vinylacetátem či eliminace připravených hydroxyethyl či chlorethylderivátů 5-subst.tetrazolů^{1,2}. Avšak během těchto příprav se nevyhne vznik 1 i 2 polohového izomeru v různých poměrech, jejich složitěmu dělení, nehledě na nižší výtěžky.

Naši pracovní skupině se podařilo vyvinout jedнокrokovou regioselektivní syntézu 2-vinyl-5-aryltetrazolů a odhalit její mechanismus. Syntéza spočívá v reakci příslušného tetrazolu s nadbytkem 1,2-dibromethanu za přítomnosti triethylaminu (schéma 2). Reakce není ovlivněna, z hlediska regioselektivity a kvantity výtěžku, charakterem použitého organického rozpouštědla. Při této reakci překvapivě nevzniká 1-vinyl-5-aryltetrazol a substituce obou atomů bromu za vzniku tetrazolového „dimeru“ probíhá jen ve velmi malém procentu.

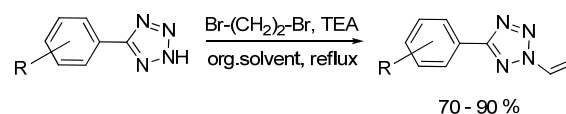


Schéma 2.

Práce vznikla za podpory VZ Ministerstva školství ČR (MSM 0021620822)

LITERATURA

- Moody C. J., Rees C. W., Young R. G.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1991, 329

2. Afonin, A., Vereshchagin V. L. I., Buzilova S. R., Bogens A. K., Brekhov Yu. V., Zasyadko O. A.: Chem. Heterocycl. Compd. 25, 1385 (1989).

C, Y-CHELATOVANÉ SLOUČENINY CÍNU

Abstrakt přednášky k souboru prací oceněnému cenou Alfreda Badera za organickou chemii pro rok 2009.

ALEŠ RŮŽIČKA

Katedra obecné a anorganické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. legií 565, Pardubice 532 10
ales.ruzicka@upce.cz

V minulých letech byla pozornost naší pracovní skupiny zaměřena převážně na studium přípravy, struktury, vlastností a reaktivity organokovových a komplexních sloučenin cínu, ale částečně i olova obsahující C, Y - chelátující ligand(y). Pod pojmem C,Y-chelátové komplexy rozumíme organokovové sloučeniny, jejichž organický substituent tvořící kovalentní vazbu mezi atomem uhlíku a centrálním atomem kovu (C – M) obsahuje navíc ve vhodné poloze donorový heteroatom Y schopný vytvářet s dosud koordinačně nenasyceným centrálním atomem kovu dodatečně intramolekulární donor-akceptorové spojení (Schéma 1). Nejde tedy o chelátové komplexy v klasickém slova smyslu, ale o sloučeniny jim formálně analogické, tedy chelátové komplexy výrazně připomínající. Důsledkem takového intramolekulárního donor-akceptorového spojení je vznik hetero-metallacyklů, které vedle atomů uhlíku a kovu (M) obsahují ještě heteroatom (Y). Podle polohy heteroatomu vůči atomu uhlíku bezprostředně vázanému k atomu kovu mohou mít metallacykly různý počet členů. V dnešní době je známo veliké množství sloučenin tohoto typu. Centrálními atomy bývají kovy přechodné i kovy hlavních skupin, dokonce i metalloidy jako křemík, bór nebo fosfor. Nejčastějšími donorovými atomy jsou atomy dusíku a kyslíku, výjimečně i atomy síry a fosforu. Co se týče velikosti cyklů – jako nejstabilnější se podle dosavadních zkušeností jeví cykly pětičlené a snad i šestičlené. Při větší vzdálenosti atomu uhlíku vytvářejícího vazbu uhlík – kov a donorového heteroatomu dostává přednost intermolekulární koordinace. Bezprostředním důsledkem vzniku donor-akceptorové vazby kov–heteroatom je růst koordinačního čísla, a tedy nápadná změna struktury koordinačního okolí centrálního atomu kovu, která se ve větší či menší míře projeví ve struktuře celé molekuly či krystalu. Jen zcela výjimečně zůstává koordinační číslo zachováno, a to tehdy, když současně se vznikem vazby M-Y odstupuje jiný substituent původně vázaný k centrálnímu atomu kovu. Je zřejmé, že i v těchto případech se jedná o výrazné změny ve struktuře částic sloučenin.

Organický substituent s jedním nebo dvěma funkčními donorovými atomy bývá v literatuře označován jako „monoanionidní bi- či terdentátní ligand“. Bylo prokázáno, že využitím vlastností C, Y-chelátujícího ligandu (Y=substituent obsahující heteroatom) mohou být připraveny organokovové sloučeniny se zajímavými vlastnostmi i reaktivitou.

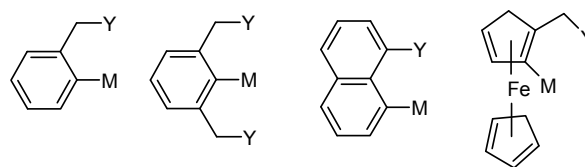


Schéma 1: Organokovové sloučeniny obsahující C, Y - chelátující ligandy; Y = substituent obsahující donorovou skupinu, M = Ag, Au, Co, Cu, Fe, Hg, In, Ir, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Sn, Ta, W, ...

Během posledních cca dvanácti let bylo připraveno a charakterizováno cca 200 originálních sloučenin, nejen organocínitých, ale i organocínatých, organoolovnatých a dalších kovů nepřechodných i přechodných, a byla studována jejich reaktivita. Význam těchto sloučenin lze chápat především v následujících oblastech:

- modelové sloučeniny ke studiu dalších hypervalentních či hyperkoordinovaných sloučenin¹,
- modelové sloučeniny ke studiu organocínitých analogů karbokationtů,
- modelové sloučeniny ke studiu těžších analogů karbenů s nižší bazicitou centrálního atomu a jejich komplexů s přechodnými kovy,
- studium těžších analogů karbradikálů,
- studium vlastností různých typů klastrů.

Za potenciální aplikace lze považovat:

- stechiometrickou i katalytickou reaktivitu sloučenin typu LR_xSnF_y (kde L je chelátující ligand) při fluoracích organických, organokovových, komplexních sloučenin a chlorosilanů, a využití polymerních sloučenin jako aktivních substancí iontové (F⁻) selektivních elektrod^{2,3},
- katalytickou aktivitu sloučenin typu $(L^nBu_2Sn)_2O$ a $(LPhSnCl)_2O$ v reesterifikačních reakcích nejen primárních, ale i sekundárních alkoholů a fenolů^{4,5},
- katalytickou aktivitu sloučenin typu $(L^nBu_2Sn)_2CO_3$ a $(L_2Sn)_2O_2$ při přípravě karbonátů a polykarbonátů,
- bio-aktivita sloučenin typu LR_2SnY jako kancerostatik nebo antimykotik.

Tato práce vznikla za podpory GA ČR (grant č. 203/07/0468), GA AV ČR (KJB401550802) a MŠMT ČR (VZ 0021627501)

LITERATURA

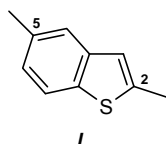
- Růžička A., Pejchal V., Holeček J., Lyčka A., Jacob K.: Collect. Czech. Chem. Commun., 63, 977 (1998).
- Růžička A. in: Fluorine Chemistry Research Advances, Ed.: I. V. Gardiner – Chap. 6; pp. 281-312, Nova Science Publishers, NY, 2007.
- Švec P., Eisner A., Kolářová L., Weidlich T., Pejchal V., Růžička A.: Tetrahedron Lett., 49, 6320 (2008).
- Padělková Z., Weidlich T., Kolářová L., Eisner A., Císařová I., Zevaco T. A., Růžička A.: J. Organomet. Chem. 692, 5633 (2007).
- Padělková Z., Nechaev M. S., Černošek Z., Brus J., Růžička A.: Organometallics, v tisku: DOI: 10.1021/om800476r.

2,5-DISUBSTITUOVANÝ BENZOTHIOFEN JAKO NOVÉ JÁDRO KALAMATICKÝCH KAPALNÝCH KRYSTALŮ

LUCIE ŘEHOVÁ^a, MARTIN VESELÝ^a,
MICHAL KOHOUT^a, ANNA KOVÁŘOVÁ^a,
VÁCLAV KOZMÍK^a, JIŘÍ SVOBODA^{a*},
VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b a MILADA GLOGAROVÁ^b

^aÚstav organické chemie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bFyzikální ústav, Akademie věd ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8

Při navrhování nových kapalně krystalických látek je jedním z klíčových problémů volba vhodného centrálního jádra, které udává tvar molekuly a má i významný vliv na přechodové teploty a mesomorfní chování konečných materiálů. Vedle karbocyklických aromátů se jako jádra stále více uplatňují i heterocyklické sloučeniny, jako thiofen, a kondenzované heterocykly¹⁻³. Nedávno jsme ukázali⁴, že 2,6-substituovaný benzothiofen je vhodným modelem pro návrh nových kalamitických materiálů, přestože do molekulární struktury kapalného krystalu vnáší značné zalomení. V této práci budou představeny nové lomené materiály odvozené od 2,5-disubstituovaného benzothiofenu **I**.



Bude diskutována syntéza nových mesogenů a jejich mesomorfní chování ve srovnání s 2,6-disubstituovanými analogy. Mesomorfní vlastnosti byly zkoumány optickou polarizační mikroskopií, studiem textur a diferenciální skenovací kalorimetrií. Ukazuje se, že 2,5-substituovaný benzothiofen může být úspěšně využit k výstavbě jádra kapalně-krystalických látek, jejichž fyzikální vlastnosti a parametry vhodné pro aplikace jsou srovnatelné s klasickými materiály.

Projekt výzkumu byl podporován MŠMT (projekt COST OC176 a výzkumným záměrem MSM 6046137301) a Grantovou agenturou České republiky grantem IAA100100710.

LITERATURA

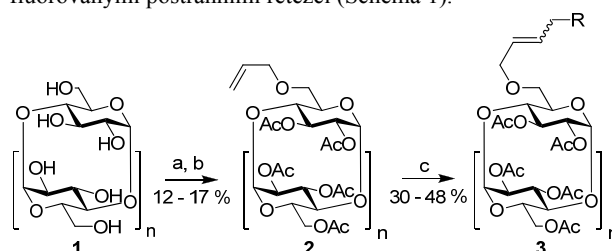
- Váchal P., Svoboda J., Glogarová M., Stibor I.: Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sect. A 328, 367 (1999).
- Košata B., Kozmík V., Svoboda J., Novotná V., Vaněk P., Glogarová M.: Liq. Cryst. 30, 603 (2003).
- Černovská K., Košata B., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M.: Liq. Cryst. 33, 987 (2006).
- Kurfürst M., Kozmík V., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M.: Liq. Cryst. 35, 21 (2008).

FLUOROVANÉ DERIVÁTY CYKLODEXTRINŮ

MICHAL ŘEZANKA, BARBARA EIGNEROVÁ,
JINDŘICH JINDŘICH a MARTIN KOTORA

Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta
Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 40, Praha 2
rezanka@natur.cuni.cz

Cykloextriny¹ jsou cyklické oligosacharidy složené z D-glukopyranosových jednotek spojených $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou, které tvoří rigidní kavitu. Těto vlastnosti cykloextrinů i jejich derivátů je hojně využíváno v chemické praxi. Aby bylo možné rozšířit využití cykloextrinů, je nezbytné připravit jejich vhodné deriváty. Náš výzkum je zaměřen na přípravu derivátů nejčastěji používaných (α -, β - a γ -) cykloextrinů s různými částečně fluorovanými postranními řetězci (Schéma 1).



R = -C₆F₁₃, -C₃F₇ nebo -CF(CF₃)₂, n = 5, 6 nebo 7

(a) Allylbromid, NaOH, H₂O (b) Ac₂O, Et₃N (c) C₆F₁₃CH₂CH=CH₂, C₃F₇CH₂CH=CH₂ nebo (CF₃)₂CFCH₂CH=CH₂, Hoveyduv-Grubbsův katalyzátor 2. generace (10 mol %), CH₂Cl₂ (sušený CaH₂), Ar atmosféra

Schéma 1. Příprava fluorovaných derivátů

Alkeny **2** byly připraveny allylací cykloextrinů následovanou peracetylací. Příprava fluorovaných derivátů cykloextrinů **3** byla provedena zkříženou metathesí alkenů **2** a perfluoralkylpropenů² za katalýzy Hoveyduv-Grubbsovým katalyzátorem 2. generace. Poměr *E* : *Z* izomerů se pohybuje kolem 5 : 1.

Tento projekt je podporován granty MSM0021620857, IAA 400 550 609 a KAN 200200651.

LITERATURA

- Szejtli, J.: Chem. Rev. 98, 1743 (1998).
- Eignerová, B. Dračinský, M., Kotora, M.: Eur. J. Org. Chem. 2008, 4493.

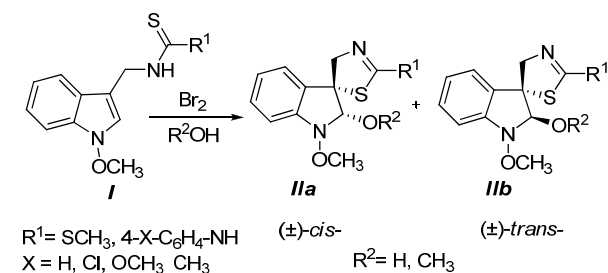
CYKLIZAČNÉ REAKCIE AMINOANALÓGOV INDOLOVÉHO FYTOALEXÍNU 1- METOXYBRASINÍNU

**ANETA SALAYOVÁ^a, PETER KUTSCHY^a, MARTINA
PILÁTOVÁ^b, JÁN MOJŽIŠ^b, ZUZANA ČURILLOVÁ^a,
IVANA VÉGHOVÁ^a**

^a Univerzita P. J. Šafárika, PrF, Ústav chemických vied,
Moyzesova 11, 040 01 Košice; ^b Univerzita P. J. Šafárika,
Lekárska fakulta, Ústav farmakológie, SNP 1, 040 66 Košice
aneta.salayova@upjs.sk

Fytoalexíny z rastlín čeľade *Křížokveté* boli prvý krát opísané v roku 1986 a odvtedy sa im venuje pozornosť pre ich významné protinádorové vlastnosti. Sú to sekundárne metabolity produkované rastlinami de novo pôsobením fyzikálneho, biologického alebo chemického stresu¹. Indolové fytoalexíny 1-metoxibrasinín (**I**, R¹=SCH₃) a 1-metoxyspirobrasinol (**II**, R¹=SCH₃, R²=H) vykazovali pri koncentrácii 1-100 μmol.l⁻¹ antiproliferačnú aktivitu na bunkových líniiach Jurkat².

Aminoanalógy 1-metoxibrasinínu (**I**, R¹=4-X-C₆H₄-NH) boli pripravené reakciou substituovaných fenylizotiokyanátov s príslušným aminorom. Cyklizáciou pripravených tiomočovín vznikajú spirocyklické diastereoizomérne (±)-*cis*- (**IIa**) a (±)-*trans*- produkty (**IIb**, Schéma 1).



Antiproliferačná aktivita syntetizovaných zlúčenín bola sledovaná na nádorových bunkových líniiach prsníka, pľúc, krčka maternice a u leukémie.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0514-06 a grantami VEGA č. 1/3553/06 a č. 1/3365/06

LITERATURA

1. Pedras M. S. C., Zheng Q., Sarma-Mamillapalle V. K.: Nat. Prod. Commun. 2, 319 (2007).
2. Pilátová M., Šarišský M., Kutschy P., Miroššay A., Mezencev R., Čurillová Z., Suchý M., Monde K., Mirossay L., Mojžiš J.: Leukemia Res. 29, 415 (2005).

NOVÝ SYSTÉM PRO CÍLENÁ PROLÉČIVA ANTIMYKOTIK: β-GLUKOSIDÁZA SENSITIVNÍ KONJUGÁT AMFOTERICIN B – STAR PEG

**MILOŠ SEDLÁK^a, PAVEL DRABINA, PETR ŠIMŮNEK
a VLADIMÍR BUCHTA**

^a ÚOCHT FCHT, Univerzita Pardubice, nám. Čs. legii 565, 532
10 Pardubice; ^b Ústav klinické mikrobiologie, LF UK, Sokolská
581, 500 05 Hradec Králové
Milos.Sedlak@upce.cz.

Klinické použitie amfotericinu B (AMB) je limitované jeho špatnou rozpustnosťou vo vode a vedľajšími toxickými účinkami. Pro zvýšenie terapeutického indexu AMB byly dříve navrženy a připraveny konjugáty s polymerními nosiči.¹⁻³ Předmětem tohoto sdělení je syntéza a charakterizace nového konjugátu (AMB) se star poly(ethylenglykolem) (sPEG) [pentaerythritol poly(ethylenglykol)]. Připravený konjugát obsahuje β-D-glukopyranosidový molekulární spínač citlivý k β-glukosidázám (E.C.3.2.1.21). Struktura konjugátu (AMB₄-sPEG) (M = 25 160) byla inspirována poznatkem, že parazitující fungální patogeny mají ve své enzymové výbavě specifické hydrolázy β-glukosidázy, které se však ve zdravé lidské tkáni nenacházejí.⁴

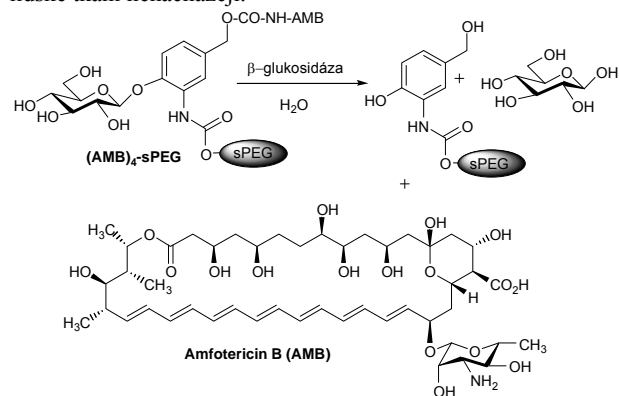


Schéma : Uvolňování AMB z konjugátu působením β-glukosidázy.

β-Glukosidázou katalyzované uvolňování AMB z polymerního nosiče bylo ověřeno *in vitro* spektrofotometricky a pomocí HPLC (Schéma).⁴

Tato práce vznikla za podpory projektu MŠMT ČR 002162 7501 a grantu GAČR 203/06/0583.

LITERATURA

1. Sedlák M., Buchta V., Kubicová L., Šimůnek P., Holčápek M., Kašparová P.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 11, 2833 (2001).
2. Sedlák M., Pravda M., Staud F., Kubicová L., Týčová K., Ventura K.: Bioorg. Med. Chem. 15, 4069 (2007).
3. Sedlák M., Pravda M., Kubicová L., Mikulčíková P., Ventura K.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 2554 (2007).
4. Sedlák M., Drabina P., Bílková E., Šimůnek P., Buchta V.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 2952 (2008).

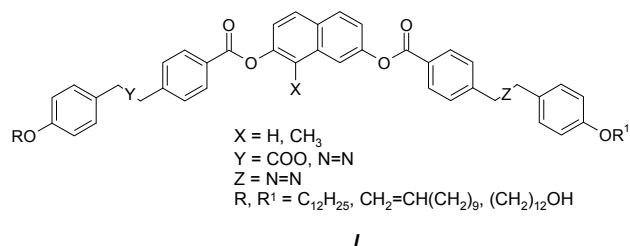
NOVÉ LOMENÉ KAPALNÉ KRYSTALY PRO MOLEKULÁRNÍ PŘEPÍNAČE

ARNOŠT SEIDLER^a, ADAM HENKE^a, MICHAL KOHOUT^a, ANNA KOVÁŘOVÁ^a, VÁCLAV KOZMÍK^a, JIŘÍ SVOBODA^a, VLADIMÍRA NOVOTNÁ^b a MILADA GLOGAROVÁ^b

^aÚstav organické chemie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bFyzikální ústav, Akademie věd ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8
Jiri.Svoboda@vscht.cz

Kapalné krystaly se pro své elektrooptické vlastnosti široce využívají jako aktivní součásti různých typů displejů. Materiály obsahující jako spojku např. azoskupinu nebo dvojnou vazbu vlivem záření podléhají *cis-trans* isomeraci molekulární struktury. Lomená struktura *cis*-isomeru se hůře skládá do nematické či smectické matrice než lineární *trans*-isomer, což vede ke snížení organizovanosti systému a tím i ke změně jeho fyzikálních, chemických a mesomorfních vlastností¹. Nedávno jsme prezentovali několik studií²⁻⁵ zabývajících se lomenými kapalnými krystaly, které jako centrální jádro měly (1-subst.) naftalen-2,7-diol.

V návaznosti na tyto výsledky prezentujeme výsledky syntézy a studia mesomorfních vlastností kapalných krystalů obecné struktury **I** obsahujících azoskupinu v prodlužujícím rameni kapalného krystalu.



Projekt výzkumu byl podporován MŠMT (projekt COST OC176 a výzkumným záměrem MSM 6046137301) a Grantovou agenturou České republiky grantem IAA100100710.

LITERATURA

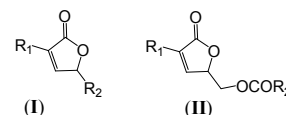
1. D. Demus, J. Goodby, G. W. Gray, H.-W. Spiess, V. Vill (editors). *Handbook of Liquid Crystals*, Vol. 1, str. 40, Wiley-VCH, Weinheim 1998.
2. Svoboda J., Novotná V., Kozmík V., Glogarová M., Weissflog W., Diele S., Pelzl G.: *J. Mater. Chem.* 13, 2104 (2003).
3. Kozmík V., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Baumeister U., Diele S.: *Liq. Cryst.* 32, 1151 (2005).
4. Kozmík V., Kovářová A., Kuchař M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Kroupa J.: *Liq. Cryst.* 33, 41 (2006).
5. Novotná V., Žurek J., Kozmík V., Svoboda J., Glogarová M.: *Liq. Cryst.* 35, (2008) v tisku.

5-ALKYLIDENE BUTENOLIDES WITH ANTIFUNGAL AND CYTOSTATIC ACTIVITY

PETR ŠENEL, MILAN POUR, MARCEL ŠPULÁK, and JIŘÍ KUNEŠ

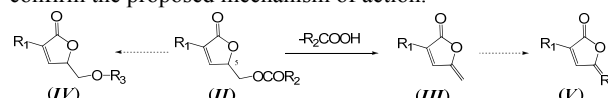
Centre of New Antivirals and Antineoplastics, Dept Inorg. Org. Chem., Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
petr.senel@faf.cuni.cz

For several years, our research team has been running a broad research programme aimed at design and practical synthesis of new biologically active compounds based on naturally occurring substances. These natural precursors possess initial biological activity. However, they also often display unfavorable properties such as higher cytotoxicity and undesired pharmacokinetic profile. Nonetheless, natural products-driven design can significantly contribute to the enrichment of the existing pool of biologically active substances with new unique pharmacophores of higher structural complexity. Within the framework of this programme, we have extensively studied the modifications of the 3,5-disubstituted butenolide lead structure (**I**) which resulted in a new class of highly antifungally active compounds (**II**)^{1,2}.



R₁ = aryl; R₂ = alkyl, subst.alkyl, aryl

As regards possible mechanism of action, the ease of the elimination process of (**II**) together with the absence of a relationship between chirality at C(5) and fungistatic activity suggest that structure (**III**) might be the active metabolite¹. The above-mentioned results support further development which is directed towards the preparation and screening of new 3-(halogenated phenyl)-5-substituted butenolides (**IV**, **V**) to confirm the proposed mechanism of action.



R₁ = halogenated phenyl; R₂ = alkyl; R₃ = alkyl, subst.phenyl; R₄ = alkyl, subst.alkyl,...

All synthesized compounds were tested against a panel of human pathogenic yeasts and filamentous fungi. MICs of certain derivatives, especially some of (**IV**), matched those of the parent structure (**II**).

This work was supported by the Centre for New Antivirals and Antineoplastics funded by the Ministry of Education of the Czech Republic (1M0508) and by the Czech Science Foundation (project No. 203/07/1302). It is also a part

of the research project MSM0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

LITERATURA

1. Pour M., Špulák M., Buchta V., Kubanová P., Vopršalová M., Wsól V., Fáková H., Koudelka P., Pourová H., Schiller R.: *J. Med. Chem.* **44**, 2701 (2001).
2. Pour M., Špulák M., Balšánek V., Kuneš J., Buchta V.: *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 2843 (2003).

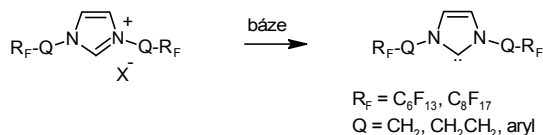
PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ POLYFLUOROVANÝCH KARBENOVÝCH LIGANDŮ

MARTIN SKALICKÝ, VENDULA KELBICOVÁ, MARKĚTA RYBÁČKOVÁ a JAROSLAV KVÍČALA

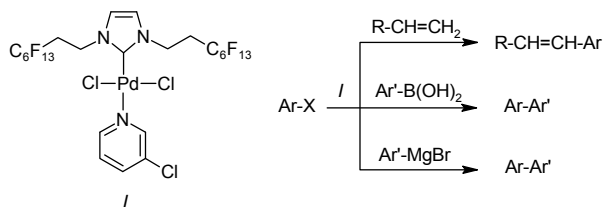
Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
martin.skalicky@vscht.cz

N-heterocyklické karbeny jsou často využívány jako výhodnější alternativa fosfinových ligandů, nabízejí lepší tepelnou odolnost a stabilitu vůči oxidaci. Jsou součástí celé řady komplexů přechodných kovů (Grubbsův katalyzátor, komplexy palladia, niklu a dalších kovů).

Cílem této práce je příprava různých polyfluorovaných imidazoliových solí a studium jejich převedení na karbeny a komplexy přechodných kovů od nich odvozené. V první části práce byly syntetizovány imidazoliové soli nesoucí různé polyfluoroalkylové substituenty oddělené od imidazolového cyklu methylovou, ethylovou nebo arylovou spojkou. Byly provedeny nízkoteplotní NMR experimenty s cílem sledovat *in situ* vznik karbenů a nalézt pro něj vhodné experimentální podmínky.



Ve druhé části práce byla studována katalytická aktivita připraveného komplexu *I* v modelových reakcích (Heckova reakce, Suzukiho coupling, Kumadaův-Tamaoův-Corriuův coupling). Komplex *I* byl připraven analogicky k publikované nefluorované variantě¹ reakcí imidazoliové soli a PdCl₂ v 3-chlorpyridinu jako rozpouštědla.



Děkujeme MŠMT ČR (výzkumné centrum LC06070, výzkumný záměr č. 6046137301) a GA ČR (projekt č. 203/06/1511) za finanční podporu tohoto projektu.

LITERATURA

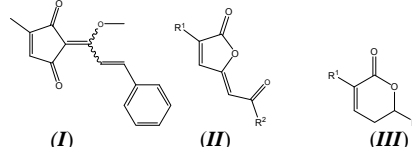
1. O'Brien Ch. J., Kantchev E. A., Valente C., Hadei N., Chass G. A., Lough A., Hopkinson A. C., Organ M. G.: *Chem. Eur. J.* **12**, 4743 (2006).

Pd-CATALYZED FUNCTIONALIZATION AND FURTHER TRANSFORMATIONS OF MEDICINALLY INTERESTING UNSATURATED LACTONES

IVAN ŠNAJDR, LUCIE TICHOTOVÁ, MILAN POUR, JIŘÍ KUNEŠ, MARCEL ŠPULÁK a JAN PAVLÍK

Centre of New Antivirals and Antineoplastics, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic, ivan.snajdr@faf.cuni.cz

The pathways to antifungal 3,5-disubstituted butenolides have been the subject of exploration since 2001¹. Thus, a novel series of related molecules based on another natural antifungal, coruscanone A² (**I**), has been prepared from 3-(aryl)- γ -alkylidene butenolides (**II**) via a simple base-catalyzed rearrangement. As compared to coruscanone A, the compounds lost their antifungal properties, but retained cytostatic activity. On the other hand, the corresponding pentenolide analogues have been much less explored, even though naturally occurring pentenolides, especially 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-ones display interesting biological properties, including phytotoxicity, cytotoxicity against tumour cells, antifungal and/or antimicrobial activity³. Hence, the development of efficient synthetic strategies towards selective functionalization of these compounds is desirable. First, pentenolide analogues of antifungal 3,5-disubstituted butenolides were prepared by oxidative cyclization of 2-(substituted aryl)hex-5-enoic acid as the key step. Given the limitations of the methodology, another approach to the title compounds based on the Pd-catalyzed carbonylative lactonization of 4-iodo-3-en-1-ols was developed, and the carbonylation conditions were optimized⁴. Somewhat surprisingly, unlike the corresponding butenolides with the same substitution pattern, the title pentenolides (**III**) possess no antifungal or cytostatic activity. Having successfully developed the method of synthesis of 3,6-disubstituted pyranones, we moved to explore α -functionalization of the pentenolide core. Along these lines, commercially available 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one was iodinated in the α -position by the Baylis-Hillman reaction and the α -iodolactone was subjected to various coupling conditions.



This work was supported by the Centre for New Antivirals and Antineoplastics funded by the Ministry of Education of the Czech Republic (1M0508) and by the Charles University Grant Agency (98908 and 289/2006/B-CH/FaF). It is also a part of the research project MSM0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

LITERATURA

1. Pour M., Špulák M., Buchta V., Kubanová P., Vopralová M., Wsól V., Fáková H., Koudelka P., Pourová H., Schiller R.: *J. Med. Chem.* **44**, 2701 (2001).
2. Li X. C., Ferreira D., Jacob M. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6872. (2004).
3. Collett L.A., Davies-Coleman M.T., Rivett D.E.A.: *Fortschr. Chem. Org.* **75**, 181. (1998).
4. Šnajdr I., Pavlík J., Schiller R., Kuneš J., Pour M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **72**, 1472 (2007).

VRSTEVNATÉ FOSFONÁTY KOVŮ A JEJICH INTERKALAČNÍ SLOUČENINY – ZAJÍMAVÉ HYBRIDNÍ ANORGANICKO-ORGANICKÉ MATERIÁLY

JAN SVOBODA, VÍTĚZSLAV ZIMA, KLÁRA MELÁNOVÁ a LUDVÍK BENEŠ

*Společná laboratoř chemie pevných látek Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i a Univerzity Pardubice, Studentská 84, Pardubice, 53210
Jan.Svoboda@upce.cz*

Organicky modifikované pevné látky jsou studovány pro široké spektrum zajímavých vlastností. Nalezly již uplatnění jako sorbenty, katalyzátory, senzory, jsou využitelné v optice i elektronice¹. Hlavní předností těchto materiálů je možnost cíleného zabudování organické látky do struktury pevné fáze. Tímto způsobem lze do jisté míry řídit vlastnosti těchto látek a kombinovat tak přednosti jak organické tak anorganické části těchto hybridních materiálů.

Připravili jsme řadu vrstevnatých fosfonátů kovů odvozených od fosfonových kyselin (fenylfosfonové, methylfosfonové, 4-sulfofenylfosfonové a 4-karboxyfenylfosfonové) a solí kovů (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} a Zr^{4+})^{2,4}. U některých fosfonátů se nám podařilo určit jejich strukturu^{2,4}.

Do fenylfosfonátu barnatého⁵ a methylfosfonátu strontnatého byly interkalovány alkoholy, aminy, aminoalkoholy a některé dusíkaté heterocykly. Tyto látky byly testovány z hlediska jejich stability.

Připravili jsme rovněž 4-sulfofenylfosfonát zirkoničitý a hydrogenfosforečnan-4-sulfofenylfosfonát zirkoničitý a jejich interkaláty s aminy, kationty alkalických kovů a kyselinou fosforečnou. Tyto látky jsou výrazně rezistentní vůči kyselému prostředí a vykazují zvýšenou protonovou vodivost. Pro jejich poměrně dobrou tepelnou odolnost jsou tyto látky zkoumány jako materiál vhodný pro membrány v palivových článcích.

Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR (203/06/P127 a 203/08/0208).

LITERATURA

1. Alberti G., v knize: *Comprehensive Supramolecular Chemistry vol. 7*, kap. 5, s. 151. Pergamon, Oxford 1996.
2. Svoboda J., Zima V., Beneš L., Melánová K., Vlček M.: *Inorg Chem.* **44**, 9968 (2005).
3. Zima V., Svoboda J., Beneš L., Melánová K., Trchová M.: *J. Solid State Sci.* **8**, 1380 (2006).
4. Zima V., Svoboda J., Beneš L., Melánová K., Trchová M., Dybal J.: *J. Solid State Chem.* **180**, 929 (2007).
5. Svoboda J., Zima V., Beneš L., Melánová K., Vlček M., Trchová M.: *J. Phys. Chem. Solids* **69**, 1439 (2008).

CYKLOADIČNÍ REAKCE PĚTIČLENNÝCH HETEROCYKLŮ

ALEŠ MACHARA a JIŘÍ SVOBODA

*Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 16628 Praha 6,
Jiri.Svoboda@vscht.cz*

[4+2] Cykloadiční reakce jsou jednou z nejběžnějších metod tvorby šestičlenného cyklického systému. Vinylderiváty pětičlenných aromatických heterocyklických sloučenin a jejich benzo[*b*]anelované analogy se chovají v Dielsových-Alderových reakcích jako dieny¹. Tento exocyklický dienový systém složený z vinylové skupiny a jedné dvojně vazby kruhu poskytuje reakci s vhodnými dienofily deriváty di- resp. tetrahydrobenzo[*b*]furanu, di- resp. tetrahydrobenzo[*b*]thiofenu či analogické deriváty indolu. Tuto syntetickou strategii lze s výhodou použít k přípravě jinak obtížně dostupných cílových molekul.

Při studiu cykloadičních reakcí 2-vinylthieno[3,2-*b*]benzofuranu a 2-vinylthieno[3,2-*b*]benzothiofenu jsme již dříve zjistili, že jejich reakce s maleinanhydridem, methylpropiolátem a nitroethenem probíhají regioselektivně; primární produkty však nebylo možné izolovat, pouze produkty jejich následných transformací. Daleko komplikovanější průběh však měly reakce s DMAD¹, které poskytly široké spektrum látek jejichž vznik byl vysvětlen následnými pericyklickými reakcemi neisolovatelných primárních aduktů.

Kromě očekávaných produktů uvažované součinné reakce byly však z reakčních směsí izolovány i deriváty s cyklopenta[*b*]thiopyranovým (thialenovým) skeletem v nezanedbatelném výtěžku (Schéma 1).

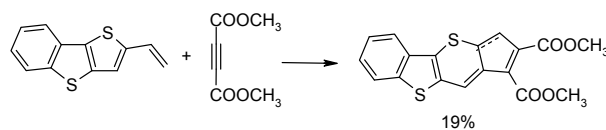


Schéma 1

V průběhu cykloadiční reakce zjevně došlo k rozšíření původního thiofenového kruhu na thiopyranový a anelaci dalšího cyklopentanového kruhu. V navazující studii, v níž byl studován vliv anelovaného jádra na distribuci produktů,

především s ohledem na zastoupení látek s thialenovým jádrem, bylo pozorováno, že anelovaná elektronově bohatá jádra chovající se jako donor elektronů podstatně zvyšují výtěžky derivátů thialenu. Na základě zjištěných výsledků byla formulována hypotéza o existenci parciálního kladného náboje na thiofenovém kruhu v průběhu reakce. Za klíčový krok považujeme zapojení ne vazebného elektronového páru atomu síry do procesu přesmyku kruhu a v tomto ohledu jsme navrhli mechanismus rozšíření thiofenového kruhu¹.

Pro ověření mechanismu byly navrženy a připraveny nové dieny, které měly ovlivnit distribuci elektronové hustoty v tranzitním stavu reakce a následně i distribuci produktů cykloadiční reakce. Strukturální změny zahrnovaly substituci vinylové skupiny, změnu polohy vinylové skupiny z polohy 2 do polohy 3 a záměnu atomu síry atomem selenu.

Všechny studované cykloadice byly doprovázeny následnými transformacemi primárních produktů za vzniku široké škály látek analogicky jako v reakcích 2-vinyllderivátů. Isomerní 3-vinyllderivát při reakci s DMAD neposkytl derivát thialenu a nepřímo tak došlo k potvrzení naší domněnky². Cykloadiční reakce 2-vinylselenofenů vedly k mnohem vyšším výtěžkům látek s pseudoazulenovým skeletem v porovnání s analogickými 2-vinylthiofeny. V případě samotného 2-vinylselenofenu došlo k třicetinásobnému zvýšení výtěžku pseudoazulenu v porovnání s 2-vinylthiofenem. Jako první jsme tímto způsobem připravili deriváty nového heterocyklu-selenalenu.

Vyšší výtěžky látek s přesmyknutým jádrem u 2-vinylselenofenů dávaly možnost lépe prověřit, zda k rozšiřování chalkogenofenů dochází i v reakcích s jinými dienofily. Použili jsme proto řadu elektronově chudých alkenů a alkynů: methyl-propiolát, nitroethen, *N*-methylmaleimid, ethyl-2-kyanakrylát a butyndinitril. Zjistili jsme, že k rozšíření kruhu dochází pouze u elektronově chudých alkynů. Cykloadiční reakce s kyanakrylátem provedená při laboratorní teplotě však poskytla řadu cenných zjištění. Především se nám podařilo úspěšně izolovat předpokládaný primární intermediát a popsat jeho reaktivitu za laboratorních podmínek. Dále jsme identifikovali strukturu polymeru vznikajícího při cykloadiční reakci. Právě z ní se dá usoudit, že námi studované reakce neprobíhají zwitteriontovým mechanismem, ale přes intermediáty s převládajícím diradikálovým charakterem.

Pro podporu hypotézy o participaci chalkogenofenu jsme provedli řadu experimentů v nichž byla v benzylové poloze selenofenového derivátu cíleně snížena elektronová hustota. Ačkoliv nebyl pozorován vznik látek s jiným než nezměněným selenofenovým jádrem, stále se domníváme, že vznik selenirania je jedinou možností jak vysvětlit vznik látek s pseudoazulenovým seskupením za podmínek cykloadiční reakce.

Ylidy vznikající reakcí thiofenu s karbenoidy odvozených od malonátů rovněž podléhají rozšíření thiofenového kruhu na thiopyranový³. Klíčový intermediát publikovaného mechanismu je na první pohled velmi podobný námi navrženému thiiraniu/seleniraniu. Námi provedené studium reaktivity kondenzovaných ylidů budou v příspěvku rovněž diskutovány.

Projekt výzkumu byl podporován MŠMT (projekt COST OC176 a výzkumným záměrem MSM 6046137301).

LITERATURA

1. Machara A., Kurfürst M., Kozmík V., Petříčková H., Dvořáková H., Svoboda J.: *Tetrahedron Lett.* 45, 2189 (2004).
2. Machara A., Pojarová M., Svoboda J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 72, 952 (2007).
3. Porter A. E. A., Rzepa H. S.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 809 (1988).

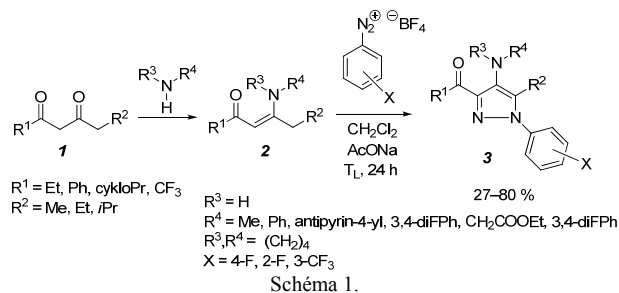
SYNTÉZA A CHARAKTERIZACE FLUOROVANÝCH 3-ACYL-4-AMINO-1-ARYL-1H-PYRAZOLŮ

PETR ŠIMŮNEK*, MARKÉTA SVOBODOVÁ, a VLADIMÍR MACHÁČEK

*Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Ústav organické chemie a technologie, nám. Čs. legií 565, Pardubice, 532 10
marketa.svobodova@upce.cz*

V nedávné době jsme publikovali novou a jednoduchou metodu syntézy substituovaných 4-amino-1-arylpyrazolů vycházející z β -enaminonů a substituovaných benzen-diazonium-tetrafluorborátů.¹ Tuto metodu jsme nyní rozšířili také na reakce fluorovaných β -enaminonů a diazoniových solí, neboť fluorované heterocykly představují důležitou třídu sloučenin a řada pyrazolů obsahujících právě fluor našla použití jako agrochemikálie² a léčiva (např. Celetoxib).

Reakcí β -enaminonu **1** s různě substituovanými benzen-diazonium-tetrafluorboráty **2** byla připravena série 3-acyl-4-amino-1-aryl-1H-pyrazolů **3** (Schéma 1). Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR spektroskopie.



V případě použití 2,6-dichlor-4-trifluormethylbenzen-diazonium-tetrafluorborátu byl pozorován i atak *N*-fenylyskupiny výchozího enaminonu (Schéma 2).

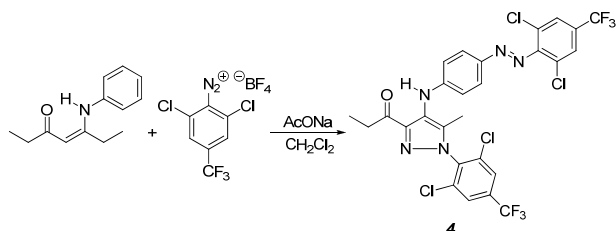


Schéma 2

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 0021627501.

LITERATURA

1. Šimůnek P., Svobodová M., Macháček V.: *Synthesis* 1761 (2008).
2. Lamberth C., *Heterocycles* 71, 1467 (2007).
3. Simon L. S., Lanza S. L., Lipsky P. E., Hubbard R. C., Talkwalker S., Schwartz B. D., Isakson P. C., Geys G. S., *Arthritis Rheum.* 41, 1591 (1998).

PORFYRINY SUBSTITUOVANÉ SACHARIDY V MESO POLOZE A JEJICH AGREGAČNÍ VLASTNOSTI

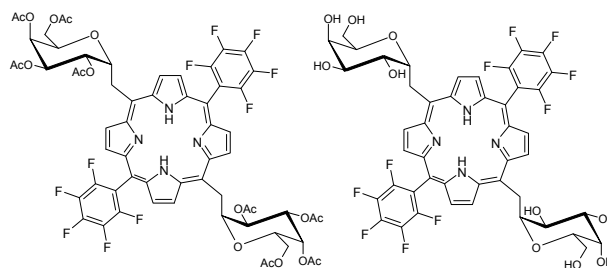
**ONDŘEJ ŠIMÁK^a, DONATO MONTI^b
a PAVEL DRAŠAR^a**

^a Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha ; Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Univ. Roma "Tor Vergata", I-00133 Rome, Italy
Ondrej.Simak@vscht.cz, Pavel.Drasar@vscht.cz

Sloučeniny, ve kterých je aktivní chromofor spojen s vektorem na bázi peptidu, oligonukleotidu nebo sacharidu^{1,2}, jsou předmětem intenzivního výzkumu. Použití chirálního polyhydroxylovaného vektoru, v tomto případě sacharidu, předurčuje tyto supramolekulární syntony jako prostředky pro molekulární rozpoznávání v polárním (vodném, biologickém, atd.) prostředí²⁻³.

Syntetická část práce je zaměřena na přípravu meso-C-„glykosylovaných“ porfyrinů, kde je cukerná část připojena k makrocyklu pomocí robustní kovalentní vazby C-C. Na rozdíl od klasické O-glykosidické vazby jsou použité „C-glykosidy“ odolné vůči hydrolytickému, potažmo enzymovému štěpení. Pro jejich syntézu byla využita cesta postupné výstavby z dipyrrolového prekurzoru a sacharidového aldehydu.

Změny optických vlastností takto získaných porfyrinů během agregace v roztoku byly měřeny pomocí UV/VIS a fluorescenční spektroskopie. Chiralita vznikajících supramolekulárních struktur byla zjišťována pomocí CD spektroskopie.



Práce je podporována projekty MŠMT MSM6046137305, IP04OCD31.001, OC08043 (NPFM-II), 2B06024 NVP-II Suprafyt, grant GAČR 2003/06/0006 a grant NATO CBP.EAP.CLG.982972.

LITERATURA

1. Mikata Y., Ouchi Y., Tabata K., Ogura S.-I., Okura I., Ono H., Yano S.: *Tetrahedron Lett.* 8, 3007 (1998).
2. Štěpánek P., Dukh M., Šaman D., Moravcová J., Kniežo L., Monti D., Venanza M., Mancini G., Drašar P.: *Org.Bioorg. Chem.* 5, 960 (2007).
3. Dukh M., Šaman D., Lang K., Pouzar V., Černý I., Drašar P., Král V.: *Org. Biomol. Chem.* 1, 3458 (2003).
4. Dukh M., Drašar P., Černý I., Pouzar V., Shriver J. A., Král V., Sessler J. L.: *Supramolecular Chem.* 14, 237 (2002).

ACYLTIOSEMIKARBAZIDY AKO VHODNÉ SYNTÓNY NOVÝCH AKRIDINOVÝCH FARMAKOFÓROV

**JANA TOMAŠČIKOVÁ, ZDENKA FRÖHLICHOVÁ,
JÁN IMRICH, IVAN DANIHEL a PAVOL KRISTIAN**

Univerzita P. J. Šafárika, Prírodovedecká fakulta, Ústav chemických vied, Moyzesova 11, 040 01 Košice
tomascikova@gmail.com

Acyltiosemicarbazidy predstavujú skupinu látok vhodných na prípravu rôznych dusíkatých heterocyklov¹. Naväzujúc na tieto poznatky boli cyklizačnými reakciami 1-acyl-4-fenyl/(akridin-9-yl)tiosemicarbazidov pomocou dimetyl acetyléndikarboxylátu, oxidu ortuťnatého a intramolekulovou cyklizáciou v alkalickom prostredí syntetizované² nové 5-článkové heterocykly, a to tiazolidín-4-óny **I**, **II**, 1,2,4-triazoly **III** a 1,3,4-oxadiazoly³ **IV**. Pripravené zlúčeniny boli charakterizované a identifikované pomocou IČ, UV, ¹H a ¹³C 2D NMR spektroskopie a kvantovo-chemickými výpočtami.

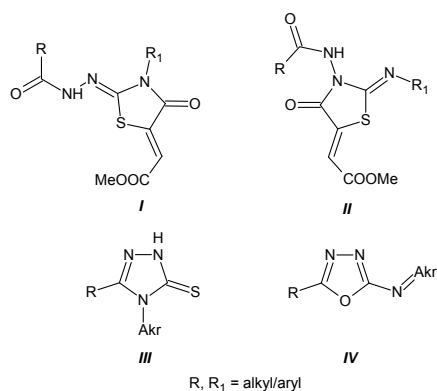


Schéma 1. Produkty reakcí acyltiosemikarbazidů

Nové poznatky o tautomerizácii produktů a regioselektivite sledovaných reakcí poukazují na silný vplyv acylovej skupiny na regioselektivitu v neprospech 6-článkové štruktúry. Vybrané deriváty vykazovali cytotoxickú účinnosť voči L1210 leukemickým bunkovým líniam.

Táto práca vznikla za podpory grantovej agentúry VEGA (1/0476/08 a 1/0053/08) a štátneho programu NMR (2003SP200280203).

LITERATÚRA

1. Mustafa S. M., Nair V. A., Chittoor J. P., Krishnapillai S.: Mini-Reviews in Organic Chemistry 1, 375 (2004).
2. Tomaščíková J., Imrich J., Danihel I., Böhm S., Kristian P., Pisarčíková J., Sabol M., Klika K. D.: Molecules 13, 501 (2008).
3. Fröhlichová Z., Tomaščíková J., Imrich J., Kristian P., Danihel I., Böhm S., Sabolová D., Kožurková M., Klika K. D.: Heterocycles, v tlači.

PREDIKCE OPTICKÉ OTÁČIVOSTI A IČ SPEKTER JEDNODUCHÝCH MONOSACHARIDŮ

IVAN RAICH^{a,a}, KATEŘINA TOMČÁKOVÁ^a,
a JAKUB KAMINSKÝ^{a,b}

^aÚstav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bÚstav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
Ivan.Raich@vscht.cz

Pro strukturní studie nejrůznějších chemických látek, předpovědi jejich fyzikálně chemických vlastností a interpretace jejich spekter se v posledních letech stále více využívají predikce na *ab initio*/DFT úrovni. Výpočty chiroptických vlastností se dále navíc využívají k určení absolutní konfigurace sacharidů a jiných chirálních látek a k dalším stereochemickým studiím.

Pro bicyklické methylethiofuranosidy s tříčlenným oxiranovým, thiiranovým a aziridinovým kruhem byly v roztoku na nejrůznějších teoretických úrovních počítány optické otáčivosti a infračervená spektra. Podrobně je

diskutován vliv metody, báze a dalších podmínek a kvantitativní shoda vypočtených a experimentálních hodnot je vyjádřena pomocí středních kvadratických odchylek (RMS). Výpočtům uvedené vlastnosti předcházely geometrické optimalizace, rovněž v solvatovaném stavu, s využitím solvatačního modelu CPCM.

Všechny výpočty byly prováděny v programu Gaussian 03W.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠM ČR číslo 604 613 7305.

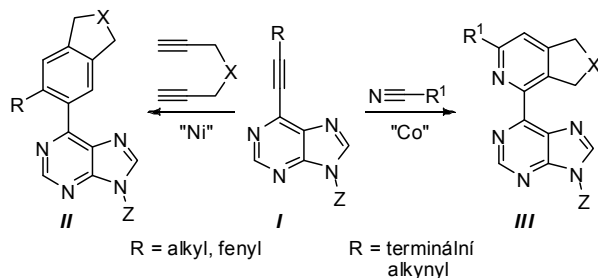
CYKLOTRIMERIZACE V PŘÍPRAVĚ 6-ARYL- A 6-HETEROARYLPURINŮ

PAVEL TUREK^{a,b} a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2
katora@natur.cuni.cz

^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
pavel.turek@uochb.cas.cz

6-Arylpurinové báze a nukleosidy vykazují zajímavé biologické vlastnosti (cytostatická, antibakteriální a antimykobakteriální aktivita)¹, proto jsou ze syntetického hlediska zajímavé. Naším cílem bylo vypracovat novou metodu přípravy 6-arylpurinů **II** založenou na [2+2+2]-cyklotrimerizaci 6-alkynylpurinů **I** s diyny katalyzovanou komplexy přechodných kovů (zejména Ni). Tento přístup se ukázal být vhodným pro syntézu celé řady substituovaných 6-arylpurinů².



[2+2+2]-cyklotrimerizační reakce byla použita i v dalším projektu, který se zabýval přípravou nových potenciálně biologicky aktivních 6-heteroarylpurinových derivátů **III**. Cílové sloučeniny byly připraveny kocyklotrimerizací 6-diynylpurinů **I** s řadou různých nitrilů za katalýzy komplexem CpCo(CO)₂. Na modelové reakci cyklotrimerizace 6-oktadiynylpurinů s nitrily v přítomnosti stechiometrického množství CpCo(CO)₂ byly zkoumány různé reakční podmínky (zahřívání, ozařování světlem, mikrovlnné záření)³. V další části byly porovnávány stechiometrické a katalytické reakce.

Získané deriváty 6-aryl- i 6-heteroarylpurinů byly testovány *in vitro* na cytostatickou aktivitu.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 1M0508.

LITERATURA

1. Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: J. Med. Chem. 43, 1817 (2000).
2. a) Turek P., Kotora M., Hocek M., Císařová I.: Tetrahedron Lett. 44, 785 (2003); b) Turek P., Kotora M., Tišlerová I., Hocek M., Votruba I., Císařová I.: J. Org. Chem. 69, 9224 (2004); c) Turek P., Novák P., Pohl R., Hocek M., Kotora M.: J. Org. Chem. 71, 8978 (2006).
3. Turek P., Hocek M., Pohl R., Klepetářová B., Kotora M.: Eur. J. Org. Chem., 2008, 3335.

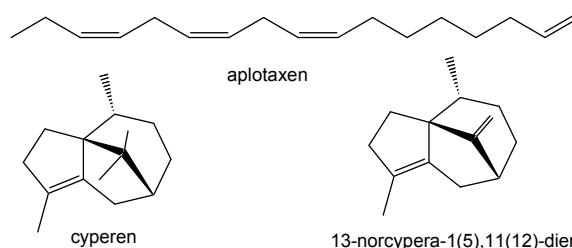
OBSAHOVÉ LÁTKY SILICE PARCHY SAFLOROVÉ (*Rhaponticum carthamoides*) A JEJÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA

PAVEL KLOUČEK^a, JAROSLAV HAVLÍK^a, MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ^b, LADISLAV KOKOŠKA^c, IRENA VALTEROVÁ^b, SOŇA VAŠÍČKOVÁ^b a VÁCLAV ZELENÝ^a

^aFakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6, ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6, ^cInstitut tropů a subtropů, ČZU, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6
irena@uochb.cas.cz

Rhaponticum carthamoides (Willd.) Iljin (Asteraceae) je vytrvalá bylina původem ze Sibíře a Střední Asie. V současné době se pěstuje v Rusku a dalších východoevropských zemích jako léčivá rostlina. Kořeny a oddenky byly tradičně využívány v lidové medicíně na Sibíři jako posilující a stimulující léky. Již dříve byla popsána řada obsahových látek této rostliny, ale složení esenciálního oleje nebylo známo. Proto jsme analyzovali silici z kořenů parchy saflorové technikami GC, GC-MS, GC-FTIR. Destilace poskytla 0.043% (w/w) tmavožlutého oleje, v němž bylo identifikováno 30 látek. Hlavní složkou je dosud nepopsaný norseskviterpen (22.6%), následovaný známými látkami aplotaxenem (21.2%) a cyperenem (17.9%). Jejich struktura byla potvrzena ¹H, ¹³C a 2D NMR spektry (COSY, HSQC, HMBC, INADEQUATE a NOE). Mezi minoritními složkami byly identifikovány seskviterpeny selinenového typu. Naše výsledky se výrazně lišily od předchozích literárních údajů^{1,2}.

Surový olej byl testován na účinky proti mikroorganismům s použitím mikrodiluční metody. Proti pěti testovaným druhům bakterií byla nalezena aktivita v koncentračním rozmezí 32–256 µg/mL. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána proti druhům *Staphylococcus aureus* (MIC 32 µg/mL), dále *Listeria monocytogenes* a *Candida albicans* (MICs 128 µg/mL). G– bakterie nebyly inhibovány.



Autoři děkují MŠMT ČR (#MSM 6046137305), GA ČR (#525/08/1179) a AV ČR (#Z40550506) za finanční podporu.

LITERATURA

1. Belov V. N. Lavrova T. V., Vashkevich N. G., Mikhailov A. Y.: Russ. J. Appl. Chem. 67, 154 (1994).
2. Geszprych A., Weglarz Z.: Herba Pol. 48, 188 (2002).

OBSAHOVÉ LÁTKY SILICE ZE SEMEN ČERNUCHY *Nigella nigellastrum*

PAVEL KLOUČEK^a, IRENA VALTEROVÁ^b, JAN MALÍK^c, JAROSLAV HAVLÍK^a, LADISLAV KOKOŠKA^c a PAVEL JIROŠ^b

^aFakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, ČZU, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6, ^bÚOCHB AV ČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, ^cInstitut tropů a subtropů, ČZU, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6
irena@uochb.cas.cz

Čeď pryskyřníkovitých (Ranunculaceae) byla donedávna považována za taxon, jehož rostliny neobsahují silice¹. V posledních letech se však objevilo několik prací zabývajících se chemickým složením a biologickou aktivitou silice ze semen několika druhů rodu *Nigella*²⁻⁵. Nejnovější práce popisují přítomnost těkavých látek i u rodu *Aquilegia* (orlíček)⁶ a *Delphinium* (stračka)⁷. Snaha o zjištění distribuce isoprenoidů v čeledi pryskyřníkovitých pro chemotaxonomické účely nás vedla k analýze silice ze semen černuchy *Nigella nigellastrum* Willk.

Silice světle žluté barvy (0.028% w/w) byla získána ze semen rostlin pěstovaných v ČR. Bylo v ní identifikováno 13 látek, tvořících 93 % oleje. Hlavními složkami byly α-pinen (43 %) a β-pinen (46 %). Mezi minoritními látkami byl přítomen pimaradien (1 %) a neocembren (1 %). Naše výsledky korespondují s předchozími analýzami silic získaných z ostatních druhů rodu *Nigella*. Z hlediska chemického složení se získaná silice blíží především druhům *N. sativa* a *N. arvensis*, které také obsahují převážně monoterpeny^{2,5}. Na druhé straně další zkoumané druhy, jako jsou *N. damascena* či *N. orientalis*, obsahují převážně seskviterpeny (např. β-elemen)^{3,4}. Z mezidruhových rozdílů ve složení silice lze usuzovat na příbuznost zkoumaných druhů černuch.

Autoři děkují GA ČR (#525/08/1179) a AV ČR (#Z40550506) za finanční podporu.

LITERATURA

1. Watson L., Dallwitz M. J.: <http://delta-intkey.com/>.
2. Moretti A., D'Antuono L. F., Elementi S.: *J. Essent. Oil. Res.* 16, 182 (2004).
3. Fico G., Bader A., Flamini G., Cioni P. L., Morelli I.: *Essent. Oil. Res.* 15, 57 (2003).
4. Kokoska, L., Havlík J., Valterová I., Nepovím A., Rada V., Vaněk T.: *Flavour Fragr. J.* 20, 419 (2005).
5. Havlík J., Kokoška L., Vašíčková S., Valterová I.: *Flavour Fragr. J.* 21, 713 (2006).
6. Radulovic N., Dekic M., Zlatkovic B., Dekic S. Dekic V., Palic R.: *Chem. Pap.* 61, 405 (2007).
7. Gulec C., Yayli N., Yesilgil P., Terzioglu S., Yayli N.: *Asian J. Chem.* 19, 4069, (2007).

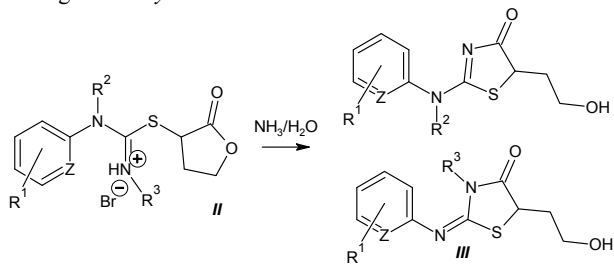
TRANSFORMACE ISOTHIOURONIOVÝCH SOLÍ VEDOUcí KE VZNIKU THIAZOLIDIN-4-ONŮ

JIŘÍ VÁŇA, JIŘÍ HANUSEK a MILOŠ SEDLÁK

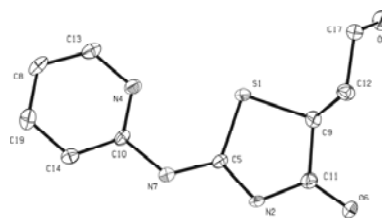
Ústav organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-
technologická, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. legií 565,
532 10 Pardubice
jiri.vana@upce.cz

Pětičlenné heterocyklické systémy nalézáme u mnoha přírodních i průmyslově vyráběných látek. Jejich příprava a studium mechanismu vzniku stále patří mezi aktuální problémy organické chemie^{1,2}.

Za nejvýznamnější oblast využití thiazolidindionového skeletu je možno považovat medicínální chemii. Byly pozorovány antihyperglykemické účinky *Troglitazonu*, *Rosiglitazonu* a *Pioglitazonu*, protizánětlivé účinky *Darbufelonu* či antivirotické a antibakteriální účinky sirných analogů *Indolmycinu*.



Reakcí *N*-arylsubstituovaných thioamocovin s 2-brombutyrolaktonem jsme připravili isothiuroniové soli **II** které následně podléhají kyselé i bazické katalyzované transformaci na příslušné 5-(2-hydroxyethyl)-2-fenylamino-1,3-thiazol-4(5*H*)-ony **III**. Tyto látky se mohou nalézat ve více tautomerních formách. Jejich strukturu v pevné fázi se podařilo určit pomocí rentgenostrukturní analýzy. Transformace byla sledována spektrofotometricky v roztocích pufrů a byl navržen její mechanismus.



Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (projekt MSM 021627501)

LITERATURA

1. Sedlák M., Hanusek J., Hejtmánková L., Kašparová P.: *Org. Biomol. Chem.* 1, 1204 (2003).
2. Hanusek J., Hejtmánková L., Štěrbá V., Sedlák M.: *Org. Biomol. Chem.* 2, 756 (2004).

ANALÝZA ISOFLAVONOIDŮ VE VYBRANÝCH ZÁSTUPCÍCH ČELEDI APIACEAE

LUCIE VANÍČKOVÁ^a, KHALED ABDULMANEA^a,
PETRA LANKOVÁ^a, ELENA A. PROKUDINA^a,
VÁCLAV ZELENÝ^b a OLDŘICH LAPČÍK^a

^aFakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT
Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; ^bČZU v Praze, Fakulta
agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká
129, 165 21 Praha 6

Isoflavonoidy (3-fenylchromony) jsou charakteristické sekundární metabolity bobovitých rostlin (Leguminosae), postupně ale narůstá evidence o jejich výskytu v řadě dalších taxonů¹. V čeledi Apiaceae (miříkovité) byly isoflavonoidy zatím identifikovány pouze ve dvou druzích rodu *Bupleurum*, jednalo se celkem o tři látky (daidzin, puerarin a glykosid formononetinu)^{2,3}.

V této studii jsme testovali devět zástupců čeledi Apiaceae, jmenovitě *Anethum graveolens*, *Carum cavi*, *Ferula asa-foetida*, *Foeniculum vulgare*, *Oenanthe aquatica*, *Pimpinella anisum*, *Pimpinella major*, *Peucedanum cervaria* a *Sium sisarum*. Listy a semena rostlin byly lyofilizovány, rozemlety a extrahovány směsí methanol – voda 70 : 30. Pro analýzu extraktů byly použity dva nezávislé metodické přístupy. A) Extrakty byly přečištěny na imunoafinitním nosiči a poté analyzovány HPLC-MS-SIM. B) Extrakty byly frakcionovány semipreparativní HPLC na reverzní fázi a poté analyzovány ELISA metodami specifickými pro daidzein, genistein, biochanin A a jejich deriváty v polohách 7 a 4'. Spektrum sledovaných látek zahrnovalo aglykony i glykosidy (daidzin, genistin, sisotrin, daidzein, genistein, isoformononetin, formononetin, biochanin A, prunetin). Alespoň jednou z metodik byly isoflavonoidy detegovány v sedmi z devíti studovaných druhů čeledi Apiaceae, kombinací imunoafinitní extrakce a HPLC-MS-SIM byly isoflavony detegovány v pěti druzích. Koncentrace jednotlivých analytů se pohybovala v rozmezí 3-20000 ng/g sušiny, nejvyšší obsah isoflavonoidů byl zaznamenán v druhu *Pimpinella major*. Z těchto výsledků

usuzujeme, že metabolická dráha pro isoflavony je obecněji rozšířena v čeledi Apiaceae.

Poděkování: Práce vznikla za podpory projektů 525/06/0864 GAČR a MSM 6046137305.

LITERATURA

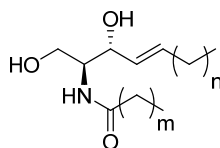
1. Macková Z., Koblovská R., Lapčík: *Phytochemistry* 67, 849 (2006).
2. Tan L., Zhao Y. Y., Wang B., Zhang R. Y.: *Chinese Chem. Lett.* 9, 71 (1998).
3. Liang H., Zhao Y. Y., Cui Y. J., Liu Q. X.: *J. Beijing Medical University* 32, 223 (2000).

KRÁTKÉ CERAMIDY SNIŽUJÍ BARIÉROVOU FUNKCI KŮŽE

JAKUB NOVOTNÝ, KATEŘINA POSPĚCHOVÁ, ALEXANDR HRABÁLEK a KATEŘINA VÁVROVÁ

Výzkumné centrum Nová antivirotika a antineoplastika, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, katerina.vavrova@faf.cuni.cz

Ceramidy jsou klíčovými sloučeninami určujícími propustnost lidské kůže. Základem molekuly je sfingoidní báze acylovaná dlouhou mastnou kyselinou (24-30C). Poslední (devátý) typ ceramidů byl objeven teprve v roce 2003 a dosud nejsou známy žádné vztahy mezi strukturou a účinkem těchto látek. Cílem této práce bylo připravit sérii analogů ceramidů s kratší sfingosinovou i acylovou částí (Obr. 1) a zjistit, zda tato změna má vliv na funkci kožní bariéry.



Obr. 1. Struktura fyziologického ceramidu ($m = 22$; $n = 12$) a jeho analogů ($m = 0-10$; $n = 8,12$).

Analogy byly připraveny reakcí chráněného L-serinalu s příslušným alkynidem v přítomnosti HMPA. Vzniklý alkyn byl redukován lithiem v ethylaminu na *trans*-alken. Po odchránění byl vzniklý sfingosin acylován na dusíku pomocí příslušných sukcinimidylesterů nebo v přítomnosti karbodiimidu.

Zjistili jsme, že zkrácení acylového řetězce vede ke ztrátě bariérových vlastností kůže (několikanásobně zvýšená permeace dvou modelových látek, snížená elektrická rezistence). Největší vliv byl nalezen u butyl a hexyl derivátů, což překvapivě koreluje s chováním ceramidů ve fosfolipidových membránách.

Tyto výsledky potvrdily naši hypotézu, že délka řetězců ceramidů je esenciální pro zachování funkční kožní bariéry a

v mnoha pracích běžně používané krátké ceramidy nejsou vhodným modelem pro studium kůže.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (Výzkumné centrum Nová antivirotika a antineoplastika IM0508 a Výzkumný záměr MSM0021620822) a GAUK (286/2006/B-CH/FaF).

ENANTIOSELECTIVE ASYMMETRIC SYNTHESIS OF VARIOUS CYCLES AND HETEROCYCLES VIA ORGANOCATALYSIS

JAN VESELÝ^a and ARMANDO CORDOVA^b

^a *Department of Organic Chemistry, Charles University, Albertov 2030; 128 40 Praha 2;* ^b *Arrhenius Laboratories, Dept Org. Chem., Stockholm University, Stockholm, Sweden; jxvesely@post.cz*

Over the past decade, the field of enantioselective organocatalysis has had a significant impact in chemical synthesis and has developed into a practical synthetic paradigm since its genesis nearly 30 years ago. Although this field is in its infancy, the breadth of different reactions that can be catalysed make it a complementary discipline to conventional metal catalysis. Of crucial importance is that it offers a mild, environmental-friendly, water and air tolerant practical and generally simple method of making functionalized molecules with high enantiopurity and therefore has great potential in discovery chemistry.

The main goal for our group was to develop novel synthetic methodology based on organocatalysis for construction of cyclic and heterocyclic molecules containing N or/and O atom and to apply this methodology for the preparation of potential targets from the pharmaceutical point of view. Enantioselective asymmetric synthesis of functionalized cyclopropanes, cyclopentanes, cycloheptanes, aziridines, isoxazolidines and pyrrolidines (Fig. 1) from easily-accessible starting materials (α,β -unsaturated aldehydes) is described. Generally, we found TMS-protected diphenylprolinol (Fig. 2) as the most efficient organocatalyst of those reactions in contrast to enantioselectivity, diastereoselectivity and reaction time.

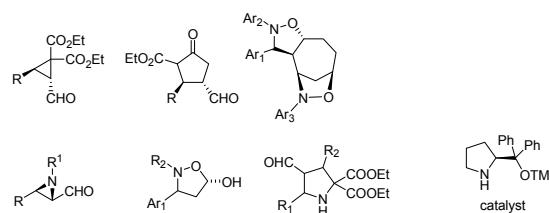


Fig.1 Various cyclic compounds prepared via organocatalysis

Fig.2 TMS-protected diphenylprolinol

This work was supported by Wenner-Gren Foundation and Naturvetenskap.

PŘÍPRAVA SELEKTIVNĚ ZNAČENÝCH LUPANOVÝCH TRITERPENOIDŮ S CYTOTOXICKOU AKTIVITOU

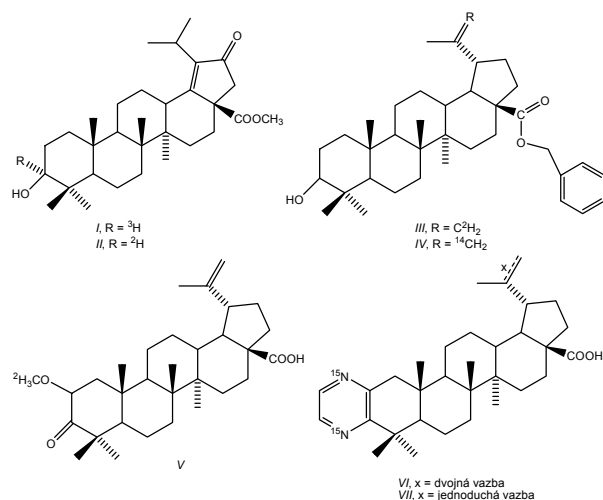
M. VLK^{a,d}, J. ŠAREK^a, M. HAJDÚCH^b a T. ELBERT^c

^aKatedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha; ^bLab.experiment. medicíny, Dětská a Onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc; ^cLaboratoř radioizotopů, ÚOCHB AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; ^dKatedra jaderné chemie, FJFI ČVUT, Břehová 7, 128 43 Praha
vlkmarcin@gmail.com

Deuterované a tritiované přírodní látky představují v segmentu biochemického výzkumu nenahraditelnou skupinu látek.^{1,2} V kontextu základního výzkumu poskytuje aplikace značených sloučenin informace o funkci různých druhů enzymů a hormonů, usnadňuje identifikaci metabolitů a rovněž napomáhá při studiu strukturních a vazebných vlastností. Esenciální je jejich význam při biodistribučních studiích jak *in vitro* tak *in vivo*.

Deriváty kyseliny betulinové jsou v naší skupině studovány pro svou významnou cytotoxickou aktivitu³. V minulých letech byly v rámci této práce připraveny sloučeniny značené tritiem **I** (o specifické aktivitě 22 mCi/mmol) a deuteriem **II**, **III** a radiouhlikiem ¹⁴C (o specifické aktivitě 11 mCi/mmol) **IV**. V návaznosti na tento výzkum byly připraveny deuterované sloučeniny **V** a dusíkem ¹⁵N značené deriváty **VI** a **VII**.

Struktury všech připravených sloučenin byly potvrzeny spektrálními daty. Byly změřeny rovněž ³H NMR spektra tritiovaných sloučenin, ²H NMR spektra a ¹⁵N NMR spektra.



Činidla a rozpouštědla byla financována licenčním partnerem ViroChem Pharma, Inc., 275 Armand-Frappier Blvd. Laval, H7V 4A7 Québec Canada.

LITERATURA

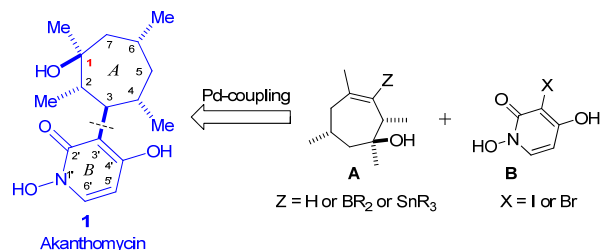
1. Tietze L. F. Heinzen H., Moyna P., Rischer M., Neunaber H.: *Liebigs Ann. Chem.* 1245-1249 (1991).
2. Wahhab A., Ottosen M., Bachelor F. W.: *Can. J. Chem.* 69, 570 (1991).
3. Šarek J., Klinot J., Dubák P., Klinotová E., Nosková V., Křeček V., Kořínková G., Thomson J. O., Janošťáková A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajdúch M.: *J. Med. Chem.* 46, 5402 (2003).

TOWARDS AKANTHOMYCIN: THE FIRST ENANTIOSELECTIVE SYNTHESIS IS UNDERWAY

SERSEY V. VOLKOV, TOMÁŠ MAŠEK, and ILYA M. LYAPKALO*

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic; Telephone: volkov@uochb.cas.cz

The project aims at developing first enantioselective total synthesis of *Akanthomycin* (**1**), a potent antibiotic compound active against *Staphylococcus aureus*, isolated from organic extracts of the entomopathogenic fungus *Akanthomyces gracilis* ARS 2910. The target compound belongs to the subfamily of 3 / 3,5-(di)substituted 1,4-dihydroxy-1*H*-pyridin-2-one natural products exhibiting wide range of bioactivities. Our synthetic plan suggests introduction of chirality into the alicyclic moiety *via* enantioselective desymmetrisation of prochiral 1,4,6-trimethylcyclohepta-1,3-diene by means of asymmetric mono-epoxidation hitherto unprecedented in the synthesis of natural products. *Akanthomycin* will be prepared by coupling of the heterocyclic and alicyclic units which will be assembled independently. Upon completion of the total synthesis, a modular approach towards variety of the substituted pyridin-2-ones will be attempted in order to create a focused library of potentially bioactive analogs.



Current progress in the synthesis of fragments A and B will be presented.

APLIKACE DIETHYLKARBONÁTU JAKO ALKYLAČNÍHO A DEHYDRATAČNÍHO ČINIDLA

TOMÁŠ WEIDLICH

Ústav ochrany životního prostředí, Fakulta chemicko-
technologická, UPce, TP Doubravice 41, 532 10 Pardubice
tomas.weidlich@upce.cz

Byly studovány reakce diethylkarbonátu (DEK) v prostředí *N,N*-dimethylacetamidu (DMA) s přidavkem fosforečnanu nebo uhličitanu draselného jako báze. Při reakci s fenoly vznikají odpovídající aryl ethylethery **I**, při reakci s aniliny se tvoří *N*-ethylaniliny **II** a reakcí s aromatickými aldehydy byly izolovány *N,N*-dimethylamidy skořicových kyselin **III** (Schéma 1).

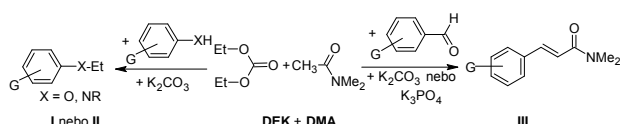


Schéma 1. Vznik produktů **I**, **II** a **III** působením DEK+DMA v přítomnosti báze.

Vznikající produkty **I-III** lze snadno izolovat z reakční směsi vakuovou destilací rozpouštědel (*N,N*-dimethylacetamidu a diethylkarbonátu), promytím vodou a rafinovat krystalizací z vhodného rozpouštědla nebo destilací s vodní parou¹. Oddestilovaný *N,N*-dimethylacetamid i diethylkarbonát lze bez problémů znovu použít, pro čištění vznikající odpadní vody byla použita Fentonova oxidace² a pro odstranění adsorbovatelných organických halogenderivátů redukce slitinou hliníku s niklem (Schéma 2).

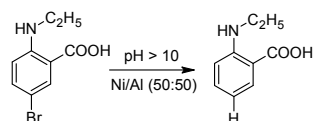


Schéma 2: Odstraňování AOX přítomných ve vodě ze zpracování reakční směsi.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 203/07/P248 a výzkumného záměru MŠMT MSM 0021627502.

LITERATURA

- Weidlich T., Pokorný M., Padělková Z., Růžička A.: Green Chem. Lett. Rev. 1, 53 (2008)
- Mijangos F, Varona F, Villota N.: Environ. Sci. Technol. 40, 5538, (2006).

STUDIUM INTERAKCÍ DERIVÁTŮ CUCURBITURILU S CALIXARENY

**MARKÉTA ZAJÍCOVÁ, JAN BUDKA, IVAN STIBOR
a PAVEL LHOTÁK**

Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28
Praha 6
zajicovm@vscht.cz.

Cucurbiturily jsou makrocyclické sloučeniny vyznačující se obvykle velmi nízkou rozpustností. Jednou z jejich typických vlastností je tvorba komplexů s aminy v kyselém prostředí.

Cílem práce je modifikovat skelet cucurbiturilu tak, aby byl lépe rozpustný v běžných rozpouštědlech¹ a zároveň připravit derivát calixarenu², který by mohl vytvářet komplex s cucurbiturilem.

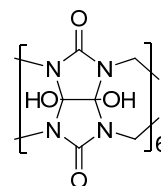


Schéma 1. Příklad modifikovaného cucurbiturilu

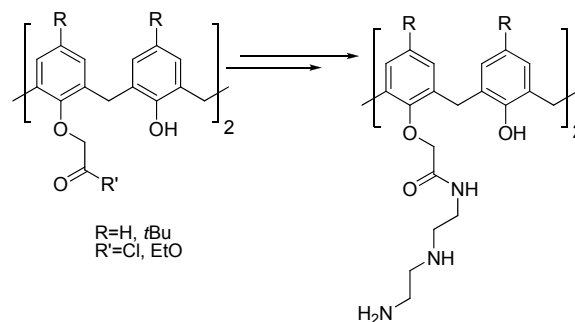


Schéma 2. Nástin syntézy derivátu calixarenu

Tento projekt je podporován MŠMT ČR (Centrum pro výzkum LC 06070 a COST D31 OC134)

LITERATURA

- Y. J., Lee J. W., Kim K.: J. Am. Chem. Soc. 125, 10186 (2003).
- Balász B., Tóth G., Horváth G., Grün A., Csokai V., Töke L., Bitter I.: Eur. J. Org. Chem. 1, 61 (2001)

AZAFTALOCYANINY JAKO ZHÁŠEČE FLUORESCENCE TYPU „DARK QUENCHER“

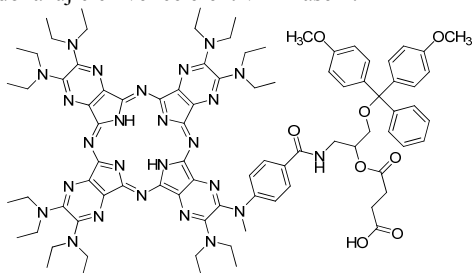
**PETR ZIMČÍK, KAMIL KOPECKÝ
a MIROSLAV MILETÍN**

*Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, Hradec Králové, 50005
petr.zimcik@faf.cuni.*

Fluorescenční značení je v současné době jednou z asi nejpoužívanějších metod určených k detekci biomolekul v biochemii. Při detekci i kvantifikaci DNA nebo RNA sekvencí se využívá často kombinace dvou barviv, z nichž jedno je silným fluoroforem a druhé zhášecem fluorescence. Pokud jsou obě barviva v dostatečné blízkosti, dochází ke zhášení fluorescence, v případě, že se od sebe oddálí, dojde k emisi světla použitým fluoroforem. Nabídka fluorescenčních barviv je velice široká, nabídka vhodných zhášeců již tak rozsáhlá není a pro fluorofory emitující při velmi vysokých vlnových délkách (přes 700 nm) prakticky zhášecí chybí. My jsme se zabývali syntézou a charakterizací úplně nového strukturního typu zhášeců ze skupiny azaftalocyaninů (AzaPc).

Tato skupina látek byla původně vyvíjena jako fotosensitizéry ve fotodynamické terapii (PDT). Při zkoumání vztahů mezi strukturou a účinkem jsme objevili látky naprosto nevhodné pro PDT, ale naopak s vlastnostmi ideálními pro použití jako zhášecí fluorescence (mají nulovou fluorescenci a produkci singletového kyslíku)¹. Tyto látky jsme dále zkoumali a připravili jsme vhodné deriváty, které po navázání na oligonukleotidickou sondu definované sekvence byly otestovány jako zhášecí s velmi dobrými výsledky, naprosto srovnatelnými s běžně používanými zhášecí. Výhodou nového strukturního typu látek je chemická stabilita a velká variabilita v rozsahu vlnových délek vhodných pro zhášení, pokrývající prakticky celou škálu dostupných fluoroforů.

V přednášce bude prezentován design a syntéza zhášecí (viz obr.) a výsledky biochemických testů po navázání na DNA sondu dokazujících velice efektivní zhášení.



Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK 41107/B/2007.

LITERATURA

- Zimcik P., Miletin M., Kostka M., Schwarz J., Musil Z., Kopecky K.: *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* 163, 21 (2004).

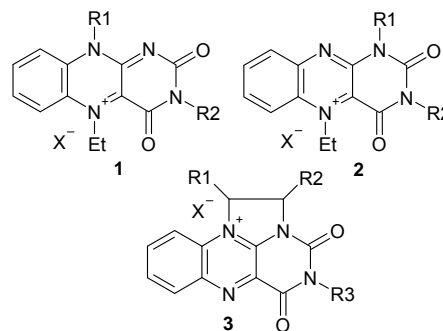
PŘÍPRAVA A VLASTNOSTI CHIRÁLNÍCH 1,10 PŘEMOSTĚNÝCH FLAVINIOVÝCH SOLÍ JAKO KATALYZÁTORŮ OXIDACE SULFIDŮ PEROXIDEM VODÍKU

JIŘÍ ŽUREK, RADEK CIBULKA a JIŘÍ SVOBODA

*Ústav organické chemie, VŠCHT, Technická 5, Praha 6, 16628
zurekj@vscht.cz*

Flaviniové soli nacházejí v poslední době široké uplatnění v oblasti organokatalýzy^{1,2}. Pozornost však byla doposud věnována výhradně 5-alkylflaviniovým solím **1** a **2**, které účinně katalyzují oxidace sulfidů na sulfoxidy, terciárních aminů na *N*-oxidy a Bayerovy-Villigerovy oxidace. Pro účely katalýzy oxidací peroxidem vodíku však nebyly nikdy testovány flaviniové soli **3** s kvarterním dusíkovým atomem v poloze 10-, který vzniká přemostěním polohy 1- a 10-ethylidenovou spojkou.

Cílem této práce bylo připravit sérii chirálních 1,10 přemostěných flaviniových solí **3** jako potenciálních katalyzátorů stereoselektivních sulfooxidací. Jako chirální synton byly použity chirální 2-aminoalkoholy, snadno dostupné z odpovídajících aminokyselin. V příspěvku bude dále diskutován katalytický účinek připravených solí **3** při oxidaci sulfidů peroxidem vodíku.



Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (projekt č. 203/07/1246).

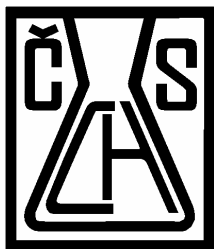
LITERATURA

- Gelalcha, F. G.: *Chem. Rev.* 2007, 3338.
- Bäckvall, J.-E. in: *Modern Oxidation Methods*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2004, pp. 193-222.

REJSTRÍK AUTORŮ

Aaron Jean-Jacques	1050	Hrabálek Alexandr	1060, 1066, 1078
Abdulmanea Khaled	1077	Hrubý Martin	1039
Adenier Alain	1050	Hudeček Oldřich	1040
Alexandrova Anastasia	1023	Husáková Petra	1063
Alexandrova Anastasia V.	1023	Hybelbauerová Simona	1040
Auerová Kateřina	1029	Hývl Jakub	1041
Balentová Eva	1042	Chane-Ching Kathleen	1050
Bednaříková Tereza	1024	Chodounská Hana	1030
Beier Petr	1023	Chytilová Eliška	1041
Beneš Ludvík	1072	Imramovský Aleš	1041
Beran Antonín	1024	Imrich Ján	1033, 1042, 1074
Betik Robert	1025	Jahn Ullrich	1042, 1047, 1053
Biedermann D.	1025	Jambal Irekhjargal	1057
Bílá Alexandra	1027	Jampílek Josef	1041
Bláhová Markéta	1026	Janata Miroslav	1065
Böhm Stanislav	1052	Janková Štěpánka	1043
Bříza Tomáš	1026	Janovec Ladislav	1042
Buděšínský Miloš	1076	Jílek Petr	1054
Budka Jan	1027, 1032, 1040, 1052, 1062, 1080	Jindřich Jindřich	1024, 1031, 1036, 1068
Budková Markéta	1062	Jiroš Pavel	1076
Budovská Mariana	1027	Jonsztová Beata	1043
Buchlovič Marian	1028	Jurok Radek	1044
Buchta Michal	1028	Kadlčíková Aneta	1044
Buchta Vladimír	1061, 1069	Kafka František	1045
Cahlíková Lucie	1029	Kaleta Jiří	1045
Cibulka Radek	1044, 1045, 1049, 1056, 1081	Kaminský Jakub	1075
Císařová Ivana	1052	Karban Jindřich	1046
Cordova Armando	1078	Kaustová Jarmila	1036, 1061, 1063
Čermák Jan	1029	Kavanagh Yvonne	1047
Černý Ivan	1030	Keder Roman	1047
Čikošová Miroslava	1056	Kefurt Karel	1057
Čurillová Zuzana	1027, 1030, 1069	Kelbichová Vendula	1071
Danihel Ivan	1033, 1074	Klečka Martin	1051
Dinca Emanuela	1042	Klika Karel D.	1042
Diviš Martin	1031	Klimešová Věra	1036
Divišová Hana	1063	Klouček Pavel	1076
Drabina Pavel	1031, 1062, 1069	Koblovská Radka	1041
Drašar Pavel	1043, 1058, 1059, 1074	Kohout Ladislav	1037
Ducrocq Laudine	1032	Kohout Michal	1047, 1064, 1068, 1070
Dvořák Dalimil	1047, 1051	Kokoška Ladislav	1065, 1076
Dvořáková Hana	1052	Koňák Čestmír	1039
Dybal Jiří	1065	Kopecný Kamil	1046, 1058, 1081
Eigner Václav	1027	Korotvička Aleš	1048
Eignerová Barbara	1068	Kostečková Alena	1056
Elbert T.	1079	Kotora Martin	1025, 1036, 1043, 1044, 1048, 1057, 1060, 1061, 1068, 1075
Emelin Evghenia	1061	Kotoučová Hana	1049
Flídrová Karolína	1032	Koutek Bohumír	1040
Formánková Jana	1056	Kováříček Petr	1050
Fraňková Veronika	1032	Kovářová Anna	1049, 1064, 1068, 1070
Fröhlichová Zdenka	1033, 1074	Kozmik Václav	1050, 1064, 1068, 1070
Funk Petr	1031	Kristian Pavol	1033, 1074
Glogarová Milada	1034, 1047, 1049, 1064, 1068, 1070	Kroutil Jiří	1046
Gorecka Ewa	1049	Kroupa Jan	1052
Griffith Daniel	1042	Krouželka Jan	1051
Guenther Katrin	1057	Krupková Alena	1029
Hajdúch M.	1025, 1079	Kříž Jaroslav	1065
Hájíček Josef	1033	Křováček Martin	1051
Hámpl František	1034	Kubicová Lenka	1054
Hanusek Jiří	1034, 1077	Kučka Jan	1039
Havlík Jaroslav	1076	Kulová Kateřina	1057
Hejtmánková Ludmila	1035	Kundrát Ondřej	1032, 1040, 1052
Henke Adam	1035, 1070	Kuneš Jiří	1070, 1071
Herzigová Petra	1036	Kunetskiy Roman A.	1053
Hezký Petr	1036	Kurfürst Milan	1029
Hidasová Denisa	1036	Kutschy Peter	1027, 1030, 1065, 1069
Himl Michal	1032	Kvíčala Jaroslav	1032, 1038, 1052, 1061, 1063, 1071
Hnilíčková Jaroslava	1037	Kysilka Ondřej	1063
Hocek Michal	1037	Lanková Petra	1065, 1077
Holakovský Roman	1050	Lapčík Oldřich	1041, 1065, 1077
Holan Martin	1038	Látalová Petra	1065
Holý Petr	1028		

Lau Tanja	1053	Rýček Lukáš	1054
Lebeda Ondřej	1039	Řehová Lucie	1068
Ledvina Miroslav	1043	Řezanka Michal	1068
Lhoták P.	1064	Sabolová Danica	1033
Lhoták Pavel	1027, 1032, 1040, 1052, 1062, 1080	Salamonczyk Mirek	1049
Linhart Igor	1051	Salayová Aneta	1069
Lo Ch.	1050	Sedlák Miloš	1031, 1054, 1062, 1069, 1077
Lustig Petr	1035	Seidler Arnošt	1070
Lyapkalo Ilya M.	1053, 1079	Setnička Vladimír	1059
Macháček Miloš	1054	Shankaran Prakash	1061
Macháček Vladimír	1073	Schindler Martin	1032
Machara Aleš	1072	Schraml Jan	1029
Malanik Viktor	1056	Sillingová Simona	1057
Malík Jan	1076	Simanova M.	1064
Man Stanislav	1028, 1054	Skalický Martin	1032, 1038, 1052, 1063, 1071
Martínek Marek	1055	Spáčilová P.	1025
Mašek Tomáš	1079	Spišáková Martina	1061
Matoušová Eliška	1055	Steigerová Jana	1037
Maurel Francois	1050	Stibor Ivan	1027, 1032, 1052, 1062, 1080
Mazal Ctibor	1045	Strašák Tomáš	1029
Melánová Klára	1072	Svoboda Jan	1072
Mělková Zora	1061	Svoboda Jiří	1034, 1047, 1049, 1050, 1064, 1068, 1070, 1072, 1081
Ménová Petra	1056	Svobodová Markéta	1073
Mezencev Roman	1066	Sýkora Andrej	1030
Mézlová Marie	1056	Sýkora Lukáš	1036
Michl Josef	1045	Šamal Michal	1034
Miletín Miroslav	1046, 1058, 1081	Šarek J.	1025, 1079
Mojžiš Ján	1030, 1066, 1069	Šembera Filip	1027
Monreal Ferriz Juana	1041	Šenel Petr	1070
Monti Donato	1059, 1074	Šigut Kryštof	1038
Moravcová Jitka	1057	Šimák Ondřej	1074
Motyčka Jan	1027	Šimůnek Petr	1069, 1070
Nečas David	1036, 1057, 1060	Šnajdr Ivan	1071
Nguyen Huong Thi Thu	1058	Špulák Marcel	1070, 1071
Novák Vít	1059	Šrogl Jiří	1035, 1041, 1055
Nováková Veronika	1046, 1058	Šťastná Eva	1030
Nováková Zdena	1043, 1059	Tenora Lukáš	1054
Novotná Vladimíra	1034, 1047, 1049, 1064, 1068, 1070	Tichotová Lucie	1071
Novotný Jakub	1078	Tobrman Tomáš	1051
Michal Novotný	1060	Tomaščíková Jana	1033, 1074
Oklešťková Jana	1037	Tomčáková Kateřina	1075
Opekar Stanislav	1061	Török Marcel	1027
Opletal Lubomír	1029	Turek Pavel	1075
Paleta Oldřich	1061	Ulbrich Karel	1039
Pálková Romana	1062	Urbanová Marie	1059
Panov Illia	1062	Valášek Michal	1032
Paterová Jana	1063	Valterová Irena	1076
Pavlíček Ondřej	1029	Váňa Jiří	1077
Pavlík Jan	1071	Vaničková Lucie	1077
Petrlíková Eva	1030, 1066, 1069	Vašíčková Soňa	1076
Pilátová Martina	1030, 1066, 1069	Vávrová Kateřina	1060, 1078
Pociecha Damian	1049	Véghová Ivana	1069
Pohl Radek	1023	Vejsová Marcela	1054
Pojarová Michaela	1027, 1052	Ventura Karel	1054
Polášek Petr	1064	Veselý Jan	1075
Polivkova K.	1064	Veselý Martin	1068
Pomeisl Karel	1061	Vetrik Miroslav	1039
Pospěchová Kateřina	1078	Vilková Mária	1042
Potáček Milan	1028, 1054	Vinšová Jarmila	1041
Pour Milan	1055, 1070, 1071	Vlček Petr	1065
Pouzar Vladimír	1030	Vlk M.	1079
Prokudina Elena A.	1041, 1065, 1077	Volkov Sersgey V.	1079
Raich Ivan	1059, 1075	Vopálenský Václav	1026
Raus Vladimír	1065	Waisser Karel	1063
Repovská Mária	1066	Weidlich Tomáš	1080
Röbstecková Michaela	1062	Zajícová Markéta	1080
Ročková Dagmar	1058	Zelený Václav	1076, 1077
Roh Jaroslav	1066	Zima Vitězslav	1072
Růžička Aleš	1031, 1067	Zimčík Petr	1046, 1058, 1081
Rybáček Jiří	1028	Žurek Jiří	1081
Rybáčková Markéta	1032, 1038, 1052, 1063, 1071		



Česká společnost chemická
Sekretariát a redakce Chemických listů
Novotného lávka 5
116 68 Praha 1
tel./fax: 222 220 184, redakce tel. 222 221 778
e-mail: chem.spol@csvts.cz
<http://www.csch.cz>

Proč se stát členem České společnosti chemické

Zapojení v České společnosti chemické, členu Asociace českých chemických společností, přináší individuálním chemikům kromě vlastního členství v největší a nejstarší profesní organizaci chemiků:

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCH,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění...
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCH,
- možnost dostávat 4× ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů,
- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- možnost objednání „osobního balíku předplatného“ Chemických listů a časopisů konsorcia EUChemSoc,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě, informace o dění v evropských chemických strukturách
- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu Eurchem, platného v celé EU,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.),
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCH,
- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- vedle individuálního členství je možné kolektivní členství firem,
- a řadu dalších služeb.

Jak se stát členem ČSCH

Členská přihláška je k dispozici na internetových stránkách ČSCH nebo na sekretariátu ČSCH. Členství je přístupné pro všechny zájemce o chemii a přijetí nového člena doporučí dva členové ČSCH (doporučení je možné nahradit odborných životopisem), členství nabývá platnosti po schválení hlavním výborem ČSCH.

Výši členských příspěvků a možné slevy schvaluje na návrh předsednictva hlavní výbor ČSCH.

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	955	EDITORIAL	955
ZAHRADA		GARDEN	
Současné trendy hmotnostní spektrometrie	957	Recent Trends in Mass Spectrometry	957
V. Vidová, K. Lemr a V. Havlíček		V. Vidová, K. Lemr, and V. Havlíček	
Metagenom – bohatý zdroj nových biomolekul	960	Metagenome – a Rich Source of Novel Biomolecules	960
P. Kotrba, O. Uhlík, K. Ječná, M. Macková a T. Macek		P. Kotrba, O. Uhlík, K. Ječná, M. Macková, and T. Macek	
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Možnosti využití hmotnostní spektrometrie při analýze ropných vzorků	969	Mass Spectrometry in Analysis of Petroleum	969
J. Chudoba a G. Šebor		J. Chudoba and G. Šebor	
Principy a využití kometové analýzy při detekci poškození DNA	977	Principles and Applications of the Comet Assay in Detection of DNA Damage	977
M. Dvořák a M. Matejovičová		M. Dvořák and M. Matejovičová	
Současný stav a perspektivy využití rostlinných olejů	984	Current State and Prospects of Utilization of Vegetable Oils	984
J. Šmidrkal, V. Filip, Z. Bělohav, P. Zámstný a V. Hönig		J. Šmidrkal, V. Filip, Z. Bělohav, P. Zámstný, and V. Hönig	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Studium syntézy 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorthymidinu – perspektivního radiofarmaka pro pozitronovou emisní tomografii	992	Study of Synthesis of 3'-Deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine – Prospective Radiopharmaceutical in Positron Emission Tomography	992
L. Procházka, M. Kropáček, M. Mirzajevová, J. Zimová, M. Försterová, H. Švecová a F. Melichar		L. Procházka, M. Kropáček, M. Mirzajevová, J. Zimová, M. Försterová, H. Švecová, and F. Melichar	
Automatizované stanovení protilátek proti cyklickému citrulinovenému peptidu na analyzátoru AxSYM	997	Automated Determination of Citrullinated Cyclic Peptide Antibodies on AxSYM Analyser	997
R. Pikner, D. Suchý, J. Zítková, H. Brabcová, M. Beranová a S. Kormunda		R. Pikner, D. Suchý, J. Zítková, H. Brabcová, M. Beranová, and S. Kormunda	
Přestup polycyklických aromatických uhlovodíků z půdy do vybraných rostlin	1003	Transfer of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soil into Selected Plants	1003
R. Vácha, J. Čechmánková, M. Havelková a V. Horváthová		R. Vácha, J. Čechmánková, M. Havelková, and V. Horváthová	
BECARIO		BECARIO	
Luminiscence v běžném životě i v laboratoři	1012	Luminescence in Everyday Life and in Laboratory	1012
J. Krist, F. Géla, F. Fronček a M. Kubala		J. Krist, F. Géla, F. Fronček, and M. Kubala	
Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií	1017	Chemiluminescence of Luminol and Its Synthesis from Easily Available Chemicals	1017
D. Šimsa a J. Skopal		D. Šimsa and J. Skopal	
LIBLICE 2008	1021	LIBLICE 2008	1021

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 102 (2008), čís./no. 11 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 132, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 118 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámotný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvicka (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Generála Svobody 335, 533 51 Pardubice - Rosice nad Labem; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2008 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 153 Kč, roční plné předplatné 2008 (12 čísel) 1570 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 785 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 83 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 63 EUR (doručování via SCHS), 234 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2008 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: M. Pojarová • Dáno do tisku 30.10.2008.