

## Vývoj společenského vnímání rizika spojeného s existencí chemických výroben v okolí bydliště a jeho důsledky na vývoj chemického průmyslu

Z rozboru odborné literatury plyne, že citlivosti veřejnosti k vnímání rizika spojeného s existencí chemického výrobního podniku v blízkosti jejich bydliště nebo města se stále vyvíjí, a že tento vývoj má ve světě společné rysy. Vývoj postojů obyvatel k provozu chemických výroben souvisí s ekonomickou úrovní regionu, s jeho historií i perspektivou jeho vývoje. Moderní společnost neodmítá chemické produkty, používá je bez zábrán a dokonce bez nich není schopná existence, ale, podle stupně vývoje, někdy protestuje proti existenci výroben chemického průmyslu, které tyto produkty vyrábějí. Protest má různé úrovně a různé důvody.

**Regiony s nízkou ekonomickou úrovní.** Obyvatelé těchto regionů jsou rádi, že mají v regionu podnik, který poskytuje příležitost k zaměstnání a přináší do regionů finanční prostředky. Proti přítomnosti chemického podniku neprotestují a přijmou bez zábrán zaměstnání v chemickém podniku, protože jinou možnost výhodného zaměstnání často nemají. Snášejí bez výrazných protestů důsledky existence chemického podniku, například noční hluk čerpadel a jiných zařízení. Obyvatelé jsou schopni i tolerovat znečištění ovzduší a vod či skládky odpadu. Problém analýzy rizika havárie chemické výroby v těchto regionech je samozřejmě významný pro výrobce, protože každá havárie představuje významnou ekonomickou ztrátu. Výrobce však není vystaven tlaku obyvatel v okolí na zrušení nebo zásadní omezení výroby.

**Regiony s vysokou ekonomickou úrovní.** Obyvatelé těchto regionů mají často zajištěnou životní existenci nezávislou na chemické výrobě. Výrobky chemického průmyslu samozřejmě používají a jejich dostupnost na trhu berou jako samozřejmost. Obyvatelé těchto regionů ale někdy vnímají riziko přítomnosti chemického podniku v jejich regionu jako nežádoucí riziko v jejich okolí, které by bylo účelné odstranit. Chemický podnik může obtěžovat okolí, např. hlukem čerpadel v noční době. Obyvatelé těchto regionů chtějí chemické výrobky používat, jen by chtěli, aby byly vyráběny někde jinde, než v jejich okolí. Přítomnost chemické výroby v okolí často ovlivňuje cenu stavebních pozemků a cenu domů a bytů.

**Intuitivní pojmání rizika veřejností v okolí výroby.** Obecně je možné konstatovat, že pojmání rizika obecně je intuitivní, nikoliv racionální myšlenkový proces. To komplikuje řešení vztahu výroben chemického průmyslu k obyvatelům v okolí. Je to ale obecný jev související s vnímáním rizika, který má tyto rysy.

**Přeceňování důsledků „velkých“ havárií bez přihlédnutí k pravděpodobné frekvenci jejich výskytu.** Veřejnost je při hodnocení rizika ovlivněna hlavně celkovými důsledky jedné havárie, ale nebere v úvahu frekvenci výskytu havárie. Klasickým příkladem jsou havárie letadel.

Veřejnost vnímá jako vysoce tragickou havárii letadla, kdy zahyne najednou několik desítek osob. Na veřejnost působí emočně zpráva i zpráva o havárii autobusu. Na straně druhé je společnost chladná k zabítí vyššího počtu osob na silnicích při běžných haváriích, kde jsou osoby zabíjeny po dvou nebo po třech. Tento subjektivní rys vnímání rizika vede někdy k vytváření představy katastrofických, ale nepravděpodobných scénářů v chemickém průmyslu, např. představy vytvoření velkého hořlavého oblaku, který je schopen při výbuchu zabít stovky nebo tisíce lidí. Statistiky výbuchů hořlavého oblaku však dokazují, že tyto scénáře jsou vysoce nepravděpodobné, ale mohou obyvatele znepokojovat.

**Smíření s rizikem již zavedených procesů, ale omezená tolerance k výstavbě procesů nových.** Obyvatelé v okolí chemických výroben jsou často smířeni s existencí procesů již v chemické výrobě zavedených, ale odmítají přijmout rizika nová, např. protestují proti výstavbě nového provozu či zásadní rekonstrukci provozu.

**Úloha názvu zařízení.** Obyvatelé v okolí chemické výroby často nemají představu o rizicích daného procesu pro obyvatele v okolí. Jako příklad bych uvedl protest proti výstavbě řízené ekologické spalovny nebezpečných odpadů, přesto, že výstavba nové spalovny s řízeným režimem spalování snižuje riziko pro okolí a představuje pokrok v ochraně životního prostředí, obyvatelé protestují proti výstavbě. Důvodem je název a neznalost funkce a kontroly zařízení.

**Protest proti riziku chemické výroby jako zajímavá životní role.** V současné společnosti není jednoduché najít svoji životní roli a není jednoduché se smířit s tím, že daný jedinec je standardní součástí lidské společnosti. Účast v protestních akcích, například v akci „zavřete chemický podnik, protože je zdrojem rizika a přestěhujte jej někam jinam“ může být základem nestandardní role jedince v lidské společnosti, která mu poskytuje pocit osobní realizace a výjimečnosti. Úspěšné plnění této role by však vyžadovalo i odpovídající úroveň technického vzdělání. Aktivisté skupin zaměřených na snižování rizika havárií v chemickém průmyslu jej však vždy nemají.

**Závěr.** Protesty proti riziku výroby chemických látek v regionech s vysokou ekonomickou úrovní, což je i Česká republika, vedou někdy k tomu, že jsou některé výroby uzavřeny a produkty jsou nakupovány v regionech s nižší ekonomickou úrovní, kde se výrobci nemusí obávat protestů obyvatel.

Necítím se způsobilý hodnotit, zda je to pozitivní nebo negativní důsledek vývoje. Avšak chemický průmysl, ale i regiony, výrobci i obyvatelé, kde jsou chemické výroby, musí s touto skutečností počítat a nějak se s ní vyrovnat.

Jozef Horák

## POKROKY VE VÝVOJI ANTITUBERKULOTIK PŮSOBÍCÍCH NA MULTILÉKOVĚ REZISTENTNÍ KMENY

MARTIN KRÁTKÝ a JARMILA VINŠOVÁ

Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05  
Hradec Králové  
jarmila.vinsova@faf.cuni.cz

Došlo 24.6.09, přepracováno 15.3.10, přijato 1.4.10.

Klíčová slova: tuberkulóza, antituberkulotika, nové směry ve vývoji léčiv, cílení

### Obsah

1. Úvod
2. Výzkum nových léčiv působících vůči MDR-TB kmenům
  - 2.1. Modifikace struktur používaných léčiv
  - 2.2. Sloučeniny v preklinickém a klinickém stádiu vývoje, tzv. „leads“
  - 2.3. Výzkum v oblasti nových cílových struktur pro aktivní molekuly
    - 2.3.1. Biosyntéza buněčné stěny
    - 2.3.2. Isocitrát lyasové cílení
    - 2.3.3. Cílení na FtsZ protein
    - 2.3.4. Další možné cíle zásahu mykobakterií
3. Závěr

### 1. Úvod

Tuberkulóza (TB) je infekční onemocnění vyvolané kmeny komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, které se šíří kapěnkovou nákazou. V poslední době se dramaticky rozšířila epidemiologicky velmi závažná multilékově rezistentní tuberkulóza (multidrug-resistant tuberculosis; MDR-TB), odolná vůči dvěma nejúčinnějším antituberkulotikům první linie isoniazidu (INH) a rifampicinu (RIF)<sup>1</sup>. Od roku 2006 je nově užíván termín extenzivně rezistentní tuberkulóza XDR-TB (extremely/extensively drug-resistant tuberculosis) rezistentní navíc vůči jakémukoli fluorochinolonu a nejméně jednomu z injekčních léčiv druhé volby – amikacinu, kapeomycinu a kanamycinu<sup>2</sup>. XDR-TB je bohužel často neléčitelná, problematická je i koincidence tuberkulózy s HIV infekcí. Rezistentní formy tuberkulózy byly zaznamenány ve více než 45 zemích světa, její rozšíření je kritické především ve východní Evropě, střední Asii a v Africe.

Obecný mechanismus vzniku rezistence spočívá např. v modifikaci cílových míst, jejich nadprodukci, změně farmakokinetice či metabolizaci léčiv. U mykobakterií představuje vysoce lipofilní buněčná stěna významnou bariéru pro transport aktivních molekul a může tak přispí-

vat ke snížené citlivosti. Rezistence na léky proti TB vychází ze selekce přirozeně se vyskytujících mutantů s vrozenou odolností. Částečné potlačení bakteriálního bujení a vznik rezistentních organismů může vyplynout z nedbalého dodržování terapeutického režimu, nevhodné preskripce, interakcí či nedostatečného vstřebávání léčiv. Hrozbou pro budoucnost se stávají latentní neboli spící kmeny, které jsou rezervoárem pro propuknutí onemocnění v případě snížení imunity organismu<sup>3</sup>.

Léčba MDR-TB je stálou výzvou a zahrnuje tři hlavní oblasti zkoumání:

- a) Nové látky přinášející zkrácení doby léčby TB ze současných 6–9 měsíců na dva nebo méně; zejména jsou žádány sloučeniny se sterilizujícími účinky vůči mykobakteriím.
- b) Vývoj molekul s novým mechanismem účinku bez zkřížené rezistence s užívanými léčivy.
- c) Vývoj nových léčiv zlepšujících léčbu latentní infekce.

### 2. Výzkum nových léčiv působících vůči MDR-TB kmenům

Směry současného výzkumu zahrnují přípravu a testování zcela nových struktur, modifikace známých molekul, zkoumání přírodních látek, kombinace léčiv za účelem zkrácení doby léčení, vývoj nových lékových forem s postupným uvolňováním aktivní látky, což umožní snížení frekvence podávání nebo i velikosti dávek<sup>3</sup>. Velmi aktuální je výzkum v oblasti tzv. cílení (angl. targeting), tj. hledání potenciálních molekulárních cílů, zejména enzymů. Vedle chemoterapie nabízí také nové možnosti imunoterapie, např. DNA vakcíny nebo využití cytokinů<sup>4</sup>.

Současné trendy směřují především k syntéze malých molekul s nízkou minimální inhibiční koncentrací (MIC), fyzikálně-chemickými parametry v požadovaném rozmezí (např. podle Lipinského pravidla pěti) a optimálním toxikologickým profilem vyjádřeným indexem selektivity (SI)<sup>5</sup>.

#### 2.1. Modifikace struktur používaných léčiv

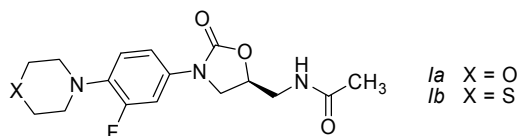
Nejstarším přístupem jsou modifikace struktur kliniky užívaných léčiv, především isoniazidu, thioamidů, rifampicinu, pyrazinamidu (PZA), ethambutolu (EMB) a skupiny chinolonů. Zejména nové chinolony jsou velmi perspektivní<sup>3</sup>. Tato kapitola je pro svůj rozsah přesunuta do suplementu přístupného na webových stránkách Chemických listů.

#### 2.2. Struktury v preklinickém a klinickém stádiu vývoje, tzv. „leads“

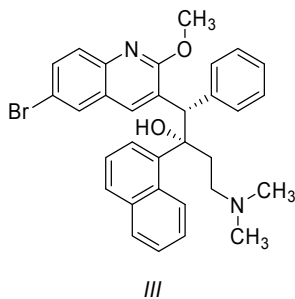
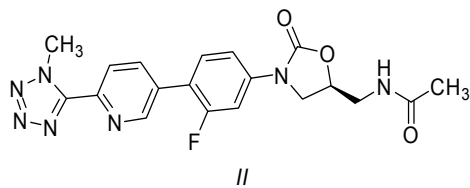
Do této skupiny jsme zařadili sloučeniny nacházející se v literatuře pod různými názvy a zkratkami – linezolid,

TMC207, PA-824, OPC-67683, SQ109, FAS20013, LL-3858 a BM212.

Linezolid (*Ia*), jenž patří do skupiny oxazolidinonů<sup>6</sup>, se používá pro léčbu infekcí způsobených multirezistentními bakteriemi včetně streptokoků a methicillin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA). Firma Pfizer ho uvedla na trh i do ČR pod názvem Zyvoxid. Linezolid byl použit pro léčbu tuberkulózy v dávce 600 mg jednou až dvakrát denně s dobrým účinkem. Zasahuje do syntézy mikrobiálních proteinů, cíleně inaktivuje 30S nebo 70S ribosomální komplex<sup>3</sup>. Jeho thiomorfolinový analog PNU-100480 (*Ib*) vykázal vysokou aktivitu vůči rezistentním kmenům *M. tbc.* (MIC  $\leq$  0,5–4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Je dobře absorbován a tolerován u zvířecích modelů<sup>7</sup>.



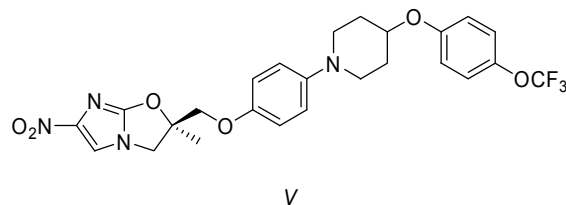
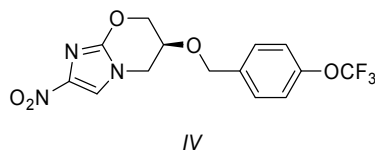
Novým oxazolidinonem obohaceným o tetrazol je DA-7867 (*II*). *In vitro* je účinnější než linezolid, MIC se pohybuje v rozmezí 0,03–0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>8</sup>). Přestože si jsou obě sloučeniny strukturálně velmi podobné, liší se ve farmakokinetice. Plazmatická hladina linezolidu je u myši po 4 hodinách oproti DA-7867 velmi nízká, čímž může být vysvětlována jeho nižší aktivita.



TMC207 (dříve R207910; *III*) je diarylchinolin firmy Johnson & Johnson. Má výhodné vlastnosti, zejména vysokou aktivitu vůči senzitivním i rezistentním TB kmenům v koncentraci od 0,03  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , dlouhý biologický poločas dovolující podávání jednou týdně, neinteraguje s ostatními antituberkulotiky<sup>9</sup> a nemá zkříženou rezistenci s léky první linie. Použití samotného TMC207 je stejně účinné jako kombinace RIF, INH a PZA. Byla pozorována synergická aktivita s dalšími antituberkulotiky. Unikátní mechanismus působení – inhibice mykobakteriální membránově vázané ATP-synthasy – nabízí velký potenciál, protože se tyto enzymy u člověka značně liší od mykobakteriálních. Vykazuje zcela jedinečnou duální aktivitu jak vůči spícím, tak

vůči replikujícím se subpopulacím, čímž se liší od běžných antituberkulotik. Jedná se o jednoho z nejslibnějších kandidátů za posledních 30 let (cit.<sup>3</sup>).

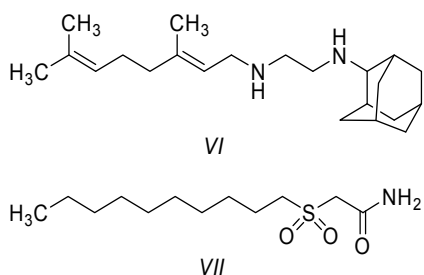
Další sloučeninou, která se nachází ve II. fázi preklinického zkoušení, je bicycklý nitroimidazopyranový derivát, nitroimidazo[2,1-*b*]oxazin (PA-824; *IV*), působící na replikující se i nereplikující se mykobakterie<sup>10</sup>. PA-824 způsobuje hromadění hydroxymykolových kyselin inhibicí enzymů, které je oxidují na ketomykoláty. Je stejně aktivní na mono- i multirezistentní kmeny *M. tbc.* v koncentracích 0,015–0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , nevykazuje zkříženou rezistenci s běžnými antituberkulotiky<sup>11</sup>. Působí synergicky s RIF a chinolony, v kombinaci oddaluje vznik rezistentních mutantů. Oproti běžným antituberkulotikům ukázal vysokou baktericidní aktivitu proti všem MDR i latentním kmenům.



V druhé fázi klinického zkoušení je také látka OPC-67683 (*V*). Má 6–7 krát vyšší aktivitu než běžně užívaná antituberkulotika, její MIC proti *M. tbc.* je 0,006–0,024  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , vykazuje vynikající *in vitro* aktivitu vůči rezistentním a senzitivním TB kmenům a nemá zkříženou rezistenci s antituberkulotiky první linie<sup>12</sup>. Díky dlouhému biologickému poločas, chybějící metabolizaci enzymy CYP a účinnosti i u imunokompromitovaných myši by mohl být používán při léčbě HIV pozitivních pacientů infikovaných současně tuberkulózou. Již při nízkých koncentracích působí inhibicí syntézy methoxymykolových a ketomykolových kyselin. Stejně jako PA-824 patří OPC-67683 mezi proléčiva, je metabolizován na denitroderivát. Obě uvedené sloučeniny mají hydrofobní charakter, což může vést k problémům biodostupnosti<sup>3</sup>.

Syntéza a screening knihovny analogů ethambutolu obsahujících ethylendiaminový farmakofor přinesly objev *N*-geranyl-*N'*-(adamantan-2-yl)ethan-1,2-diaminu (SQ109; *VI*) vykazujícího vynikající *in vitro* aktivitu proti *M. tbc.* (MIC 0,16–0,64  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) včetně EMB, INH a RIF rezistentních kmenů. SQ109 je jako proléčivo rychle metabolizován v játrech<sup>13</sup>. Přesný mechanismus účinku není znám, ale předpokládá se, že zasahuje do biosyntézy buněčné stěny, a to jiným způsobem než ethambutol. V kombinaci s RIF a INH vykazuje *in vitro* synergickou aktivitu, kombinace se STM a hraničně i s EMB má aditivní účinky. V porovnání s EMB má 14–35 krát vyšší aktivitu.

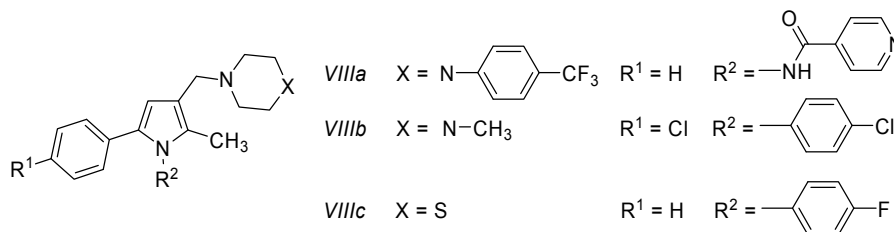
Sulfonylacetamidový analog  $\beta$ -ketoacyl synthasy FAS20013 (*VII*) vykazuje aktivitu v koncentracích 0,75 až



1,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Pravděpodobně interferuje se syntézou ATP a důležitými kroky energetických metabolických drah, navíc inhibuje biosyntézu mykolových kyselin. Je charakterizován jako ideální antituberkulotikum, působí baktericidně na pomalu rostoucí mykobakterie, nikoli na nepatogenní organismy. U klinických izolátů nebyla nalezena rezistence ani po několikanásobných pokusech ji indukovat. Působí velmi rychle, za 4 hodiny expozice usmrtí více organismů než INH či RIF za 12 až 14 dní. V krátkodobém horizontu je velmi účinný vůči kmenům rezistentním na většinu používaných antituberkulotik. Laboratorní pokusy naznačují vynikající schopnost sterilizovat TB léze a vymýtit latentní infekci vyskytující se u jedné třetiny světové populace. Terapeutické hodnocení na modelu TB infekce u myši opakovaně ukázalo jeho účinnost bez nežádoucích vedlejších účinků. Sloučenina je téměř ze 100 % orálně biodostupná a doposud nebyla zaznamenána její toxicita, i když byly podávány až desetinásobky účinné dávky<sup>14,15</sup>.

Pyrol LL-3858 (Sudoterb; *VIIIa*)<sup>16</sup> je nyní ve fázi II. klinických zkoušek v Lupin Ltd. Sloučenina patří do skupiny rostlinných alkaloidů a obsahuje isoniazidovou část. Stejně jako INH má baktericidní *in vitro* aktivitu v rozmezí MIC 0,025–0,12  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , působí synergicky s RIF. Kombinace s INH, RIF a PZA vedla u myši ke kompletní sterilizaci senzitivních i MDR kmenů během dvou měsíců, spolu s RIF a PZA vyléčil TB u všech druhů zvířat za tři měsíce. Sloučenina vykazuje dobrou biodostupnost a dávkování postačuje jednou denně.

Italští autoři objevili skupinu pyrrolových derivátů, z nichž nejvyšší aktivitu proti rezistentním i latentním kmenům mykobakterií vykazala sloučenina označená BM212 (*VIIIb*). Její MIC se pohybuje v rozmezí 0,7–1,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>17</sup>). Strukturální obměny vedly k thiomorfolinovému analogu *VIIIc* s nižší toxicitou a vyšší aktivitou (MIC 0,4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )<sup>18</sup>.



### 2.3. Výzkum v oblasti nových cílových struktur pro aktivní molekuly

V posledních letech je ve výzkumu nových léčiv kladen největší důraz na zásah do působení enzymů esenciálních pro životaschopnost mykobakterií. Cílová místa nových antituberkulotik zahrnují syntézu DNA, RNA, buněčné stěny či dráhy energetického metabolismu.

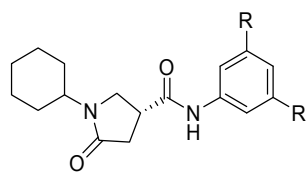
#### 2.3.1. Biosyntéza buněčné stěny

Vysoce lipofilní mykobakteriální buněčná stěna má zcela specifické složení, proto je atraktivním místem působení nových molekul. Tvoří ji tři hlavní složky – peptidoglykan, arabinogalaktan a mykolové kyseliny.

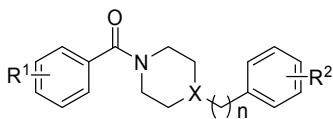
#### Inhibitory syntézy mykolových kyselin

Oproti většině organismů mají mykobakterie dva enzymatické systémy syntetizující mastné kyseliny, syntasy mastných kyselin I a II (FAS I a II). FAS I bimodálně produkuje nasycené mastné kyseliny – palmitovou a tetrakosanovou, kdežto FAS II, složený z řady nezávislých enzymů (včetně *InhA*) a vyžadující pro svou činnost acyl carrier protein (ACP), je zodpovědný za syntézu mykolových kyselin<sup>19</sup>.

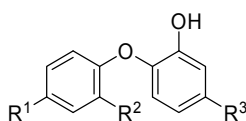
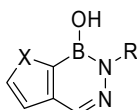
*InhA*, enoyl-ACP reductasa, je klíčovým enzymem biosyntézy mykolových kyselin a je jednou ze složek FAS II. Na *InhA* působí isoniazid, vývoj však směřuje k hledání takových molekul, které inhibují *InhA* přímo, bez nutné předchozí aktivace enzymem *KatG*, čímž dojde k překonání mechanismu rezistence vůči INH. Jednou z takovýchto skupin jsou substituované pyrrolidin-3-karboxamidy (*IX*), z nichž se vysoce aktivními jevíly sloučeniny s elektronegativní substitucí v *meta*-poloze benzenového jádra<sup>20</sup>. Dalšími přímými inhibitory jsou piperazinové a piperidinové amidy (*X*), z nichž je nejúčinnější [4-(3-chlorfenyl)piperazin-1-yl](2,4-dimethylfenyl)methanon<sup>21</sup>. Ukázalo se také, že antiseptikum triklosan (*XIa*) působí inhibičně na FAS II systém. MIC<sub>99</sub> triklosanu je 12,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (*M. tbc.* H<sub>37</sub>Rv), u analogických difenyletherů substituovaných v poloze 5 ethylem či pentylem (*XIb*) tato hodnota klesá na 3,8, resp. 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , zatímco výrazné prodloužení tohoto řetězce se projeví značným poklesem aktivity. Triklosan a jeho deriváty 6PP a 8PP účinkují obdobně dobře na INH-senzitivní i rezistentní kmeny<sup>22</sup>. Bylo zjištěno, že také heterocyklické *ortho*-kondenzované diazaboriny (*XII*) blokují funkci *InhA* tvorbou kovalentní vazby boru s 2'-hydroxyem ribosy v NAD<sup>+</sup> (cit.<sup>23</sup>).



IX



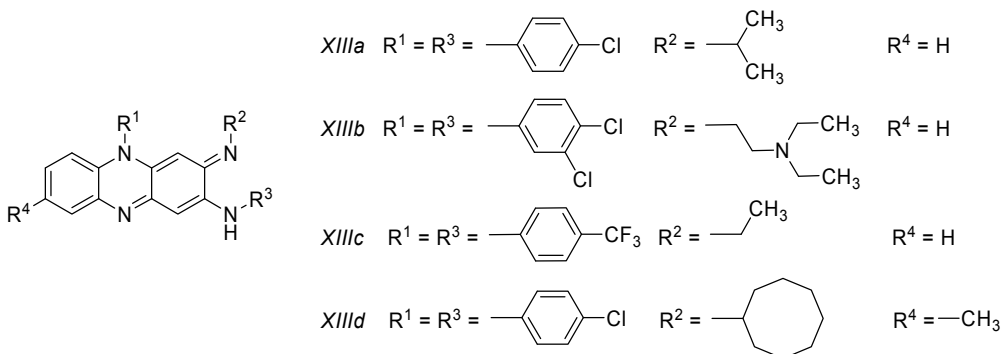
X

XIa R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = ClXIb R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H; R<sup>3</sup> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>

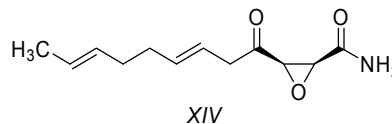
XII

Fenazinaminové deriváty odvozené od antileprotika klofaziminu vykazují aktivitu vůči řadě klinicky izolovaných tuberkulózních kmenů, včetně MDR. Mechanismus jejich účinku je komplexní, blokují dělení buněk vazbou na guanin v DNA a nedávno byla zjištěna na dávce závislá inhibice biosyntézy mykolových kyselin. Některé deriváty mají i další farmakologické účinky, např. zvrácení inhibičního efektu mykobakteriálních proteinů na fagocytózu napadených buněk<sup>24,25</sup>.

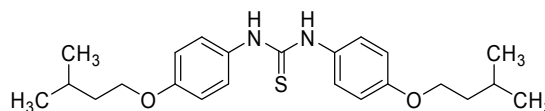
Kromě klofaziminu (XIIIa) se jedná např. o jeho vysoce účinné deriváty B4154 (XIIIb) a B4157 (XIIIc). MIC<sub>90</sub> B4154 byla 0,25, B4157 0,12 a klofaziminu ≤ 1,0 μg ml<sup>-1</sup>, přičemž *in vivo* (u myši) se jevil nejefektivnější v dávce 20 mg kg<sup>-1</sup> den<sup>-1</sup> klofazimin<sup>26</sup>. Vysoce aktivním dihydrofenazinem je sloučenina nazvaná OPC-37306 (XIII d). Její MIC je 0,1-0,2 mg ml<sup>-1</sup> vůči rezistentním kmenům *M. tbc.* (INH, RIF, EMB, STM) a *M. bovis* BCG, nejeví však žádnou aktivitu proti grampozitivním ani negativním bakteriím<sup>25</sup>.



Dalším inhibitorem syntézy mastných kyselin je cerulenin (XIV), produkt plísně *Cephalosporium caerulens*, blokující FAS I i FAS II a mající synergický efekt s dalšími antituberkulotiky. Jeho MIC vůči MDR kmenům se pohybuje od 1,5 do 12,5 μg ml<sup>-1</sup>, působí i na netuberkulózní mykobakteria, bohužel je však v lidském organismu nestabilní<sup>27</sup>.



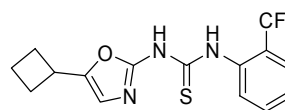
XIV



XV

DesA3 je stearyl-CoA Δ<sup>9</sup>-desaturasa vytvářející kyselinu olejovou. Působením DesA3 vzniká dvojná vazba na uhlíku 9, čímž se podílí na syntéze mastných kyselin včetně mykolových<sup>28</sup>. Thiokarlid (též isoxyl, 1,3-bis[4-(isopentyloxy)fenyl]thiomočovina; XVI) je dlouho známé a užívané antituberkulotikum, které účinkuje i proti široké škále MDR tuberkulózních kmenů, a to právě inhibicí DesA3. Thiokarlid je pro léčivem, v organismu dochází k jeho aktivaci prostřednictvím flavinové monooxygenasy EthA, podobně jako u thioamidových tuberkulostatik<sup>29</sup>.

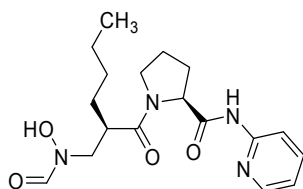
Od thiokarlidu jsou odvozeny další deriváty thiočoviny. Díky podobné struktuře je možné, že účinkují stejným mechanismem. Série 1-(5-cyklobutyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-(substituovaných fenyl/pyridyl)thiomočoviny byla hodnocena *in vitro* a *in vivo* proti *M. tbc.* H<sub>37</sub>Rv a klinicky izolovanému MDR-TB kmeni. Sedm sloučenin zastavilo růst jak senzitivního, tak MDR kmene *in vitro* v koncentraci nižší než < 1 μM, kdy nejaktivnější byla sledována thiočovina XVI (MIC 0,14 μM), která zároveň vykazovala vysoký index selektivity (> 1307)<sup>30</sup>.



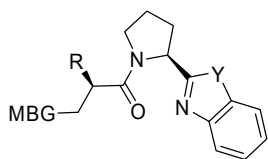
XVI

## Inhibitory proteínové syntézy

Peptidová deformylasa (PDF) katalyzuje hydrolytické odstranění *N*-koncové formylové skupiny v základním kroku syntézy proteinů, a proto se stala jedním z cílů vývoje antibakteriálních látek. Na tomto enzymu byla testována skupina PDF-I inhibitorů odvozených od *N*-alkylmočovinyových hydroxamových kyselin<sup>31</sup>. Několik z nich vykazovalo antimykobakteriální aktivitu včetně MDR kmenů *M. tbc.* s MIC<sub>90</sub> < 1 μM. Farmakokinetické studie potvrdily jejich perorální použitelnost. Tyto výsledky potvrzují roli PDF jako „targetu“ a podporují další výzkum těchto sloučenin jako potenciálních antimykobakteriálních sloučenin<sup>32</sup>. Analoga nejúčinnějšího LBK-611 (XVII) mají pyridin nahrazen benzimidazolem (XVIII, kde Y = NH) nebo benzoxazolem (XVIII, kde Y = O); MBG znamená skupinu vázající kov, R = alkyl. Pro aktivitu jsou důležité chelatační vlastnosti molekuly. Karboxylové kyseliny jsou daleko méně účinné než jim odpovídající hydroxamové kyseliny a obrácené analogy hydroxamové kyseliny<sup>33</sup>.



XVII



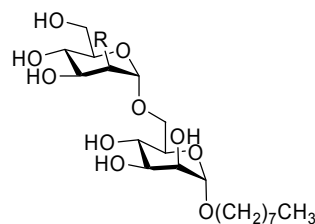
XVIII

## Inhibitory biosyntézy polysacharidů

Arabinofuranosidy jsou velmi důležitou komponentou buněčné stěny. Proto byly připraveny alkylglykosidy se třemi mono- nebo bivalentně vázanými arabinofuranosidními jednotkami. Bylo zjištěno, že alkylglykosidy inhibují růst *M. smegmatis*, kdežto samotný arabinofuranosidový trisacharid či alkylglykosid s maltosovou cukernou komponentou jsou neaktivní<sup>34</sup>.

Látky ze série α-(1→6)-vázaných mannosových disacharidů, u nichž byla 2'-OH skupina nahrazena za deoxy, fluor, amino nebo methoxy skupinu (XIX; R = H, F, NH<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>), byly hodnoceny jako substráty nebo inhibitory polyrenolmonofosfomannosy-dependentní α-(1→6)-mannosyltransferasy zapojené do biosyntézy mykobakteriálního lipoarabinomannanu, jenž je hlavní antigenní komponentou buněčné stěny a je zapojen do značného počtu důležitých imunologických procesů. Tento enzym rozpozná disacharidy se skupinami podobnými nebo menšími, než je přirozená OH skupina, ale ne disacharidy se stericky náročnějšími skupinami<sup>35</sup>.

Mykobakteriální 2*C*-methyl-D-erythritol-4-fosfát (MEP) je slibný specifický cíl pro nová léčiva. Všechny isopreno-



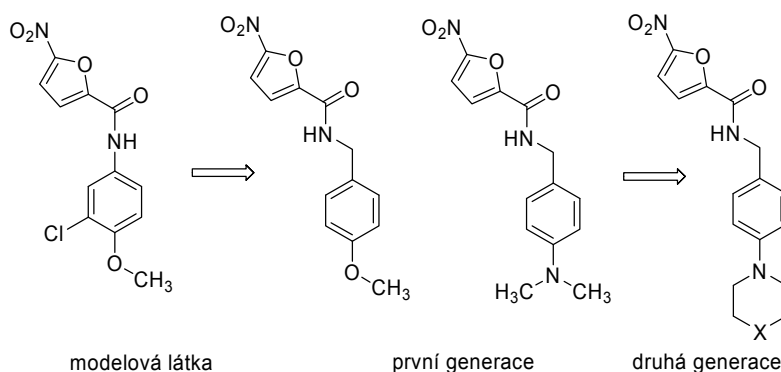
XIX

dy jsou syntetizovány opakující se kondenzací dvou důležitých prekurzorů, isopentenyl difosfátu (IPP) a dimethylallyl difosfátu (DMAPP). U *M. tbc.* jsou IPP a DMAPP biosyntetizovány pouze 2*C*-methyl-D-erythrol-4-fosfátovou cestou<sup>36</sup>. V *M. tbc.* byly nalezeny a charakterizovány isoprenoidy zahrnující polyprenylfosfát (Pol-P), prenylový postranní řetězec menachinonu a různých forem karotenoidů. Pol-P je zodpovědný nebo je zahrnut do biosyntézy arabinogalaktanu, arabinomannanu, lipoarabinomannanu a dalších lipidů peptidoglykanové biosyntézy. Hraje důležitou roli v biosyntéze buněčné stěny jako lipidní nosič aktivních cukrů. Proto může být MEP cesta považována za potenciální zdroj nových cílových míst<sup>37</sup>.

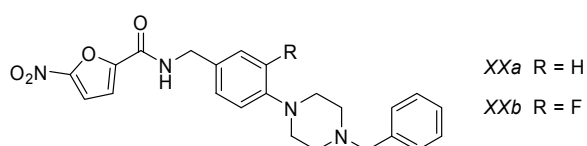
Vzhledem k tomu, že je peptidoglykan základním polymerem bakteriální stěny, nabízí se jako jedinečný a selektivní „target“. Fosfo-*N*-acetylmuramyl-pentapeptidová translokasa je integrální membránový protein katalyzující první krok reakcí uvnitř membrán. Při screeningu nových antibiotik vůči tomuto enzymu byla nalezena série kapuramycinových analogů, které vykazují selektivní antibakteriální aktivitu vůči mykobakteriím. Nejvyšší aktivitu vykázal kapuramycinový analog RS-118641 s MIC<sub>50/90</sub> vůči *M. tbc.* 1/2; vůči MDR *M. tbc.* 0,5/2; *M. avium* 4/8 a *M. intracellulare* 0,06/0,5 μg ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>38</sup>). Z těchto výsledků vyplývá, že kapuramycinová analoga jsou vynikajícími kandidáty pro další vývoj léčiv vůči MDR-TB infekcím.

Arabinogalaktan, základní komponenta mykobakteriální buněčné stěny, obsahuje galaktofuranosové stavební bloky. UDP-galaktosa mutasa katalyzuje přeměnu UDP-galaktopyranosy na UDP-galaktofuranosu. Jako modelový inhibitor tohoto enzymu a antituberkulotikum s novým mechanismem působení, které je účinné vůči rostoucím i latentním formám, byl vybrán *N*-(3-chlor-4-methoxyfenyl)-5-nitrofurán-2-karboxamid (obr. 1 – modelová látka). MIC tohoto nitrofurankarboxamidu je 1,6 μg ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>39</sup>). Optimalizace molekuly vedla k přípravě knihovny první a druhé generace (obr. 1; X = O, NH, *N*-methyl, *N*-benzyl, CH-benzyl, S, SO, SO<sub>2</sub>, *N*-pyridin-2-yl).

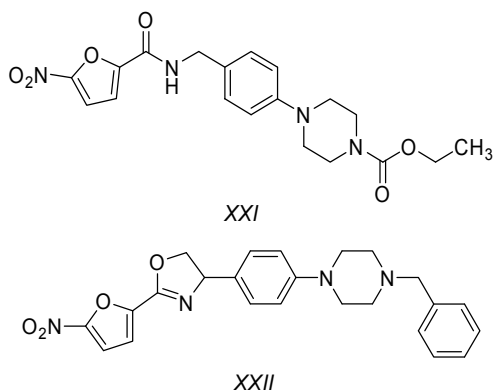
Nejúčinnější z druhé generace byl *N*-[4-(4-*N*-benzylpiperazin-1-yl)benzyl]-5-nitrofurán-2-karboxamid (XXa) s MIC<sub>90</sub> 0,0125 μg ml<sup>-1</sup> a jeho fluorovaný derivát XXb, jehož MIC<sub>90</sub> je 0,025 μg ml<sup>-1</sup>. Řada nitrofurankarboxamidů s cyklickými sekundárními aminy byla vybrána pro *in vivo* testy. Sloučeniny však vykazovaly oproti *in vitro* testům daleko nižší aktivitu<sup>40</sup>. Studium jejich biodostupnosti ukázalo, že mají krátký biologický poločas a jsou rychle eliminovány nebo degradovány. Benzylamidová a benzylpiperazinová vazba je pravděpodobným místem metabolického štěpení.



Obr. 1. Vývoj struktury nitrofurankarboxamidů



Vývoj třetí generace vedl k přípravě karbamátů. V biologickém hodnocení prokázaly vynikající antituberkulózní aktivitu a lepší rozpustnost. Nejúčinnější byl ethylkarbamát *XXI* ( $\text{MIC}_{90} = 0,0062 \mu\text{g ml}^{-1}$ )<sup>41</sup> a cyklický 4,5-dihydrooxazolový analog *XXII*, který měl hodnotu  $\text{MIC}_{90}$  dokonce jen  $0,00005 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Protože se amidické vazbě přiřítala metabolická nestabilita, byla zabudována do oxazolinového cyklu jako stabilního bioisosteru. U série těchto sloučenin se prodloužil biologický poločas za současného zvýšení antituberkulózní aktivity *in vitro*<sup>42</sup>.



### 2.3.2. Isocitrát lyasové cílení

Isocitrát lyasa (ICL) je cílový enzym pro boj s latentní infekcí *Mycobacterium tuberculosis*, která přežívá v makrofágu po dlouhou dobu nepoznána lidským imunitním systémem. Během této fáze latence rostou mykobakterie jen velmi pomalu, jsou rezistentní k běžně používaným lékům a pro přizpůsobení se nehostinnému prostředí makrofágů využívají glyoxylátový cyklus. ICL přeměňuje isocitrát na glyoxylát a hraje klíčovou roli v udržování vnitrobuněčné infekce *M. tuberculosis* v makrofázích

u myši<sup>43</sup>. Enzym dovoluje, aby se uhlík získaný z acetylkoenzymu A při  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin dostal do glyoxylátové cesty, kde je využit jako klíčový prekurzor biosyntézy základních buněčných komponent. Modelovým inhibitorem ICL je 3-nitropropanová kyselina, dalšími sloučeninami blokujícími tento enzym jsou 3-brom-2-oxopropanová kyselina či akonitát<sup>44</sup>.

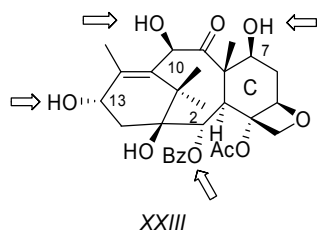
### 2.3.3. Cílení na FtsZ protein

Pro buněčné dělení u bakterií je důležitý termosenzitivní filamentární protein Z (FtsZ). Jedná se o homolog savčího cytoskeletálního proteinu tubulinu<sup>45</sup>. Polymerace FtsZ je zahájena na více místech vnější membrány a objeví se jako dvourozměrně rostoucí vysoce dynamická helikální struktura obkružující buňku označovaná jako Z-kruh. Uspořádání FtsZ je regulováno vzájemně se ovlivňujícími stabilizačními a destabilizačními faktory. Jejich rovnováha, tedy stabilita FtsZ, je přesně regulována. Z-kruh je extrémně dynamický, zastavení jeho tvorby vede k úhynu buňky. Z toho vyplývá, že je FtsZ slibným místem zásahu pro vývoj nových antimikrobiálních léčiv díky jeho centrální roli v buněčném dělení. Sloučeninami působícími na mykobakteriální FtsZ jsou anthelmintika thiabendazol a albendazol. Zpomalují buněčné dělení u *M. tbc.* při  $\text{MIC}$   $16 \mu\text{g ml}^{-1}$  (cit.<sup>46</sup>).

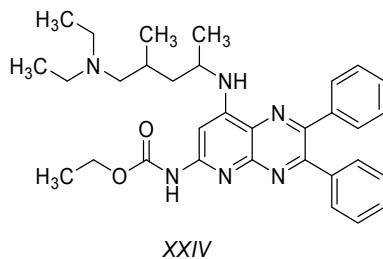
Taxany reprezentují skupinu sloučenin rovněž působících na FtsZ. Tvoří dvě rozdílné skupiny – vysoce toxické taxoidy a necytotoxické taxany, které vykazují významnou anti-TB aktivitu i vůči multilékově rezistentním kmenům. Modifikací substituce v různých pozicích molekuly 10-deacetyl-baccatinu (*XXIII*) byla připravena obsáhlá knihovna taxanů. Sloučenina mající (*E*)-3-(naftalen-2-yl)akryloylovou skupinu na uhlíku C-13 (cit.<sup>47</sup>), je účinná s  $\text{MIC}_{99}$   $2,5\text{--}5 \mu\text{M}$  a byla vybrána jako modelová látka pro další optimalizaci.

Čtyři slibné necytotoxické taxany odvozené od *C-seco*-baccatinu vykazaly aktivitu v koncentracích  $1,15$  až  $2,5 \mu\text{M}$  proti lékově senzitivním a rezistentním kmenům *M. tbc.* bez znatelné cytotoxicity<sup>48</sup>.

Bylo zjištěno, že některé sloučeniny, které byly vyvi-



nuty jako inhibitory tubulinové polymerizace, inhibují růst *M. tbc.* Např. SRI-3072 (XXIV) vykazuje MIC 0,15  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Redukuje růst *M. tbc.* v myších makrofázích, je specifická pro FtsZ a nepůsobí na polymerizaci tubulinu<sup>49</sup>.



#### 2.3.4. Další možné cíle zásahu mykobakterií

Jedním z přístupů k získávání nových antituberkulotik je testování známých antibiotických i neantibiotických léčiv, kde byla aktivita vůči MDR kmenům zjištěna u co-amoxicilinu, imipenemu, nových makrolidů, nesteroidního antiflogistika diklofenaku či fenothiazinových neuroleptik a jejich recentně připravených derivátů<sup>3</sup>.

Přehled dalších možných cílových míst zásahů je prezentován v literárním zdroji<sup>3</sup> a je sumarizován v tabulce, která je rovněž uvedena v suplementu přístupného na webových stránkách Chemických listů.

### 3. Závěr

Zatímco běžné případy tuberkulózy jsou doposud léčitelné, MDR-TB a XDR-TB způsobují problémy a v některých případech jsou smrtelné. Vzhledem k rostoucímu počtu rezistentních kmenů mykobakterií a jejich spicím formám, které mohou způsobit pozdější pandemii, je třeba věnovat maximální pozornost hledání nových mechanismů působení a cílových molekul pro účinnou a rychlou léčbu, která by eliminovala vznik rezistence a rezervoár latentních kmenů *M. tbc.* Cílem tohoto článku je podat přehled progresivně rostoucích poznatků z oblasti vývoje antituberkulotik působících vůči multilékově rezistentním kmenům za posledních několika let. Byly nalezeny nové cíle působení, dekodovány virulentní geny a připraveny nadějně struktury, např. PA-824, OPC-67683 a TMC207, které po zvládnutí ADME, mutagenity, biodostupnosti a lékových interakcí pravděpodobně rozšíří skupinu antituberkulotik působících proti multilékově rezistentní TB.

*Tato práce byla financována z MSM 0021620822 a IGA NS 10367-3.*

### LITERATURA

1. Wright A., Zignol M.: *Anti-tuberculosis drug resistance in the world (fourth global report)*. World Health Organization, Geneva 2008.
2. WHO Stop TB Department: *Frequently asked questions – XDR-TB (Oct. 2006)*. World Health Organization, Geneva 2006. <http://www.who.int/tb/challenges/xdr/faqs/en/index.html>, staženo 29.4.2009.
3. Vinšová J., Krátký M., v knize: *Drug-Resistant Tuberculosis: Causes, Diagnosis and Treatments* (Nguy S., K'ung Z., ed.), kap. 2. Nova Publishers, New York 2009.
4. Flynn J. L.: *Tuberculosis* 84, 93 (2004).
5. Ballell L., Field R. A., Duncan K., Young R. J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2153 (2005).
6. Nam H. S., Koh W. J., Kwon O. J., Cho S. N., Shim T. S.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 92 (2009).
7. Cynamon M. H., Klemens S. P., Sharpe C. A., Chase S.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1189 (1999).
8. Vera-Cabrera L., Castro-Garza J., Rendon A., Ocampo-Candiani J., Welsh O., Choi SH., Blackwood K., Molina-Torres K.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4351 (2005).
9. Andries K., Verhasselt P., Guillemont J., Gohlmann H. W. H., Neefs J. M., Winkler H., Von Gestel J., Timmerman P., Zhu M., Lee E., Williams P., de Chaffoy D., Huitric E., Hoffner S., Cambau E., Truffot-Pernot C., Lounis N., Jarlier V.: *Science* 307, 223 (2005).
10. Lenaerts A. J., Gruppo V., Marietta K. S., Johnson C. M., Driscoll D. K., Tompkins N. M., Rose J. D., Reynolds R. C., Orme I. M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2294 (2005).
11. Stover C. K., Warrenner P., VanDevanter D. R., Sherman D. R., Arain T. M., Langhorne M. H., Anderson S. W., Towell J. A., Yuan Y., McMurray D. N., Kreiswirth B. N., Barry C. E., Baker W. R.: *Nature* 405, 962 (2000).
12. Matsumoto M., Hashizume H., Tomishige T., Kawasaka M., Tsubouchi H., Sasaki H., Shimokawa Y., Komatsu M.: *PLoS Med.* 3, 2131 (2006).
13. Chen P., Gearhart J., Protopopova M., Einck L., Nacy C. A.: *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 332 (2006).
14. Jones P. B., Parrish N. M., Houston T. A., Stapon A., Bansal N. P., Dick J. D., Townsend C. A.: *J. Med. Chem.* 43, 3304 (2000).
15. Fasgen Inc.: *FASgen Announces Research Breakthrough in Treatment of TB and MDR-TB (Jan. 2005)*. FASgen, Baltimore 2005. <http://www.fasgen.com/pr-january122005.html>, staženo 29.4.2009.
16. *Tuberculosis* 88, 126 (2008).
17. Deidda, D., Lampis, G., Fioravanti, R., Biava, M., Porretta, G. C., Zanetti, S., Pompei, R.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3035 (1998).
18. Biava, M., Porretta, G. C., Poce, G., Supino, S., Deidda, D., Pompei, R., Mollicotti, P., Manetti, F., Botta, M.: *J. Med. Chem.* 49, 4946 (2006).



19. Vilcheze C., Morbidoni H. R., Weisbrod T. R., Iwamoto H., Kuo M., Sacchetti J. C., Jacobs W. R.: *J. Bacteriol.* *182*, 4059 (2000).
20. He X., Alian A., Stroud R., de Montellano P. R. O.: *J. Med. Chem.* *49*, 6308 (2006).
21. He X., Alian A., de Montellano P. R. O.: *Bioorg. Med. Chem.* *15*, 6649 (2007).
22. Sullivan T. J., Truglio J. J., Boyne M. E., Novichenok P., Zhang X., Stratton C. F., Li H. J., Kaur T., Amin S. A., Johnson F., Slayden R. A., Kisker C., Tonge P. J.: *ACS Chem. Biol.* *1*, 43 (2006).
23. Lu H., Tonge P. J.: *Acc. Chem. Res.* *41*, 11 (2008).
24. Reddy V. M., O'Sullivan J. F., Gangadharam P. R. J.: *J. Antimicrob. Chemother.* *43*, 615 (1999).
25. Matsumoto M., Hashizume H., Tsubouchi H., Sasaki H., Itotani M., Kuroda H., Tomishige T., Kawasaki M., Komatsu M.: *Curr. Top. Med. Chem.* *7*, 499 (2007).
26. Reddy V. M., Nadadhur G., Daneluzzi D., O'Sullivan J. F., Gangadharam P. R. J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* *40*, 633 (1996).
27. Barry P. J., O'Connor T. M.: *Curr. Med. Chem.* *14*, 2000 (2007).
28. Chang Y., Fox B. G.: *Biochemistry* *45*, 13476 (2006).
29. Kordulakova J., Janin Y. L., Liav A., Barilone N., Dos Vultos T., Rauzier J., Brennan P. J., Gicquel B., Jackson M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 3824 (2007).
30. Sriram D., Yogeewari P., Dinakaran M., Thirumuran R.: *J. Antimicrob. Chemother.* *59*, 1194 (2007).
31. Hackbarth C. J., Chen D. Z., Lewis J. G., Clark K., Mangold J. B., Cramer J. A., Margolis P. S., Wang W., Koehn J., Wu C., Lopez S., Withers G., Gu H., Dunn E., Kulathila R., Pan S. H., Porter W. L., Jacobs J., Trias J., Patel D. V., Weidmann B., White R. J., Yuan Z.: *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 2752 (2002).
32. Teo J. W. P., Thayalan P., Beer D., Yap A. S. L., Nanjundappa M., Ngew X., Duraiswamy J., Liung S., Dartois V., Schreiber M., Hasan S., Cynamon M., Ryder N. S., Yang X., Weidmann B., Bracken K., Dick T., Mukherjee K.: *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 3665 (2006).
33. Pichota A., Duraiswamy J., Yin Z., Keller T. H., Alam J., Liung S., Lee G., Ding M., Wang G., Chan W. L., Schreiber M., Maa I., Beer D., Ngew X., Mukherjee K., Nanjundappa M., Teo J. W. P., Thayalan P., Yap A., Dick T., Meng W., Xu M., Koehn J., Pan S. H., Clark K., Xie X., Shoen C., Cynamon M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *18*, 6568 (2008).
34. Naresh K., Bharati B. K., Jayaraman N., Chatterji D.: *Org. Biomol. Chem.* *6*, 2388 (2008).
35. Subramaniam V., Gurucha S. S., Besra G. S., Lotary T. L.: *Bioorg. Med. Chem.* *13*, 1083 (2005).
36. Eoh H., Brennan P. J., Crick D. C.: *Tuberculosis* *89*, 1 (2009).
37. Parrish N. M., Ko C. G., Hughes M. A., Townsed C. A., Dick J. D.: *J. Antimicrob. Chemother.* *54*, 722 (2004).
38. Koga T., Fukuoka T., Doi N., Harasaki T., Inoue H., Hotoda H., Kakuta M., Muramatsu Y., Yamamura N., Hoshi M., Hirota T.: *J. Antimicrob. Chemother.* *54*, 755 (2004).
39. Tangallapally R. P., Yendapally R., Daniels A. J., Lee R. E. B., Lee R. E.: *Curr. Top. Med. Chem.* *7*, 509 (2007).
40. Tangallapally R. P., Yendapally R., Lee R. E. B., Lenaerts A. J. M., Lee R. E.: *J. Med. Chem.* *48*, 8261 (2005).
41. Tangallapally R. P., Lee R. E. B., Lenaerts A. J. M., Lee R. E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *16*, 2584 (2006).
42. Tangallapally R. P., Sun D., Rakesh B., N., Lee R. E. B., Lenaerts A. J. M., Meibohm B., Lee R. E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *17*, 6638 (2007).
43. Munoz-Elias E. J., Upton A. M., Cherian J., McKinney J. D.: *Mol. Microbiol.* *60*, 1109 (2006).
44. Tripathi R. P., Tewari N., Dwivedi N., Tiwari V. K.: *Med. Res. Rev.* *25*, 93 (2005).
45. Bi E., Lutkenhaus J.: *Nature* *354*, 161 (1991).
46. Huang Q., Tonge P. J., Slayden R. A., Kirikae T., Ojima I.: *Curr. Top. Med. Chem.* *7*, 527 (2007).
47. Ojima I., Borella C. P., Wu X. Y., Bounaud P. Y., Oderca C. F., Sturm M., Miller M. L., Chakravarty S., Chen J., Huang Q., Pera P., Brooks T. A., Baer M. R., Bernacki R. J.: *J. Med. Chem.* *48*, 2218 (2005).
48. Huang Q., Kirikae T., Pepe A., Amin A., Respcio L., Slayden R. A., Tonge P. J., Ojima I.: *J. Med. Chem.* *49*, 463 (2006).
49. White E. L., Suling W. J., Ross L. J., Seitz L. E., Reynolds R. C.: *J. Antimicrob. Chemother.* *50*, 111 (2002).

**M. Krátký and J. Vinšová** (*Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Advances in the Development of Antituberculotics Acting on Multidrug-Resistant Strains**

The aim of this review is to outline the recent advances in the development of new drugs against multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). The occurrence of resistance to anti-tuberculosis drugs, particularly of MDR-TB, has become a major public health problem. The emergence of MDR-TB has made many currently available anti-TB drugs ineffective. Due to a many reasons, there is an urgent need to identify new drug targets and to find novel chemical structures. The research of novel anti-MDR-TB potential drugs follows structure modification of known antituberculotics, new lead structures with novel mechanism of the action (linezolid, TMC207, PA-824, OPC-67683, SQ109, FAS20013, LL-3858, BM212) and novel drug targets, *i.e.* cell wall biosynthesis (mycolic acid synthesis, protein synthesis, arabinogalactan and peptidoglycan biosynthesis inhibitors) or other novel targets.

## POKROKY VE VÝVOJI VAKCÍN PROTI HIV, TUBERKULÓZE A MALÁRII

PETRA GRZNÁROVÁ a JAN LIPOV

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6  
petra.grznarova@vscht.cz

Došlo 20.10.09, přijato 18.2.10.

Klíčová slova: vakcíny, HIV, malárie, tuberkulóza

### Obsah

1. Úvod
2. HIV vakcíny
3. Vakcíny proti tuberkulóze
4. Vakcíny proti malárii
5. Závěr

### 1. Úvod

Onemocnění AIDS a tuberkulóza jsou již několik let na nejvyšších pozicích v seznamu příčin úmrtí ve světě. Tuberkulóza byla v roce 2005 příčinou úmrtí 1,6 mil lidí<sup>1</sup>. Onemocnění AIDS bylo příčinou úmrtí 2 mil lidí v celosvětovém měřítku v roce 2007, z čehož bylo 270 000 dětí. Za tentýž rok přibýlo dalších 2,7 mil nově infikovaných osob ke 33 mil již evidovaných HIV pozitivních osob<sup>2</sup>. Malárie celosvětově ohrožuje 3 mld lidí ve více než 109 zemích. Více než 250 mil lidí již na malárii trpí, u více než 1 mil pacientů ročně vede k smrti<sup>3,4</sup>.

Vakcinace (z *lat.* vacca – kráva, protože první vakcína byla založena na očkování lidí kravskými neštovicemi) je nejúčinnější způsob, jak předcházet infekčním chorobám. První zmínky o využití vakcín se objevují již v období 200 let př. n. l. v Číně. První dokumentovanou vakcinaci (proti pravým neštovicím) provedl v roce 1796 anglický lékař Edward Jenner. Nové objevy v mikrobiální patogenezi a imunologii vedly v posledních letech k renesanci ve výzkumu a vývoji vakcín. Komerčním a zároveň technologickým úspěchem byla např. příprava vakcíny Prevenar, která je určena k prevenci pneumokokových infekcí u novorozenců a batolat. Jde o konjugát bakteriálních polysacharidů ze *Streptococcus pneumoniae* a proteinu CRM197 (z *angl.* cross reacting material), což je nefunkční varianta bakteriálního toxinu z *Corynebacterium diphtheriae*. Tato kombinace vedla ke stimulaci produkce IgG protilátek. Další vývoj v této oblasti se soustřeďuje na výzkum vakcín ve formě 12 a více valentních glykokonjugátů, které by poskytovaly komplexnější ochranu<sup>8</sup>. Dalším příkladem

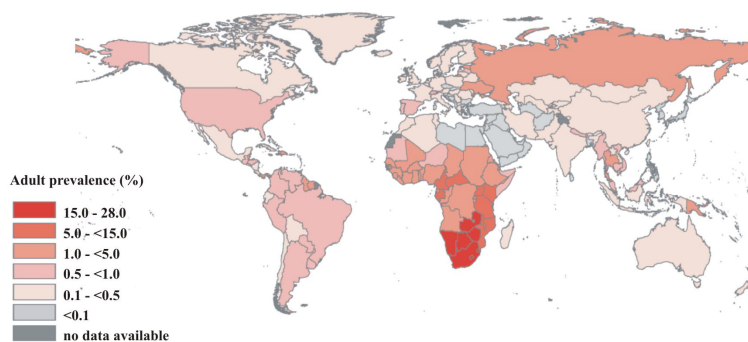
jsou vakcíny Cervarix a Gardasil (v České republice distribuována pod názvem Silgard), které byly světovou zdravotnickou organizací doporučeny k celoplošné prevenci. Divalentní vakcína Cervarix je určena k prevenci premaligních cervikálních lézí a karcinomu děložního hrdla, zatímco tetravalentní vakcína Gardasil/Silgard zahrnuje prevenci premaligních genitálních lézí (cervikálních, vulválních a vaginálních), karcinomu děložního hrdla a genitálních bradavic. Cervarix obsahuje rekombinantní kapsidové proteiny lidských papilomavirů (L1 proteiny HPV) typů 16 a 18 složených do viru podobných částic, konjugovaných s adjuvans. Gardasil/Silgard vakcína obsahuje L1 proteiny HPV typů 6, 11, 16 a 18 v téže formě<sup>9,10</sup>. Hladiny protilátek po aplikaci obou vakcín jsou nesrovnatelně větší než protilátková odpověď po přirozené infekci. Příprava antigenů ve formě virům podobných částic nebo syntéza modifikovaných adjuvans poukazují na vysoký potenciál tohoto odvětví farmakologie a jsou výzvou a impulsem pro farmaceutický průmysl k vývoji vakcín proti široké škále onemocnění jako je malárie, tuberkulóza, meningitida typu B, hepatitida typu C, chlamydiové infekce a v neposlední řadě také k vývoji vakcíny proti mnoha subtypům chřipky.

Bezpečnost a efektivita očkovací látky závisí na způsobu přípravy a na jejím složení.

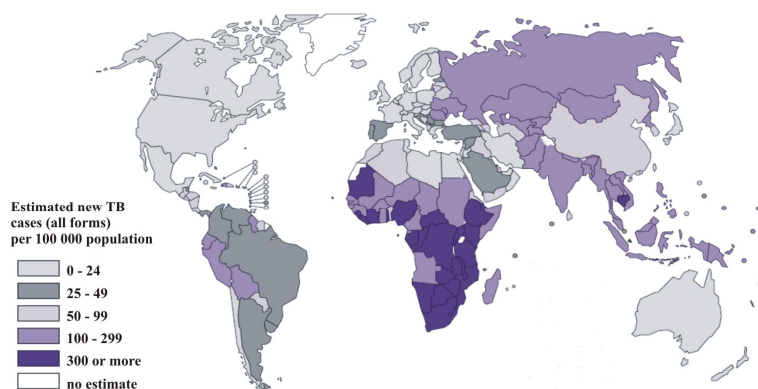
Očkovací látky, které jsou momentálně v klinickém použití, jsou několika typů:

- Inaktivované vakcíny, které jsou připraveny usmrčením příslušného patogenu teplem nebo chemicky. Očkovací látka je stabilní, ale kvůli relativně slabé imunitní odpovědi je nutné vakcínu podat vícekrát.
  - Příkladem tohoto typu vakcíny je buněčná vakcína proti černému kašli či vakcína proti chřipce.
  - Živé (atenuované) vakcíny, které jsou připraveny kultivací patogenu tak, aby ztratil svou virulenci. Imunitní odpověď organismu po imunizaci tímto typem očkovací látky je dobrá, v tomto případě jsou ale zvýšené nároky na skladování a teoretická možnost zpětné mutace do virulentní podoby. Proto se tento typ vakcín nepodává osobám s oslabenou obranyschopností. Příkladem je vakcína proti tuberkulóze, spalničkám, zarděnkám a příušnicím.
  - Toxoid (anatoxin) je molekula toxinu zbavená toxicity, přičemž její antigenní aktivita je zachována. Toxoidy vznikají spontánně nebo je možné strukturu výchozí molekuly změnit chemicky, např. formalínem. Příkladem tohoto typu vakcíny je očkovací látka proti tetanu či záškrtu.
- Mezi tzv. moderní vakcíny, patří:
- Konjugované vakcíny, které jsou založeny na konjugaci polysacharidového antigenu s proteinovým nosičem (tetanický nebo difterický toxoid). Příkladem je očkovací látka proti *Haemophilus influenzae* typu B.
  - Subjednotkové vakcíny obsahují pouze určitou složku

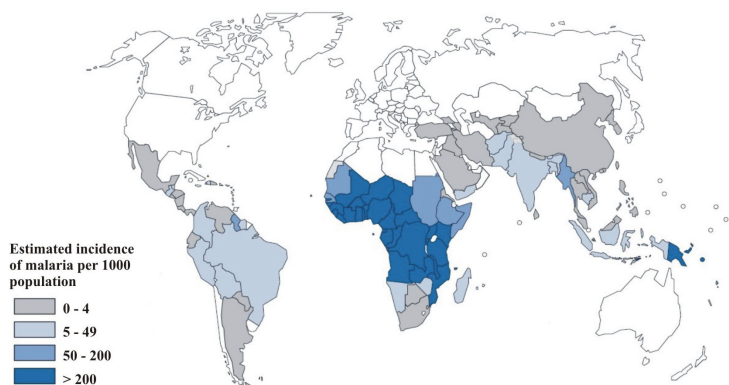
a



b



c

Obr. 1. Přehled prevalence a incidence a) AIDS<sup>5</sup>, b) tuberkulózy<sup>6</sup> a c) malárie<sup>7</sup> ve světě ke konci roku 2006

patogenní částice, která vyvolává imunitní odpověď a má imunizační vlastnosti. Eliminací reziduálních složek celého mikroorganismu se snižuje četnost nežádoucích účinků. Příkladem je vakcína proti hepatitidě

B (ENGERIX-B).

Vakcíny, které jsou zatím experimentální:

- DNA vakcíny. V zásadě se jedná o terapeutický gen, který je po vstupu do buňky exprimován za produkce

imunogenního proteinu patogenního mikroorganismu, např. povrchového glykoproteinu. Pro zajištění požadované koncentrace proteinu je terapeutický gen vložen do vektoru za silný virový promotor. Konstruovány jsou také multicistronní vektory pro expresi několika imunogenních či imunomodulačních proteinů zároveň<sup>11</sup>. Imunomodulační proteiny jsou nezbytné pro regeneraci a zachování kondice buněk imunitního systému. Pro produkci vektoru slouží bakteriální buňky. Po namnožení v bakteriích jsou vektory zpravidla převedeny do fyziologického roztoku, ve kterém jsou injektovány pod kůži nebo do svalů.

Genová děla, kde jsou molekuly DNA přichyceny na povrchu zlatých či wolframových mikročástic, které jsou urychleny stlačeným héliem a nastřelovány do cílových buněk, jsou zatím jenom laboratorní technikou<sup>12</sup>. Alternativní metodou je aplikace aerosolu na nosní, plicní, oční nebo vaginální sliznici<sup>11,13</sup>.

- Rekombinantní vektorové vakcíny, ve kterých se gen pro příslušný antigen patogenu inkorporuje do genomu neškodného mikroorganismu – nosiče. V této formě je látka očkována do organismu, kde nosič produkuje kromě svých proteinů i proteiny odpovídající vnesenému genu. Vznikne imunita proti patogenu. Nosičem genu může být např. virus vakcinie, poliovirus, BCG nebo nepatogenní salmonela.

Zajímavý experiment byl popsán autory Silva a spol., kteří transfekovali myší monocyty retrovirovým vektorem obsahujícím gen pro expresi hsp65 (*z angl.* heat-shock protein) *Mycobacterium leprae*. Antigen byl exponován na povrchu transfekovaných buněk spolu s MHC třídí I a II. Tyto buňky byly injektovány myším, u kterých byla po aplikaci pozorována odolnost po expozici BCG a *Mycobacterium tuberculosis*<sup>14</sup>.

Vakcíny, které se vyvíjejí a používají v poslední době, byly navrženy tak, aby obsahovaly co nejméně cizorodých antigenních látek a tudíž aby zatížení organismu bylo co nejmenší, zároveň musí být samozřejmě schopné vyvolat účinnou imunitu proti příslušnému patogenu. Příprava nových typů vakcín je nezbytná i proto, že pro některá infekční agens nelze použít atenuovanou či inaktivovanou formu pro jejich onkogenní potenciál a také proto, že některé mikroorganismy nelze kultivovat v klasických podmínkách.

Následující část se týká přípravy různých typů vakcín a pokroku ve vývoji očkovacích látek proti významným patogenům různých typů od virů přes bakterie po parazity způsobující AIDS, tuberkulózu a malárii.

## 2. HIV vakcíny

HIV (*Human immunodeficiency virus*), který způsobuje syndrom získaného selhání imunity (AIDS) řadíme do VI. skupiny virů, tj. virů obsahujících jednořetězcovou RNA a reverzní transkriptasu. Systematicky náleží HIV do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Orthoretrovirinae* a rodu

Lentivirus. Na základě změn v genetické informaci rozdělujeme HIV na dva typy: HIV-1 a HIV-2. Typ HIV-1 je dělen na 4 skupiny: M, O, N a P. Skupina M obsahuje zatím 9 subtypů, a to A, B, C, D, F, G, H, J a K. V posledních letech se hovoří i o subtypech E a I, které se ale zatím podařilo izolovat jenom v rekombinantní podobě s jiným subtypem.

K infekci dochází tělními tekutinami nakažených osob (krev, vaginální sekret, sperma, mateřské mléko). Vstup viru do cílové buňky zajišťuje povrchový glykoprotein (Env; *z angl.* envelope). Má dvě podjednotky, gp120 (povrchová podjednotka – SU, *z angl.* surface unit) a gp41 (transmembránová podjednotka – TM, *z angl.* transmembrane unit). Na vnějším povrchu virové membrány jsou proteiny gp120 a gp41 spojeny nekovalentními interakcemi<sup>15</sup>. Povrchová podjednotka (gp120) je zodpovědná za specifickou interakci s povrchovým glykoproteinem CD4 exponovaným na povrchu T-lymfocytů. V důsledku vazby proteinu gp120 na molekulu CD4 dochází ke konformační změně gp120 a odkrytí vazebného místa pro koreceptor (CCR5 nebo CXCR4)<sup>16,17</sup>.

Po interakci viru s receptorem a koreceptorem dochází k řadě konformačních změn, jejichž výsledkem je membránová fúze a uvolnění virového jádra do cytoplasmy cílové buňky<sup>18</sup>. Po rozpadu virového jádra je spuštěn proces reverzní transkripce, kterým je syntetizována dvouřetězcová virová DNA. Reverzní transkripce probíhá v cytoplasmě v tzv. nukleoproteinovém komplexu. Po jejím ukončení je celý tzv. preintegrační komplex (PIC), tvořený DNA, IN (integrasa), RT (reverzní transkriptasa) a zřejmě i MA (matrixový protein), Vpr (*z angl.* viral protein R) a NC (nukleoprotein), transportován k jaderným pórum (cit.<sup>19–22</sup>). Následkem specifických interakcí s proteiny lokalizovanými na vstupu do jaderného póru dochází k rozpadu PIC a průniku provirové DNA do jádra, kde je za pomoci integrasy inkorporována do hostitelského genomu. Po aktivaci proviru dochází za účasti hostitelské DNA polymerasy k transkripci provirové DNA. Vzniklé molekuly RNA, nesestřížené i sestřížené, jsou transportovány do cytoplasmy. Nesestřížená RNA vystupuje buď jako mRNA, ze které na volných polysomech vznikají polyproteinové produkty Gag, Gag-Pro a Gag-Pro-Pol, nebo jako genomová RNA nově se formující virové částice. Sestřížené molekuly RNA slouží jako mRNA kódující Env a regulační proteiny Vif, Vpr, Tat, Nef, Rev a Vpu<sup>23</sup>.

Translací *env* na drsném endoplasmatickém retikulu (ER) vzniká polyproteinový prekurzor Env, který je v ER (endoplasmatické retikulum) štěpen za vzniku SU a TM. Tyto podjednotky jsou poté transportovány k cytoplasmatické membráně (CM) a exponovány na jejím povrchu. Polyproteinové prekurzory Gag a Gag-Pro-Pol jsou taktéž transportovány k CM, kde dochází k jejich multimerizaci a vytvoření nezralé virové částice, která po vazbě na komplex SU a TM pučí ven z buňky. Viry touto cestou získávají vnější obal odvozený od CM hostitelské buňky. Zrání viru, tj. přestavba virového jádra (*z angl.* core), probíhá po oddělení viru od hostitelské buňky, a je způsobeno proteolytickým štěpením polyproteinů Gag a Gag-Pro-Pol.

HIV byl objeven před více než 25 lety a v dnešní době víme mnoho o jeho struktuře a imunopatogenezi. Byly pozorovány různé vlastnosti HIV, jako je mimořádná genetická diverzita, způsobená vysokou frekvencí chyb při transkripci virového genomu, nebo jeho schopnost postupně eliminovat imunitní odpověď hostitele. Nebyl pozorován žádný příklad imunity proti HIV, který by mohl být (podobně jako u ostatních známých virů) základem pro vývoj vakcíny. Od osmdesátých let bylo uskutečněno více než 95 klinických testů různých HIV vakcín na více než 26 000 dobrovolnicích, žádná ovšem neposkytla uspokojivý výsledek<sup>24</sup>.

V současné době probíhá zajímavá studie, a to testování vakcíny obsahující virus ptačích neštovic. Virus ptačích neštovic (ALVAC) je znám svou vysokou imunogenitou, a proto byl použit jako vektor pro produkci HIV vakcín. Do vektoru byly vloženy různé kombinace genů z HIV: *env*, *gag*, *pol* a *nef*. Pět kombinací bylo testováno na dobrovolnicích. Do druhé fáze klinických testů byl zařazen konstrukt ALVAC vCP205 obsahující geny pro *env* (gp120, gp41), *gag* a *pol*. Byla pozorována tvorba cytotoxických CD8+ T-lymfocytů, které průkazně zpomalují průběh infekce<sup>25</sup>. Byla také prokázána bezpečnost a imunogenita vakcíny<sup>26</sup>.

Vakcínou ve třetí fázi klinických testů je Retanef, tvořený adenovirovým vektorem s vloženými geny *rev*, *tat*, *nef*, *gag*, *pol* a *env* HIV-1 subtypu B, která je testována v USA a Austrálii. Vakcína schopná indukovat rozsáhlou produkci CD4+ a CD8+ T-lymfocytů umožňuje dlouhodobou kontrolu nad průběhem infekce<sup>27,28</sup>.

Další z řady rekombinantních vakcín je očkovací látka, jejímž základem je genová modifikace viru vakcinie Ankara (pasážováním viru v kuřecích buňkách virus ztratil 10 % svého genomu a tím i schopnost replikace v buňkách primátů a pro klinické použití je tedy zejména z hlediska bezpečnosti velmi zajímavý), která vede k produkci polyproteinu Gag a několika epitopů HIV indukujících tvorbu cytotoxických T lymfocytů. Tato očkovací látka byla roku 2001 uvedena do první fáze klinických testů v Anglii a Keni<sup>35</sup>.

V současnosti je licencováno několik vakcín obsahujících povrchové glykoproteiny, které jsou esenciální pro přichycení viru k hostitelské buňce a průnik viru do buňky. Již zmiňovaným problémem ve vývoji vakcín proti HIV je především diverzita viru a chybovost RT, což se projevuje vysokou variabilitou a konformační flexibilitou povrchových glykoproteinů a tedy rychlou selekcí rezistentního viru u léčených pacientů.

Mnohé HIV vakcíny jsou navrženy a vyvíjeny tak, aby po jejich aplikaci do organismu byly imunitním systémem produkovány protilátky proti gp120. V roce 2008 byla spuštěna první fáze klinických testů s vakcínou, která má vyvolat produkci protilátek proti třem celosvětově významným HIV subtypům<sup>33</sup>. Epitopy na gp120 jsou vysoce imunogenní a tvoří se proti nim velmi účinné protilátky. Na povrchu virionu se ovšem protein gp120 nachází ve formě trimeru, což může bránit interakci protilátky s epitopem. Navíc jsou interakce mezi jednotlivými molekulami

v trimeru podstatně silnější než vazba protilátky na epitop, takže k interakci protilátky a epitopu nemůže dojít. K rozvolnění trimeru dochází až po interakci s CD4 receptorem v důsledku konformačních změn, to je už ale na neutralizaci protilátkou pozdě<sup>17</sup>. Řešením by mohlo být využití poznatků ze strukturální biologie pro navržení a vytvoření struktur napodobujících epitopy povrchových glykoproteinů HIV, které indukují tvorbu protilátek proti těmto strukturám.

Třetí fáze klinických testů bude v dohledné době ukončena u produktu AIDSvax B/B, který obsahuje sekvence pro obalové glykoproteiny izolované z virů interagujících s koreceptory CCR5 (cit.<sup>29</sup>). Druhá fáze klinických testů neprokázala výraznější účinek této vakcíny. V současné době jsou očekávány výsledky z třetí fáze testování v Thajsku<sup>30–32</sup>.

V rámci projektu AIDS Vaccine Integrated Project (AVIP) bylo navrženo několik vakcín založených na poznatcích, že Tat a Nef jsou na jedné straně induktory exprese cytokinů a chemokinů (signální molekuly sehrávající roli v mezibuněčné komunikaci) v infikovaných buňkách a na straně druhé jako extracelulární proteiny působí jako chemoatraktanty (indukují pohyb buněk ve směru rostoucí koncentrace chemoatraktantu) pro cílové buňky HIV, čímž zvyšují úspěšnost infekce. Byly navrženy 4 typy vakcín. Základ vakcíny s označením 1-Tat + ΔV2Env tvoří kombinace časného regulačního virového antigenu Tat s povrchovým glykoproteinem Env. Označení ΔV2 představuje deleci první hypervariabilní oblasti označované jako "V2 loop". Tato delece způsobuje expozici jinak málo přístupných konzervovaných aminokyselinových sekvencí Env, které participují v interakci Env s CD4 receptorem a příslušným koreceptorem. Tat protein slouží jako antigen a aktivátor imunitní odpovědi. Očekávaným výsledkem imunizace touto vakcínou je produkce specifických protilátek a indukce CD4+ a CD8+ lymfocytů. Výsledky první fáze klinických testů prokázaly významnou produkci protilátek. Vakcína s označením 2-Nef + ΔV2Env je založena na kombinaci časného regulačního proteinu Nef a trimeru ΔV2Env. Proti produktu genu *nef* jsou po imunizaci vakcínou v organismu tvořeny protilátky anti-Nef a protilátky proti konzervovaným aminokyselinovým sekvencím Env. Organismus tak získal obranyschopnost proti časné i pozdní fázi replikačního cyklu viru. Výsledky z první fáze klinických testů prokázaly bezpečnost vakcíny a také významnou imunitní odpověď. Základem očkovací látky s označením 3-multi-HIV antigens/epitops je kombinace genů pro regulační proteiny Nef, Tat a Rev, genů pro Gag produkty MA a p24 a DNA kódující několik epitopů z RT, virové proteasy a Env proteinu. Tato očkovací látka byla doplněná GM-CSF, což je cytokin, růstový faktor bílých krvinek, který má v tomto případě adjuvantní efekt. Látka zatím nebyla klinicky testována. Poslední navrženou vakcínou v rámci programu AVIP je látka s označením 4-HIV multigene. Jejím základem je plasmidová DNA obsahující geny *nef*, *tat*, *rev*, *gag* a geny pro několik epitopů Env a RT. Po aplikaci očkovací látky se předpokládá spuštění tvorby cytotoxických T lymfocytů. Látka zatím nebyla

klinicky testována<sup>34</sup>.

Dosavadní úspěchy na poli boje proti HIV nespočívají v léčení infekce, ale spíše v omezení výskytu a projevu příznaků a též v omezení šíření viru v populaci<sup>24</sup>. Za posledních pár let bylo vyvinuto mnoho pokusných HIV vakcín, které vyvolaly silnou imunitní odpověď a následně odolnost proti HIV u zvířecích modelů. Některé z nich budou nebo již byly zařazeny do klinických testů<sup>35</sup>.

### 3. Vakcíny proti tuberkulóze

Bakterii *Mycobacterium tuberculosis*, která je původcem tuberkulózy, řadíme do řádu *Actinomycetales* a rodu *Mycobacterium*. Jedná se o obligátně aerobní tyčinky, za jejichž objev byla Robertu Kochovi v roce 1905 udělena Nobelova cena.

Neurčitě zařazení *M. tuberculosis* na základě Gramova barvení a také zvýšená rezistence k desinfekčním a terapeutickým přípravkům je patrně způsobena odlišnostmi ve složení buněčné stěny, a to především přítomností kyseliny mykolové.

Zdrojem infekce je nakažený člověk, přičemž infekční částice se šíří pomocí malých kapének, které zůstávají v prostředí infekční po dlouhou dobu, pokud nejsou vystaveny přímému slunečnímu záření. Vdechnuté infekční částice pronikají do terminálních plicních sklípků, kde dochází k rozvoji primární infekce<sup>36</sup>. Po vstupu *M. tuberculosis* do organismu byly popsány tři typy reakce. V ideálním případě dojde ke spontánnímu uzdravení, tj. po prokazatelném proniknutí infekčních částic nebyla detegována infekce, a to ani v latentní formě. Bohužel zatím není znám molekulární mechanismus tohoto procesu. Dalším typem je latentní stadium, u kterého ovšem může dojít k reaktivaci v důsledku oslabení imunitního systému. Posledním typem je akutní infekce, která se projevuje ihned po vstupu *M. tuberculosis* do organismu osob s oslabeným imunitním systémem (AIDS, posttransplantační léčba)<sup>37</sup>.

V plicních sklípcích dochází k fagocytose infekční částice *M. tuberculosis* pomocí makrofágů. V důsledku tvorby kyslíkových radikálů aktivovanými makrofágy v nich nemůže probíhat pomnožení patogenu, ale v mnoha případech nedochází ani k jeho usmrcení. Navíc jsou infekční částice umístěny ve fagosomech, přičemž brání jejich maturaci, tedy splynutí fagosomu s lysosomem za vzniku fagolysosomu, a vytvoření pro virus smrtícího prostředí. Potlačení maturace fagosomů ale není úplné a část populace *M. tuberculosis* je usmrcena<sup>38</sup>. Mechanismus tohoto procesu zatím nebyl u makrofágů objasněn.

Je známo, že makrofágy jsou iniciátory specifické imunitní odpovědi jako buňky prezentující antigen<sup>39</sup>. Makrofágy na svém povrchu exponují bakteriální glykolipidy. Prezentace bakteriálně specifických antigenů na povrchu makrofágu probíhá v kontextu s antigeny MHC I i MHC II molekul. Bakteriální antigeny se po degradaci uvnitř fagolysosomu vážou v endosomálních kompartmentech (antigen-prezentující buňky) na MHC II molekuly. Vzniklé komplexy migrují k buněčné membráně buňky a jsou

exponovány na jejím povrchu. Exponované bakteriální antigeny na povrchu makrofágů vedou k aktivaci CD4+ a CD8+ lymfocytů. K aktivaci makrofágů dochází uvolněním interferonu  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), který je produkován některými populacemi T-lymfocytů, a spolu s TNF $\alpha$  (*z angl.* tumor necrosis alpha) mají synergický účinek. Lymfocyty CD4+ začnou produkovat lymfotoxin  $\alpha$ , zatímco lymfocyty CD8+ a  $\gamma\delta$  (aktivované fragmenty mykobakteriálních lipidů, které vznikají v endozomálních/lysozomálních organelách) produkují perforin a granulysin, jež přímo usmrcují *M. tuberculosis* uvnitř makrofágů<sup>40</sup>. Tímto způsobem je infekce kontrolována a lokalizována v tzv. granulózniích lézích. Oslabením imunitního systému dochází ke ztrátě imunologického dohledu, rozvolnění granulomů a uvolnění *M. tuberculosis* do krevního oběhu a tím k přenosu do dalších tkání a orgánů (kosti, mozek, ledviny, zřídka postihuje také srdce, kosterní svaly, pankreas a štítnou žlázu)<sup>41</sup>.

Po desetiletích zanedbávání prevence je v dnešní době výskyt tuberkulózy (TBC) opět alarmující, obzvláště když se začínají objevovat kmeny *M. tuberculosis* rezistentní k většině dnes dostupných léků<sup>42</sup>. Jedna třetina světové populace je infikována latentní formou *M. tuberculosis*. Globálně též roste incidence TBC, a to především v souvislosti se šířením HIV, asi 13 % HIV pozitivní africké populace je koinfikováno *M. tuberculosis*<sup>43</sup>. Z hlediska prevence má velký význam vakcína *Mycobacterium bovis* nazvaná Bacillus Calmette-Guérin (BCG), vyvinutá na počátku minulého století. Tato vakcína je účinná při imunizaci novorozenců, ale není účinná při prevenci plicních onemocnění u dospělých jedinců<sup>44</sup>. V současné době je snaha nahradit BCG vakcínu novou, efektivnější očkovací látkou nebo vyvinout „podpurnou“ vakcínu, která by účinně stimulovala imunitní odpověď u dospělých. Mezi vhodné kandidáty nahrazující klasickou BCG vakcínu řadíme rekombinantní očkovací látky V1 a V2 (viz tab. I). Antigen 85B (Ag85B) je klíčovou složkou V1 (cit.<sup>45-48</sup>). Tento dobře prostudovaný enzym o velikosti 30 kDa, který se účastní syntézy buněčné stěny *M. tuberculosis*, je u V1 nadprodukován a účinně sekretován. V1 již prošla první fází klinických testů a je velkým příslibem do budoucna. V2 je mutantem BCG, ve kterém je exprimován listeriolylin, který perforuje membránu fagosomu. Navíc byl u tohoto mutantu odstraněn gen pro ureasu, která zvyšuje pH ve fagosomu. Tímto krokem se předešlo případné neutralizaci fagosomu a snížení aktivity listeriolylinu. U experimentálních zvířat byla po vakcinaci a následné infekci pozorována apoptóza infikovaných makrofágů<sup>49</sup>. První fáze klinických testů byla spuštěna koncem roku 2007.

Mezi potenciální „podpurnou“ vakcíny řadíme vakcíny V3, V4 a V5. Vakcína V3 je připravena ze dvou antigenů *M. tuberculosis* Ag85B a ESAT-6 (*z angl.* early secretory antigenic target). Oba antigeny jsou silně imunogenní<sup>50,51</sup>. V současnosti je protein ESAT6 používán také jako klíčová složka nové generace diagnostických testů pro detekci *M. tuberculosis*<sup>52</sup>. První fáze klinických testů s V3 již proběhla v Holandsku, přičemž pacientům byla podána vakcína V3/IC31, kde IC31 značí použité adjuvans. Vakcína

Tabulka I  
Přehled vakcín proti tuberkulóze s jejich původním označením

Vakcíny	Název	Obsažená modifikace/antigen	Fáze klinických testů	Označení v textu
Rekombinantní vakcíny	rBCG30	antigen 85B	I. fáze	V1
	rBCG $\Delta$ ureC:Hly	lysteriolysin, odstraněn gen pro ureasu	I. fáze	V2
Podpůrné vakcíny	Ag85B-ESAT6/TB10.4	antigen 85B, antigen ESAT-6	I. fáze ukončena	V3
	<i>M. tuberculosis</i> 72f	antigen Rv1196, antigen Rv0125	I. fáze	V4
	MVA85A	modifikovaný Ankara virus, antigen 85B	I. fáze	V5

byla shledána bezpečnou a silně imunogenní<sup>53</sup>. Vakcína V4 obsahuje dva antigeny (Rv1196, Rv0125), které jsou velmi zajímavým cílem pro pomocné T-lymfocyty<sup>54</sup>. Vakcína V4/AS02A (adjuvans AS02A) byla podána pacientům v první fázi klinických testů. Byla pozorována dobrá tolerance a také indukce jak humorální, tak buněčné imunitní odpovědi. Vakcína V5 je založena na genové modifikaci viru vakcinie Ankara, která vede k expresi antigenu 85A (člen rodiny Ag85 antigenů). V první fázi klinických testů byla pozorována dobrá tolerance a silná indukce imunitní odpovědi<sup>55</sup>.

Díky silné intervenci celosvětově uznávaných organizací (WHO, EU) se v oblasti prevence TBC dělají zejména v posledních několika letech značné pokroky<sup>56</sup>.

#### 4. Vakcíny proti malárii

Malárie je způsobena prvokem *Plasmodium falciparum*, přenášeným samičkou komára rodu *Anopheles*. K přenosu prvoka dochází slinami infikovaného komára. Během několika minut od kousnutí, kterým se do krevního řečiště uvolní sporozoit (rané vývojové stádium), je možné identifikovat rozvíjející se schizonty (neinfekční stádium životního cyklu prvoka charakteristické rychlým dělením) v hepatocytech. Toto stádium infekce je bez pozorovatelných příznaků. Růst schizontů vede k ruptuře hepatocytů a uvolnění merozoitů (infekční „produkty“ asexuální reprodukce schizontů v hepatocytech) do krve hostitele, kde jsou infikovány erythrocyty. Klinickými symptomy této fáze jsou záchvaty horečky každé 3 nebo 4 dny, což odpovídá hromadnému uvolňování merozoitů z krevních buněk. Po infekci erythrocytů přechází stádium merozoitů do stádia trofozoitů. Část populace trofozoitů pokračuje do schizogenního cyklu (asexuální reprodukce) a druhá část populace přechází do sexuální fáze. V této fázi vznikají mikrogametocyty (samčí) a makrogametocyty (samičí), které jsou uvolněny do krve hostitele a s ní se dostávají do těla komára, kde v jeho střevě proběhne fáze oplodnění (mikrogametocyty vnikají do makrogametocytů), vzniknou nové sporozoit, které jsou krví transportovány do slinné

žlázy<sup>57–62</sup>.

Jednou z možností, jak podpořit rozvoj imunity proti malárii, je často po sobě následující expozice cílového organismu. Přesná povaha imunitní odpovědi (antigenní specifita a rozsah), která přímo redukuje populaci plasmodia v organismu, resp. působí preventivně proti malárii, je zatím neznáma a často simulována jenom na zvířecích modelech. V poslední době se za velmi nadějnou považuje očkovací látka s označením RTS,S (v spojení s AS02 adjuvans). Tato vakcína obsahuje části CSP proteinu (z *angl.* circumsporozoite protein) a epitopy T-lymfocytů spojené s komponenty povrchového antigenu hepatitidy B tak, že dochází k tvorbě imunogenních částic. Klinické studie prokázaly 34% účinnost při prevenci u dospělých pacientů (studie prováděná v Gambii) a 30% účinnost u dětí (studie prováděná v Mozambiku)<sup>63</sup>. Předpokládaným mechanismem účinku této vakcíny je tvorba protilátek proti sporozoitům, které rozpoznají hepatocyty infikované plasmodiem. Pro dosažení vyšší produkce T-lymfocytů se osvědčilo kombinování dvou vektorů: FP9 (drůbeží neštovice, z *angl.* fowlpox virus) a MVA (modifikovaný virus vakcinie Ankara), které obsahovaly sekvenci jednoho z antigenů: TRAP (z *angl.* thrombospondin-related adhesive protein) a CSP. Oba se účastní vstupu sporozoitů do hepatocytu<sup>64–66</sup>. První testy obou vakcín byly provedeny ve Velké Británii a prokázaly signifikantní tvorbu T-lymfocytů a 82% redukcí napadených hepatocytů<sup>66</sup>. V první a druhé fázi klinických testů je momentálně vakcína založená na adenovirovém vektoru exprimujícím CSP a AMA1 (z *angl.* apical membrane antigen) antigen<sup>67,68</sup>. V druhé fázi klinických testů je též vakcína obsahující kombinaci MSP-1 a MSP-2 (z *angl.* merozoite surface proteins) s RESA proteinem (z *angl.* ring-stage-infected erythrocyte surface antigen) z *P. falciparum* a Montadine ISA 720 adjuvans. Testy u 5–9letých dětí z Papuy Nové Guiney prokázaly 62% redukcí výskytu parazita<sup>69</sup>. Dalším poměrně nadějným se ukazuje dlouhý syntetický peptid odvozený od MSP-3, obsahující epitopy z B- a T-lymfocytů. První fáze klinických testů byla provedena v Burkina Faso, přičemž byla u dobrovolníků pozorována výrazná tvorba protilátek<sup>70</sup>. Pro přípravu vakcín se dají

využit i protilátky produkované proti antigenům exprimovaným během sexuální fáze parazita – lze je použít na zastavení oplodnění a vývinu do stádia sporozoitů. Mezi takové antigeny patří povrchové antigeny gametocytů parazita: Pfs25, Pfs28, Pfs48/45 a Pfs230 (cit.<sup>71–73</sup>).

## 5. Závěr

Výzkum v oblasti patogeneze různých onemocnění neustále přináší nové poznatky, které se stávají základem pro návrh a produkci vakcín v zájmu prevence nebo jako látek působících přímo proti původcům onemocnění. Proces vytvoření nové vakcíny od jejího navržení až po zavedení do klinické praxe je časově a finančně náročný. Důraz je kladen na bezpečnost vakcíny a v neposlední řadě také na její efektivnost a ekonomickou relevantnost. Nejnovějším trendem v oblasti vývoje vakcín je využití virových vektorů. Víry jsou samy o sobě značně imunogenní a protilátky, které se po imunizaci takovou vakcínou produkují, jsou u testovaných zvířat velmi efektivní. Komplikací je, že imunitní odpověď u člověka je často slabá nebo získaná imunita pouze dočasná, často je pozorována též výrazná reaktogenita (lokální bolest a zarudnutí). V současnosti jsou nejžádanějšími vakcínami vakcíny proti HIV, malárii, tuberkulóze, hepatitidě B a C, horečce Dengue a japonské encefalitidě. Zavedení účinné vakcíny do klinického užívání konkrétně u HIV, malárie a tuberkulózy je bohužel zatím v nedohlednu.

*Táto práca vznikla za finanční podpory grantu ME 904 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.*

### Seznam použitých zkratk

AVIP	AIDS Vaccine Integrated Project
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin
CA	kapsidový protein
CD4	diferenční skupina povrchových glykoproteinů
CM	cytoplasmatická membrána
env	envelope, prekursor pro povrchové glykoproteiny
ER	endoplasmatické retikulum
gag	group-specific antigen, strukturální polyprotein
gp120	glykoprotein120
gp41	glykoprotein41
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
IN	integráza
MA	matrixový protein
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NC	nukleokapsidový protein
nef	negative regulatory factor
PIC	preintegrační komplex
pol	polymerasa
rev	regulator of virion
RT	reverzní transkriptasa
SU	povrchová podjednotka

tat	trans-activator of transcription
TM	transmembránová podjednotka

### LITERATURA

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>, staženo 21.09.2009.
2. <http://www.who.int/features/qa/71/en/index.html>, staženo 21.09.2009.
3. <http://www.who.int/research/en/>, staženo 14.06.2009.
4. Almond J. W.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 481 (2007).
5. [http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2008/JC1511\\_GR08\\_ExecutiveSummary\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2008/JC1511_GR08_ExecutiveSummary_en.pdf), staženo 7.08.2009.
6. [http://data.unaids.org/pub/Report/2008/who2008globaltbreport\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/Report/2008/who2008globaltbreport_en.pdf), staženo 7.08.2009.
7. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563697\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563697_eng.pdf), staženo 6.10.2010.
8. Poehling K. A., Talbot T. R., Griffin M. R., Craig A. S., Whitney C. G., Zell E., Lexau C. A., Thomas A. R., Harrison L. H., Reingold A. L., Hadler J. L., Farley M. M., Anderson B. J., Schaffner W.: *JAMA* 295, 1668 (2006).
9. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO\\_IVB\\_07.05\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_IVB_07.05_eng.pdf), staženo 22.09.2009.
10. Garland S. M., Steben M., Hernandez-Avila M., Koutsky L. A., Wheeler C. M., Perez G., Harper D. M., Leodolte S., Tang G. W. K., Ferris D. G., Esser M. T., Vuocolo S. C., Nelson M., Railkar R., Sattler C., Barr E.: *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 792 (2007).
11. Lewis P. J., Babiuk L. A.: *Adv. Virus Res.* 54, 129 (1999).
12. Weiner D. B., Kennedy R. C.: *Sci. Am.* 281, 34 (1999).
13. Daheshia M.: *J. Immunol.* 159, 1945 (1997).
14. Silva C. L., Lowrie D. B.: *Immunology* 82, 244 (1994).
15. Lu M., Blacklow S. C., Kim P. S.: *Nat. Struct. Biol.* 2, 1075 (1995).
16. Markosyan R. M., Cohen F. S., Melikyan G. B.: *Mol. Biol. Cell* 14, 926 (2003).
17. Chen B., Vogan E. M., Gong H., Skehel J. J., Wiley D. C., Harrison S. C.: *Nature* 433, 834 (2005).
18. Melikyan G. B., Markosyan R. M., Hemmati H., Delmedico M. K., Lambert D. M., Cohen F. S.: *J. Cell Biol.* 151, 413 (2000).
19. Vogt V. M., v knize: *Retroviruses* (Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E., ed.), kap. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1997.
20. Miller M. D., Farnet C. M., Bushman F. D.: *J. Virol.* 71, 5382 (1997).
21. Bukrinsky M. I., Sharova N., McDonald T. L., Pushkarskaya T., Tarpley W. G., Stevenson M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6125 (1993).
22. Nermut M. V., Fassati A.: *J. Virol.* 77, 8196 (2003).
23. Ferrari G., Humphrey W., McElrath M. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1396 (1997).



24. Jamison D. T., Feachem R. G., Makgoba M. W., Bos E. R., Baingana F. K., Hofman K. J., Rogo K. O. (ed.): *Disease in Sub-Saharan Africa*. World Bank Oxford University Press, Washington, D.C. 2006.
25. de Bruyn G., Rossini A. J., Chiu Y. L., Holmanc D., Elizaga M. L., Frey S. E., Burke D., Evans T. G., Corey L., Keefer M. C.: *Vaccine* 22, 704 (2004).
26. <http://gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102240264.html>, staženo 30.09.2009.
27. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00001136>, staženo 30.09.2009.
28. Hel Z., Johnson J. M., Tryniszewska E., Tsai W., Harrod R., Fillem J., Tartaglia J., Francini G.: *Vaccine* 20, 3171 (2002).
29. Berman P. W., Huang W., Riddle L., Gray A. M., Wrin T., Vennari J., Johnson A., Klaussen M., Prashad H., Köhne Ch., deWit Ch., Gregory T. J.: *Virology* 265, 1 (1999).
30. <http://gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102230089.html>, staženo 30.09.2009.
31. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00002402>, staženo 30.09.2009.
32. Nabel G. J.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 484 (2007).
33. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00384787>, staženo 23.09.2009.
34. Ensoli B.: *Microbs and Infection* 7, 1433 (2005).
35. Johnston H. I., Flores J.: *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 504 (2001).
36. Kaufmann S. H. E.: *Ann. Rheum. Dis.* 61, 54 (2002).
37. Flesch I. E. A., Kaufmann S. H. E.: *Immunobiology* 189, 316 (1993).
38. Buc M.: *Imunológia*, str. 32. VEDA Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava 2001.
39. Kaufmann S. H. E.: *Nat. Rev. Immunol.* 1, 20 (2001).
40. Banchereau J., Steinman R. M.: *Nature* 392, 245 (1998).
41. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/), staženo 08.06.2009.
42. Dye C.: *Lancet* 367, 938 (2006).
43. Andersen P., Doherty T. M.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 656 (2005).
44. Horwitz M. A., Harth G.: *Infect. Immun.* 71, 1672 (2003).
45. Belisle J. T., Vissa V. D., Sievert T., Takayama K., Brennan P. J., Besra G. S.: *Science* 276, 1420 (1997).
46. Wiker H. G., Harboe M.: *Microbiol. Rev.* 56, 648 (1992).
47. Rambukkana A., Das P. K., Chand A., Baas J. G., Groothuis D. G., Kolk A. H.: *Scand. J. Immunol.* 33, 763 (1991).
48. Winau F.: *Immunity* 24, 105 (2006).
49. Agger E. M., Rosenkrands I., Olsen A. W., Hatch G., Williams A., Kritsch C., Lingnau K., von Gabain A., Andersen C. S., Korsholm K. S., Andersen P.: *Vaccine* 24, 5452 (2006).
50. Dietrich J., Andersen C., Rappuoli R., Doherty T. M., Jensen Ch. G., Andersen P.: *J. Immunol.* 177, 6353 (2006).
51. Pai M., Riley L.W., Colford J. M. Jr.: *Lancet Infect. Dis.* 4, 761 (2004).
52. Andersen P.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 486 (2007).
53. Skeiky Y. A. W., Alderson M. R., Owendale P. J., Guderian J. A., Brandt L., Dillon D. C., Campos-Neto A., Lobet Y., Dalemans W., Orme I. M., Reed S. G.: *J. Immunol.* 172, 7618 (2004).
54. McShane H., Pathan A. A., Sander C. R., Keating S. M., Gilbert S. C., Huygen K., Fletcher H. A., Hill A. V. S.: *Nat. Med.* 10, 1240 (2004).
55. Andersen P.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 486 (2007).
56. Sturm A., Amino R., van de Sand C., Regen T., Retzlaff S., Rennenberg A., Krueger A., Pollok J. M., Menard R., Heussler V. T.: *Science* 313, 1287 (2006).
57. Cogswell F. B.: *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 26 (1992).
58. <http://www.cdc.gov/malaria/>, staženo 28.5.2009.
59. Fairley N. H.: *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 40, 621 (1947).
60. Garnham P. C. C., v knize: *Malaria* (Kreier J., ed.), str. 95, sv. 1. Academic Press, Inc., Orlando 1980.
61. Krotoski W. A., Collins W. E., Jumper J. R.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22, 443 (1973).
62. Shinn S. C., Vanderberg J. P., Terzakis J. A.: *J. Protozool.* 29, 448 (1982).
63. Robson K. J. H., Frevert U., Reckmann I., Cowan G., Beier J., Scragg I. G., Takehara K., Bishop D. H. L., Pradel G., Sinden R., Saccheo S., Muller H. M., Crisanti A.: *EMBO J.* 14, 3883 (1995).
64. Alonso P. L., Sacarlal J., Aponte J. J., Leach A., Macete E., Milman J., Mandomando I., Spiessens B., Guinovart C., Espasa M., Bassat Q., Aide P., Ofori-Anyinam O., Navia M. M., Corachan S., Ceuppens M., Dubois M. C., Demoitié M. A., Dubovsky F., Menéndez C., Tornieporth N., Ballou W. R., Thompson R., Cohen J.: *Lancet* 364, 1411 (2004).
65. Alonso P. L., Sacarlal J., Aponte J. J., Leach A., Macete E., Aide P., Sigauque B., Milman J., Mandomando I., Bassat Q., Guinovart C., Espasa M., Corachan S., Lievens M., Navia M. M., Dubois M. C., Menéndez C., Dubovsky F., Cohen J., Thompson R., Ballou W. R.: *Lancet* 366, 2012 (2005).
66. Webster D. P., Dunachie S., Vuola J. M., Berthoud T., Keating S., Laidlaw S. M., McConkey S. J., Poulton I., Andrews L., Andersen R. F., Bejon P., Butcher G., Sinden R., Skinner M. A., Gilbert S. C., Hill A. V. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4836 (2005).
67. <http://www.malariavaccine.org/rd-research-programs.php>, staženo 30.09.2009.
68. Stewart V. A., McGrath S. M., Dubois P. M., Pau M. P., Mettens P., Shott J., Cobb M., Burge J. R., Larson D., Ware L. A., Demoitie M. A., Weverling G. J., Bayat B., Custers J. H. H. V., Dubois M. C., Cohen J., Goudsmit J., Heppner D. G., Jr.: *Infect. Immun.* 75, 2283 (2007).
69. Genton B., Al-Yamana F., Betuela I., Anders R. F., Saul A., Baea K., Mellombo M., Taraika J., Brown G. V., Pye D., Irving D. O., Felger I., Beckb H. P.,

- Smith T. A., Alpers M. P.: *Vaccine* 22, 30 (2003).
71. Li S., Locke E., Bruder J., Clarke D., Doolan D. L., Havenga M. J. E., Hill A. V. S., Liljestrom P., Monath T. P., Naimi H. Y., Ockenhouse Ch., Tang D. C., Van Kampen K. R., Viret J. F., Zavala F., Dubovsky F.: *Vaccine* 25, 2567 (2007).
72. Thera M. A., Doumbo O. K., Coulibaly D., Diallo D. A., Sagara I., Dicko A., Diemert D. J., Heppner D. G., Jr., Stewart V. A., Angov E., Soisson L., Leach A., Tucker K., Lyke K. E., Plowe CH. V.: *PLoS Clin. Trials* 1, 34 (2006).
73. Todryk S. M., Hill A. V. S.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 489 (2007).

**P. Grznárová and J. Lipov** (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Advances in Development of Vaccines Against HIV, Tuberculosis and Malaria**

The research in vaccine development is growing very intensively. More than 95 clinical trials of potential HIV vaccines have been performed in last 25 years. Currently, only two HIV vaccine candidates are in Phase III trials and one in Phase II trial. Tuberculosis is another problematic disease of the 21st century. Calmette-Guérin vaccine from *Mycobacterium bovis* bacillus is the only one used for immunization against tuberculosis. Unfortunately, it is effective only in newborns but not in adults; thus, efforts are still put to prepare an effective vaccine for immunization and treatment of adults. Malaria killed more than 1 million people in 2006, most of them were children. We still do not have any vaccine effective in prevention of malaria; nevertheless, some vaccine candidates appeared and are now in Phase I or Phase II trial.



Na adrese <http://www.chemicke-listy.cz/authors/index.html> naleznete nový rejstřík autorů publikujících v našem časopise od roku 1997.

*redakce*

---

## ÚPRAVA VODY S OBSAHEM HUMINOVÝCH LÁTEK

MARTIN PIVOKONSKÝ<sup>a</sup>, LENKA PIVOKONSKÁ<sup>a</sup>, PETRA BUBÁKOVÁ<sup>a,b</sup> a VÁCLAV JANDA<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav pro hydrodynamiku AV ČR, v.v.i. Pod Patankou 5, 166 12 Praha 6, <sup>b</sup> Ústav technologie vody a prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Vaclav.Janda@vscht.cz, pivo@ih.cas.cz

Došlo 4.2.10, přijato 16.3.10.

**Klíčová slova:** přírodní organické látky, huminové látky, koagulace, agregace, chemická úprava vody, sorpce, iontová výměna, membránová filtrace

### Obsah

1. Úvod
2. Huminové látky
  - 2.1. Původ huminových látek
  - 2.2. Charakter a vlastnosti huminových látek
3. Chemická úprava povrchových vod s obsahem huminových látek
  - 3.1. Mechanismy koagulace
    - 3.1.1. Neutralizace náboje
    - 3.1.2. Adsorpce na hydroxidech kovů
  - 3.2. Koagulační činidla
    - 3.2.1. Hydrolyzující koagulační činidla
    - 3.2.2. Kationtové polyelektrolyty
4. Alternativní metody úpravy povrchových vod s obsahem huminových látek
  - 4.1. Sorpční procesy
  - 4.2. Iontová výměna
  - 4.3. Membránová filtrace
  - 4.4. Oxidační a biologické metody
5. Závěr

### 1. Úvod

Přírodní organické látky (NOM – Natural Organic Matter) jsou významnou součástí povrchových vod<sup>1</sup>. Podle velikosti částic se NOM dělí na rozpuštěné (DOM – Dissolved Organic Matter) a nerozpuštěné (POM/SOM – Particulate/Suspended Organic Matter). Dohodou byla velikostní hranice mezi rozpuštěnými a nerozpuštěnými organickými látkami stanovena<sup>2</sup> na 0,45 μm. Zásadní význam z hlediska výzkumu i technologie úpravy vody mají především DOM.

Jedná se o složitou směs aromatických a alifatických uhlovodíkových struktur s mnoha typy funkčních skupin (např. amidové, karboxylové, hydroxylové, ketonické a další funkční skupiny) s různými fyzikálními a chemickými vlastnostmi<sup>3,4</sup>. DOM mohou být původu allochtonního (tj. látky, které se do vody dostávají z okolního prostředí) a autochtonního (tzn. látky, které ve vodě přímo vznikají). Mezi allochtonní organické látky řadíme výluhy z půdy a sedimentů (půdní a rašelinný humus, výluhy z listů a tlejícího dřeva), mezi autochtonní pak produkty životní činnosti rostlinných a živočišných organismů a bakterií a látky vzniklé biologickými a chemickými přeměnami odumřelých buněk<sup>2,5</sup>. DOM jsou tvořeny huminovými látkami (huminové kyseliny a fulvokyseliny) a látkami nehuminového charakteru (především proteiny a polysacharidy). V povrchových vodách je většinou obsah huminových látek vyšší 60–75 % (cit.<sup>3,6</sup>), nehuminové látky se ve zvýšených koncentracích vyskytují převážně ve vegetačním období při masovém rozvoji fytoplanktonu<sup>3</sup>.

### 2. Huminové látky

Převažujícím typem NOM v mnoha povrchových zdrojích vody jsou huminové látky<sup>7</sup>. Huminové látky jsou složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí několika stovek až desítek tisíců<sup>4,8</sup>. Huminové látky se ve vodě vyskytují jako jednotlivé molekuly, nebo jsou vzájemně spojené slabými vazebnými interakcemi do supramolekulárních struktur<sup>9</sup> a mohou se vyskytovat i jako micelární koloidy s hydrofobní částí molekuly umístěnou uvnitř a hydrofilní vně molekuly<sup>10</sup>.

#### 2.1. Původ huminových látek

Vznik huminových látek není zcela objasněn a existuje několik teorií jejich vzniku. Jedná se např. o degrační (ligninovou) a syntetickou (polyfenolovou) teorii<sup>11</sup>. Degradáční teorie popisuje vznik huminových látek mikrobiálním rozkladem odumřelého rostlinného materiálu, kdy z těžko rozložitelných látek jako je lignin, kutin nebo melanin vznikají vysokomolekulární huminy. Ty jsou pak oxidací postupně transformovány přes huminové kyseliny na fulvokyseliny a dále na ještě menší molekuly. Pokud degrační mechanismus pokračuje, jsou huminové látky postupně a velmi pomalu rozloženy až na oxid uhličitý a vodu. Syntetická teorie naopak vychází z předpokladu, že rostlinné tkáně jsou nejprve degradovány na malé molekuly (karboxylové kyseliny, fenoly atd.) a z nich se pak syntézou tvoří huminové látky. Nejprve by tedy vznikaly fulvokyseliny, až pak huminové kyseliny a nakonec huminy.

Pravděpodobné je, že oba mechanismy existují vedle sebe, mohou se i různě prolínat, např. degradaci ligninu nejprve vzniknou malé molekuly, z nichž se syntetizují huminové kyseliny a ty jsou pak oxidací a fragmentací přeměněny na fulvokyseliny. Ve vodních ekosystémech zřejmě dominuje degradační mechanismus, zatímco v terestrických ekosystémech převažuje syntéza.

## 2.2. Charakter a vlastnosti huminových látek

Huminové látky mají převážně aromatický charakter, kdy aromatická jádra bývají vzájemně spojena alifatickými, často cyklickými řetězci a svou povahou se řadí do skupiny polyfenolů a polykarboxylových kyselin<sup>8,12</sup>. Typickými funkčními skupinami přítomnými ve struktuře huminových látek jsou především karboxylové a hydroxylové, ale i methoxylové a karbonylové skupiny. Tyto funkční skupiny mohou být vázány jak na aromatických jádrech, tak i v postranních řetězcích. Kromě aromatických jader byly v makromolekulách huminových látek nalezeny i chinoidní a olefinové struktury<sup>13</sup>. Huminové látky jsou tvořeny převážně uhlíkem, dále kyslíkem, vodíkem, dusíkem, ale také sírou<sup>5</sup>.

Huminové látky lze rozdělit podle chemických a fyzikálně-chemických vlastností na humusové kyseliny (huminové kyseliny, fulvokyseliny, hmatomelanové kyseliny), huminy a humusové uhlí<sup>5,14</sup>. Všechny skupiny jsou si strukturně podobné, liší se molekulovou hmotností, obsahem funkčních skupin, kyselostí, kompletačními schopnostmi a rozpustností v některých rozpouštědlech. Huminy a humusové uhlí jsou ve vodě prakticky nerozpustné, a proto jsou z hydrochemického hlediska významné pouze humusové kyseliny<sup>5</sup>.

Většina autorů rozlišuje jen tři skupiny huminových látek, a to huminové kyseliny, fulvokyseliny a huminy<sup>8</sup>. Huminové kyseliny jsou rozpustné v zásadách, ale nerozpustné v kyselinách, fulvokyseliny jsou rozpustné v zásadách i v kyselinách a huminy nejsou rozpustné ani v kyselinách ani v zásadách<sup>8,11</sup>. Při hodnotě pH 1 se huminové kyseliny z roztoku sráží, zatímco fulvokyseliny zůstávají v rozpuštěné formě. Díky své vyšší rozpustnosti bývají fulvokyseliny v přírodních vodách v převaze<sup>6</sup>.

Fulvokyseliny mají ve srovnání s huminovými kyselinami nižší molekulové hmotnosti, obsahují méně aromatických struktur, více alifatických postranních řetězců a mají více homogenní strukturu. Hranice mezi oběma typy humusových kyselin je však obtížně stanovitelná<sup>11,15–18</sup>. Fulvokyseliny a huminové kyseliny se liší i elementárním složením. Názory na procentuální zastoupení jednotlivých prvků v huminových látkách se v literatuře různí, což je pravděpodobně způsobeno různorodostí huminových látek v jednotlivých zdrojích vody. Fulvokyseliny jsou tvořeny 46–55 % uhlíkem, 37–50 % kyslíkem, 4–5 % vodíkem a i nízkým obsahem dusíku a síry. Huminové kyseliny naopak obsahují 50–57 % uhlíku, 34–38 % kyslíku, 4–6 % vodíku a také dusík a síru. Většina autorů se shoduje na tom, že fulvokyseliny mají ve srovnání s huminovými kyselinami vyšší procentuální obsah kyslíku a obvykle

nižší procentuální obsah uhlíku<sup>5,19</sup>. Fulvokyseliny obsahují dále až dvakrát více karboxylových skupin než huminové kyseliny, ale názory na obsah fenolových a hydroxylových skupin se v literatuře rozcházejí. Žáček<sup>20</sup> uvádí, že fulvokyseliny obsahují více fenolových a hydroxylových skupin ve srovnání s huminovými kyselinami, naopak Watt a Peuravuori<sup>15,17</sup> uvádějí poměr opačný.

Vlastnosti huminových látek, jako je rozpustnost ve vodě, schopnost agregace a disociace, nábojové poměry či schopnost vytvářet komplexy s kovovými ionty, úzce souvisí s jejich složením, které je ovlivněno humifikačními procesy<sup>21</sup>. Vedle těchto procesů jsou také významně ovlivněny velikostí jednotlivých molekul a částic, stupněm jejich dispergace (pravé nebo koloidní roztoky), polaritou, která je dána charakterem skeletu (aromatický či alifatický) a hlavně druhy, počty a disociačními schopnostmi funkčních skupin<sup>5</sup>.

Ve většině přírodních vod se při běžných hodnotách pH huminové látky vyskytují jako negativně nabitě, povrchově aktivní makromolekuly<sup>22</sup>. Jejich záporný náboj je dán přítomností funkčních skupin, zejména karboxylových a hydroxylových<sup>8</sup>. Přítomnost těchto skupin vázaných na huminovém skeletu je i jednou z příčin kyselosti vod s vysokou koncentrací huminových látek. Zejména karboxylové skupiny mají relativně silně kyselý charakter (disociační konstanty jsou řádu  $10^{-2}$ – $10^{-5}$ ), zatímco hydroxylové skupiny jsou jen slabě kyselé (disociační konstanty řádu  $10^{-9}$ – $10^{-11}$ )<sup>23</sup>. Protože fulvokyseliny obsahují více karboxylových skupin než huminové kyseliny, jsou i výrazně kyselé<sup>18,19</sup>. Kyselost huminových látek je dále ovlivněna rozmístěním karboxylových skupin v molekule, ale také přítomností ostatních funkčních skupin, jako jsou např. polární skupiny v blízkosti skupin karboxylových, které snižují jejich kyselost. Zásadní vliv na pH mají zejména substituenty v poloze *ortho* vůči karboxylové skupině<sup>19</sup>.

Kromě hodnot disociačních konstant přítomných karboxylových a hydroxylových skupin je kyselost huminových látek ovlivněna také polaritou (dipólovým momentem) molekul. Polarita molekul huminových látek vzniká na základě nerovnoměrného rozložení náboje na jejich povrchu daného přítomností polárních skupin (–OH, –COOH, –OCH<sub>3</sub>). Obecně platí, že čím je polarita huminových látek vyšší, tím vyšší je i jejich kyselost<sup>21</sup>.

Mezi významné vlastnosti huminových látek patří dále schopnost tvorby nejrůznějších komplexů především s vícemocnými kationty. Tato vlastnost je ovlivněna přítomností karboxylových a fenolových skupin a také aromaticitou molekuly<sup>14,19</sup>. Schopnost tvorby komplexů se zvyšuje se vzrůstající hodnotou pH a jejich rozpustnost závisí na hmotnostním poměru obou složek: čím je poměrné zastoupení kationtů větší, tím je rozpustnost komplexů menší.

Pro vody s obsahem huminových látek je typická nejen vysoká koncentrace těchto látek, ale také nízký obsah vápníku, hořčíku a hydrogenuhličitanových iontů, nízká hodnota pH a KNK<sub>4,5</sub> a často také zvýšený obsah hliníku<sup>5</sup>, což jsou typické rysy vod v horských oblastech

nebo horních částech toků. Ve většině případů bývají nevyhovující i některé senzorké vlastnosti vody, jako je barva, chuť a zápach<sup>24</sup>.

### 3. Úprava povrchových vod s obsahem huminových látek

Huminové látky mohou být z vody odstraněny pomocí koagulačně/flokulačních procesů, membránovou filtrací, sorpčními procesy, iontovou výměnou a částečně také oxidačními a biochemickými procesy<sup>25–28</sup>. Účinnost odstranitelnosti huminových látek je závislá především na velikosti, tvaru a polaritě jejich molekul<sup>11,21,27</sup>. Ve vodě s nízkou hodnotou pH tvoří huminové látky poměrně velké agregáty molekul s nehomogenní strukturou a vyčnívajícími funkčními polárními skupinami do vody (huminové látky jsou i povrchově aktivní – snižují povrchové napětí vody), což umožňuje jejich poměrně snadnou separovatelnost. Naopak s rostoucí hodnotou pH vody nebo s rostoucí koncentrací huminových látek se velikost agregátů zmenšuje, ve vodě více disociují, vzájemně se odpuzují a jsou z vody hůře odstranitelné<sup>3</sup>. Obecně platí, že vysokomolekulární huminové kyseliny jsou většinou úpravárenských procesů z vody snadněji odstranitelné než nízkomolekulární fulvokyseliny<sup>14,29</sup>. Huminové látky jako celek jsou pak snáze odstranitelné než organické látky nehuminové povahy, jako jsou polysacharidy a proteiny, které jsou součástí NOM<sup>25,30</sup>.

Většina huminových látek se ve vodách vyskytuje v makromolekulární formě se záporným povrchovým nábojem. Charakter huminových látek umožňuje pro jejich odstranění z vody využít chemickou technologii založenou na jejich destabilizaci a následné agregaci. Nezbytným předpokladem dosažení vysokých účinností odstranění huminových látek je především optimalizace reakčních podmínek koagulace, tj. reakčního pH a dávky koagulačního činidla<sup>31</sup>.

Proces chemické úpravy huminových vod zahrnuje hydrolyzu iontů koagulačního činidla a tvorbu polymerních iontů (hydroxopolymerů), destabilizaci částic huminových látek, agregaci destabilizovaných částic a separaci vzniklých agregátů<sup>3</sup>. Optimální reakční pH pro úpravu vod s huminovými látkami je v oblasti pH 5 až 6,5, kdy jsou destabilizovány i problematické nízkomolekulární frakce huminových látek<sup>5,32–34</sup>. Dostatečná rychlost reakcí koagulačního činidla s huminovými látkami je nutným předpokladem pro jejich dobré odstranění z vody. Na účinnosti koagulace huminových a i dalších látek je přímo závislá účinnost následujících technologických procesů (agregace a separace). Koagulace zahrnuje řadu hydrolytických, diasociačních, srážecích, oxidačně-redukčních a komplexotvorných reakcí<sup>20</sup>.

#### 3.1. Mechanismy koagulace

Koagulace huminových látek probíhá vesměs dvěma základními procesy. Jedná se o neutralizaci náboje humi-

nových látek hydroxopolymerů koagulačního činidla a sorpci huminových látek na hydroxidech hliníku a železa. O tom, který koagulační proces bude převažovat, rozhoduje především hodnota pH vody, koncentrace huminových látek a typ a dávka koagulačního činidla<sup>8,23,33,35,36</sup>.

##### 3.1.1. Neutralizace náboje

Při neutralizaci náboje hydroxopolymerů dochází k destabilizaci částic huminových látek nezhydrolyzovanými či částečně zhydrolyzovanými ionty koagulačního činidla. Objevují se elektrostatické interakce mezi kladně nabitými hydroxopolymerů a anionty huminových látek a tvoří se nerozpustné nábojově neutrální produkty<sup>33,37</sup>. Tyto primární elektroneutrální částice se svou velikostí příliš neliší od původních organických makromolekul nebo jejich agregátů. Tento mechanismus se uplatňuje v úzké oblasti pH (4,0–6,0), proto nutným předpokladem účinné koagulace je optimalizace pH upravované vody<sup>3,32,37</sup>. Mechanismus je typický pro vody s vysokou koncentrací huminových látek, s nízkou koncentrací hydrogenuhličitanových iontů, nízkou hodnotou pH a nízkým obsahem solí<sup>23</sup>. Při destabilizaci huminových látek neutralizací náboje je dávka koagulačního činidla velmi úzce závislá na koncentraci huminových látek<sup>21</sup>.

##### 3.1.2. Adsorpce na hydroxidech kovů

Při adsorpčních mechanismech koagulace dochází k sorpci huminových látek na sraženině hydroxidů hliníku či železa<sup>21,32</sup>. Tento mechanismus se uplatňuje především v oblasti pH 6,0–8,0, kdy dochází k rychlé tvorbě amorfních sraženin  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , k sorpci huminových látek a vzniku sraženin hlinitých humátů<sup>32,37</sup>. Adsorpční mechanismus je typický pro vody s nižší koncentrací huminových látek, s vyšším obsahem hydrogenuhličitanových iontů, vyšší hodnotou pH a vyšším obsahem solí<sup>23</sup>. Ve srovnání s mechanismem koagulace částic neutralizací náboje je jeho účinnost nižší a vzrůstá s rostoucí dávkou koagulačního činidla. Proces je méně závislý na hodnotě pH, teplotě a obsahu solí.

#### 3.2. Koagulační činidla

Huminové látky se v povrchových vodách vyskytují nejčastěji jako organické anionty, které vykazují silnou afinitu ke kladně nabitým čídlům. Proto se pro odstraňování huminových látek chemickou úpravou používají kladně nabitá koagulační činidla, nejčastěji vznikající ze solí trojmocného železa a hliníku<sup>36</sup>, částečně také organické polyelektrolyty syntetického či přírodního původu<sup>36,38</sup>.

##### 3.2.1. Hydrolyzující koagulační činidla

Názory na to, zda jsou pro úpravu huminových vod vhodnější hlinitá nebo železitá koagulační činidla nejsou v literatuře jednotné, projevuje se zřejmě odlišný charakter studovaných typů vod. Rozmezí pH, kdy jsou hlinitá činidla maximálně účinná (pH 5,8–6,2) se překrývá s optimální hodnotou pH pro odstranění huminových látek, viz. výše. Tvorba suspenze hydroxidu hlinitého je energeticky méně

náročná oproti tvorbě suspenze hydroxidu železitého a zbytková koncentrace hliníku v upravené vodě bývá nižší než zbytková koncentrace železa<sup>3</sup>.

Naopak z výsledků Fearinga, Jacangela, Nissinena a dalších<sup>28,36,39</sup> vyplývá, že při použití železitých činidel je dosahováno vyšších účinností odstranění huminových látek než při použití hlinitých činidel. Proti hlinitým činidlům hovoří také jejich vyšší cena a pomalejší průběh hydrolyzy při velmi nízkých teplotách vody. Přesto je ve vodárenské praxi pro úpravu vod s obsahem huminových látek nejvíce používán právě síran hlinitý  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$ . Další výhodou využití železitých koagulačních činidel související s vyšší molekulovou hmotností železa je skutečnost, že k účinné destabilizaci huminových látek je obvykle zapotřebí nižších dávek železa ve srovnání s hliníkem<sup>3</sup>.

Dalšími využívanými koagulačními činidly jsou polyaluminium chlorid (PAC) a polyaluminium sulfát (PAS). Tato koagulační činidla jsou účinnější v širším rozmezí pH a teplot než síran hlinitý a poskytují obvykle delší filtrační cykly<sup>40</sup> při následné separaci suspenze. Poněkud sporné je již tvrzení, že při použití PAC a PAS jsou nižší zbytkové koncentrace hliníku v upravené vodě a účinnost odstranění huminových látek bývá vyšší než u klasických hlinitých činidel<sup>40</sup>. Řada prací prokázala, že naopak při použití PAC je účinnost odstranění huminových látek v porovnání se síranem hlinitým nižší a naopak zbytkové koncentrace hliníku vyšší<sup>41</sup>.

### 3.2.2. Kationtové polyelektrolyty

V poslední době jsou ve světě pro chemickou úpravu vod s huminovými látkami používány také kationtové polyelektrolyty (KPE) a to samostatně nebo v kombinaci s běžnými koagulačními činidly<sup>36,42,43</sup>. Koagulace huminových látek pomocí KPE je založena na principu nábojové neutralizace molekul huminových látek, případně na principu tvorby mezičásticových můstků a účinnost koagulace se zvyšuje s jejich rostoucí nábojovou hustotou a molekulovou hmotností<sup>42,43</sup>. Často uváděným argumentem pro použití KPE je u nich především malá závislost účinnosti odstranění humátů na hodnotě pH a nižší produkce kalu, navíc méně zvodnělo než při použití běžných koagulačních činidel<sup>42</sup>. Někteří autoři<sup>41</sup> však prokázali, že žádný z kationktivních polyelektrolytů nebyl schopen upravit vodu s obsahem huminových látek do stejné kvality, jako hydrolyzující koagulační činidla. Dalším faktem zůstává, že doposud nebyl zcela objasněn jejich možný vliv na zdraví člověka a životní prostředí<sup>43</sup>.

V posledních letech jsou také prováděny pokusy s využitím přírodních polyelektrolytů, jako je chitosan a tannin pro úpravu vod s obsahem huminových látek. Chitosan, slabě bazický kationtový aminopolysacharid, je používán v kombinaci s hlinitými nebo železítými solemi nebo samostatně. Koagulace probíhá mechanismem nábojové neutralizace (podobně jako u jiných kladně nabitých polymerů), kdy při nízkých hodnotách pH (4,0–6,0) částečně disociují jeho iminoskupiny<sup>38,43</sup>. Použitelnost chitosanu je v širokém rozsahu pH. Chitosan je s velmi dobrými výsledky použitelný pro odstraňování zákalu ze surové

vody, jeho použití pro odstranění huminových látek je však značně diskutabilní a výsledky jsou nejednoznačné (cit.<sup>38,44,45</sup>). Některé práce dokonce prokázaly, že přírodní polyelektrolyty mohou být i zdrojem sekundárního znečištění upravené vody organickými látkami<sup>41</sup>.

## 4. Alternativní metody úpravy povrchových vod s obsahem huminových látek

Vedle konvenčních (chemických) procesů lze k odstranění huminových látek při výrobě pitné vody využít některé další postupy. Jedná se především o sorpční procesy, iontovou výměnu, membránovou filtraci a oxidační a biologické metody.

### 4.1. Sorpční procesy

Huminové látky lze z vody odstranit také sorpčními procesy. Spektrum vhodných sorbentů je široké, od aktivního uhlí, hydratovaných oxidů kovů až po hlinitokřemičitan<sup>36,46</sup>. Při sorpci se obvykle uplatňuje fyzikální adsorpce i chemisorpce. Projevuje se vliv přitažlivých van der Waalsových sil, vodíkových můstků a elektrostatických interakcí<sup>46</sup>. Množství huminových látek zachycených v sorbentu závisí na jeho vlastnostech, charakteru a koncentraci huminových látek, charakteru surové vody a reakčních podmínkách<sup>47</sup>.

Občas jsou huminové látky odstraňovány z vody sorpcí na práškovém nebo granulovaném aktivním uhlí<sup>46</sup>. Huminové látky se na povrchu nepolárního aktivního uhlí sorbují především díky svým hydrofobním částem makromolekuly. To je zřejmě jeden z důvodů nižší sorpční schopnosti fulvokyselin oproti huminovým kyselinám<sup>12,26</sup>.

Fettig a McCreary<sup>46,48</sup> však naopak tvrdí, že nízkomolekulární huminové látky jsou lépe adsorbovány než vysokomolekulární, protože mohou vniknout až do mikropórů aktivního uhlí. Účinnost odstranění huminových látek sorpcí na aktivní uhlí je tedy ovlivněna i velikostí pórů aktivního uhlí a jeho sorpčním povrchem. Je vhodné použít sorbent, jehož rozměry pórů jsou řádově shodné s rozměry huminových látek<sup>26,46</sup>.

Účinnost sorpce huminových látek na aktivním uhlí je dále ovlivněna především hodnotou pH. Přednostně probíhá při nízkých hodnotách pH (cit.<sup>26,36,48,49</sup>), kdy je povrchový náboj aktivního uhlí kladný a snižuje se stupeň disociace funkčních skupin huminových látek a tím klesá i jejich povrchový náboj<sup>26,46</sup>.

K odstranění huminových látek z vody lze také využít sorpci na jílovitých minerálech, např. aluminosilikátech, oxidech a hydroxidech železa, hliníku a manganu, oxidech křemíku, uhličitanech atd.<sup>50</sup>. Princip adsorpce huminových látek na jílovité minerály spočívá v interakci karboxylových skupin organických molekul s povrchovými hydroxylovými skupinami jílovitých částic. Ty jsou ve struktuře minerálu zakotveny trojmocnými ionty<sup>43</sup>. Adsorpce huminových látek na povrchy minerálů probíhá přednostně také při nízkých hodnotách pH (cit.<sup>49</sup>).

Názory na vliv molekulové hmotnosti huminových látek na jejich sorpční schopnost na povrchy minerálů jsou opět nejednotné. Hur, Meier a další<sup>47,51</sup> se domnívají, že se na površích minerálů přednostně adsorbují vysokomolekulární silně aromatické huminové látky. Naopak McCreary a Matilainen<sup>24,48</sup> tvrdí, že nejlépe se adsorbují nízkomolekulární huminové látky, protože mají lepší přístup k povrchu minerálů. Weerd<sup>52</sup> se domnívá, že svým způsobem mají pravdu všichni tito autoři, protože při krátkodobém kontaktu minerálů se směsí různorodých huminových látek se nejprve sorbují nízkomolekulární látky, ale s prodlužující se dobou kontaktu jsou z vazebných míst postupně vytlačovány látkami vysokomolekulárními. Hlinitokřemičitany, např. kaolín, montmorillonit nebo illit se z jílovitých sorbentů pro separaci huminových látek z vody používají nejčastěji<sup>43</sup>. Nejvyšších účinností je dosaženo při použití kaolinu, který má nejvyšší počet vazebných míst vhodných k adsorpci huminových látek (v povrchových strukturách obsahuje nejvíce trojmocného hliníku)<sup>43</sup>.

Z oxidů kovů jsou pro sorpci huminových látek nejvíce používány oxidy železa (geothit a hematit), hydratované oxidy hliníku (gibbsit) a oxidy křemíku<sup>43</sup>. Sorpci na oxidech kovů se lépe odstraňují huminové kyseliny oproti fulvokyselinám a to zřejmě kvůli vyšším molekulovým hmotnostem, vyšší hydrofobicitě a aromaticitě molekul. Vliv má zřejmě také odlišný počet karboxylových skupin<sup>47,51</sup>.

Ze všech sorbentů je však při odstraňování huminových látek dosaženo nejvyšších účinností při použití aktivního uhlí. Dosažované účinnosti se obvykle pohybují v rozsahu 60–80 % (cit.<sup>36</sup>) pro (relativně) čerstvé aktivní uhlí. Účinnost sorpce huminových látek dále klesá od oxidů kovů přes hlinitokřemičitany až po polymerní pryskyřice<sup>43,46,47</sup>. Sorpční kapacita, a tedy i praktická životnost, aktivního uhlí však není pro huminové látky nijak záračná, takže se vzhledem k ceně aktivního uhlí tento proces v praxi neujal. Sorpční procesy se vůbec vzhledem k vysokým investičním i provozním nákladům a náročné regeneraci sorbentů obvykle nevyužívají jako samostatný technologický prvek, ale slouží k dodatečnému snížení koncentrace huminových látek např. po předchozí chemické úpravě<sup>50</sup>.

#### 4.2. Iontová výměna

Vzhledem ke kyselé povaze huminových látek lze pro jejich odstranění z vody použít anexy<sup>22,44</sup>.

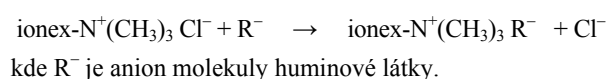
Existují dva mechanismy zachytu huminových látek ve struktuře ionexové pryskyřice, a to iontová výměna a adsorpce. Při iontové výměně dochází ke specifickým interakcím mezi povrchovými karboxylovými skupinami huminových látek a funkčními skupinami ionexu. Při mechanismu povrchové adsorpce se huminové látky zachytí na vnitřní povrch ionexu vlivem Van der Waalových, vodíkových a hydrofobních vazeb aniž interagují s jeho funkčními skupinami<sup>25,53,54</sup>. O tom, který mechanismus bude převažovat, rozhoduje především hodnota pH. Při

velmi nízkém pH se může uplatnit mechanismus adsorpce (huminové látky nejsou disociovány, resp. jejich disociace je potlačena), při vyšším pH je hlavním mechanismem iontová výměna (huminové látky jsou více disociovány). V neutrální oblasti se mohou uplatňovat oba výše popsané mechanismy, obecně ale převažuje mechanismus iontové výměny<sup>53–55</sup>. Při vysoké hodnotě pH se humáty na anexech již zachycovat nebudou, neboť anionty huminových látek se fyzikálně na skeletu ionexu sorbovat nemohou a iontová výměna vzhledem k vysoké koncentraci hydroxidových iontů také nemůže probíhat.

Odstranitelnost huminových látek iontovou výměnou bývá přibližně 80 % a více a závisí především na jejich vlastnostech (molekulové hmotnosti a polaritě) a vlastnostech použitého ionexu (typ skeletu, velikost pórů, slabě bazický anex nebo silně bazický anex). Vliv mají samozřejmě i další parametry, např. doba kontaktu upravované vody s ionexem<sup>25,53,55</sup>. Podle Bolta a Crouea<sup>22,27,55</sup> jsou iontovou výměnou snadněji odstranitelné nízkomolekulární silně disociované molekuly ve srovnání s molekulami vysokomolekulárními. Naopak podle Fua a Tana<sup>25,53</sup> je vyšších účinností dosaženo u vysokomolekulárních huminových látek.

Pro úpravu povrchových vod s obsahem huminových látek jsou nejúčinnější silně bazické anexové pryskyřice, které jsou použitelné v širokém rozmezí pH a teplot. Dále bylo zjištěno, že huminové látky (včetně fulvokyselin) se lépe zachycují v makroporézní než v gelové struktuře ionexu<sup>22,25,53–55</sup>. Makroporézní anexy se také lépe regenerují, než gelové, kde dochází až k nevratné chemisorpci a postupnému snižování užitečné kapacity. Pro separaci huminových látek z vody se nejčastěji používají ionexy se styren-divinylbenzenovou nebo akrylátovou strukturou (matrice je buď styren nebo akrylát a divinylbenzen je síťující činidlo u obou možností), přičemž styren-divinylbenzenové pryskyřice jsou k huminovým látkám selektivnější než akrylátové<sup>22,54</sup> (akrylátový ionex zachycuje organické látky hůře než makroporézní – nefungují zde hydrofobní  $\pi$ – $\pi$  interakce aromatických jader, ale lépe jsou vytěšňovány při regeneraci). Někteří autoři<sup>53</sup> jsou ovšem přesvědčeni o opaku, předpokládají vyšší účinnosti zachycování huminových látek v akrylátových ionexech, s vyšším obsahem vody ve struktuře. Obecně bylo prokázáno, že s rostoucím obsahem vody v ionexu roste účinnost zachycení huminových látek<sup>22,36</sup>.

Ionexy používané pro úpravu vod s obsahem huminových látek nesou na svém povrchu nejčastěji aminové funkční skupiny (terciární aminy a kvartérní amoniové skupiny). Anexy jsou zpravidla provozovány v chloridovém cyklu a reakce probíhá podle následujícího schématu<sup>22,25,44,46,54</sup>



V posledních několika letech se provádějí pokusy se zachycováním a separací huminových látek na speciálních typech ionexů, tzv. MIEX. Jedná se o magnetický silně bazický, makroporézní anex tvořený polyakrylovým skele-

tem, magnetickým jádrem a kvartérními amoniiovými skupinami<sup>36</sup>. Z hlediska investičních a provozních nákladů je proces úpravy vody iontovou výměnou vhodný zejména pro vody s nepříliš vysokými koncentracemi huminových látek, protože s jejich vzrůstající koncentrací se provoz značně prodražuje<sup>22</sup>. Ve vodárenských provozech není technologie založená na iontové výměně zatím příliš rozšířena. Iontovou výměnu sice lze používat jako samostatný technologický proces úpravy vody, ale častěji je provozována v kombinaci s dalšími procesy, které ze surové vody předseparují organické znečištění a suspendované látky<sup>25</sup>. Běžně však jsou na anexech odstraňovány zbytkové huminové látky po koagulaci a separaci suspenze na elektrárnách při výrobě demineralizované vody. K odstraňování huminových látek můžeme použít sorpční anex (organic scavenger), který se předřazuje demineralizační lince. Jedná se většinou o vysoce porézní silně bazické anexy, které se používají v chloridové formě. Regenerace se provádí roztokem obsahujícím chlorid sodný a hydroxid sodný. Další variantou sorpčních anexů, jsou fenolformaldehydové slabě bazické anexy, které se regenerují roztokem hydroxidu sodného.

### 4.3. Membránová filtrace

Při tlakové membránové filtraci představuje membrána bariéru mezi zahuštěnou surovou vodou obsahující odstraňované látky (retentátem, koncentrátem) a produktem (permeátem). Transport látek skrz membránu je ovlivněn mnoha faktory, zejména pak vlastnostmi membrány (velikostí pórů, strukturou, materiálem a povrchovým nábojem), vlastnostmi huminových látek přítomných v surové vodě, ale také interakcemi těchto látek s membránou<sup>28,56–58</sup>. Významným ukazatelem je zejména velikostní poměr částic huminových látek a pórů membrán. Obecně platí, že částice větší než póry se zachytí na povrchu membrán, částice srovnatelné velikostí s póry se většinou zachytí uvnitř membrán a částice s menším průměrem než je průměr pórů membránou procházejí. Nicméně i některé částice menší velikosti než je průměr pórů membrány na ní mohou být zachyceny, a to především v případech, kdy mají opačný náboj než je náboj membrány<sup>45,58</sup>. Semipermeabilní membrány vhodné pro úpravu huminových vod jsou nejčastěji vyrobeny z polyamidu, polypropylenu, polyethylenu nebo z acetátu celulosy<sup>44,56,57</sup>.

Surová voda vstupující do kontaktu s membránou musí mít určitou kvalitu, aby se membrána zbytečně nezanažela a nesnižovala se tak účinnost filtrace. Obsah suspendovaných látek musí být minimální a nesmí obsahovat látky, které by mohly způsobit poškození membrány. Požadované kvality surové vody lze dosáhnout předúpravou, obvykle chemickou technologií. K regeneraci membrán, tedy k odstranění zachyceného materiálu, je nejčastěji používána deionizovaná voda, chlor, alkalické hydroxidy, peroxidy atd. Zvláště účinné se ukázaly být roztoky EDTA (ethylendiamintetraacetát) a SDS (dodecylsulfát sodný)<sup>18</sup>.

Podle velikosti pórů se rozlišují membrány pro reverzní osmózu, pro nano-, ultra- a mikrofiltraci<sup>45</sup>. Mikro-

filtraci (póry 0,1  $\mu\text{m}$  až 2  $\mu\text{m}$ ) lze použít jako samostatný technologický proces pro odstranění huminových látek, jeho účinnost však není příliš vysoká, proto se používá častěji v kombinaci s dalšími technologiemi<sup>28,58</sup>. Účinnost ultrafiltrace (póry 0,02  $\mu\text{m}$  až 0,1  $\mu\text{m}$ ) při úpravě huminových vod je vyšší než účinnost mikrofiltrace<sup>28</sup>. Membrány pro nanofiltraci (velikost pórů 0,002  $\mu\text{m}$  až 0,02  $\mu\text{m}$ ) jsou schopné z vody separovat téměř všechny, i rozpuštěné, huminové látky, ale na úkor vysokých provozních nákladů a nízké produkce upravené vody<sup>28</sup>. Účinnost odstranění huminových látek z vody se tedy liší v závislosti na použitém typu membrány, ale může být téměř stoprocentní, např. při použití kombinace několika různých postupů, např. mikrofiltrace s nanofiltrací<sup>18,56,58</sup>. Membránové technologie nalézají při úpravě vod huminového typu stále vyšší uplatnění, běžné jsou již zejména na menších úpravách vody. Jejich provoz je jednoduchý a další výhodou je i skutečnost, že se nepoužívají žádné chemikálie.

### 4.4. Oxidační a biologické metody

Biofiltrace je proces vhodný především pro odstranění snadno biologicky rozložitelných organických látek, mezi které ale huminové látky nepatří. Proto není biofiltrace pro úpravu povrchových vod s obsahem huminových látek jako samostatná technologie běžně používána. Pouze na některých úpravách v zahraničí se využívá kombinace biofiltrace s předoxidací. K oxidaci huminových látek lze využít ozón, peroxid vodíku, manganistan draselný nebo jejich kombinaci, mnohdy umocněné účinky ultrafialového záření. Žádné oxidační činidlo ale nedokáže huminové látky zoxidovat až na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Dochází pouze ke změně struktury huminových látek, např. ke ztrátě aromaticity, transformaci vysokomolekulárních látek na nízkomolekulární a ke zvýšení obsahu jednoduchých organických kyselin a alkoholů<sup>26,36,59</sup>. Takto transformované huminové látky jsou již většinou odstranitelné následnou biofiltrací.

Biofiltrace je obvykle kombinací sorpce produktu rozkladu huminových látek nebo jejich netransformovaných zbytků na tuhých sorbentech s jejich rozkladem mikroorganismy, přisedlými na sorbent. Nejpoužívanějším sorbentem je granulované aktivní uhlí, lze však použít i antracit, bauxit nebo syntetické sorbenty na bázi polyesterů a polystyrénů<sup>59</sup>. Při biofiltraci upravovaná voda protéká filtrační vrstvou sorbentu, který je buď ve formě pevné nebo fluidní filtrační vrstvy. Na částicích sorbentu jsou vázány mikroorganismy. Účinnost biofiltrace závisí na době kontaktu upravované vody s filtračním médiem, typu filtračního média, dále na hodnotě pH a teploty vody a zejména na vlastnostech degradovaných organických látek<sup>60,61</sup>.

## 5. Závěr

Protože charakter huminových látek obsažených v různých typech povrchových vod bývá často velmi odlišný, může být pro jednotlivé typy surové vody vhodný různý



ný způsob úpravy. Nejběžnější metodou úpravy vod s obsahem huminových látek je chemická úprava založená na destabilizaci a následné agregaci (koagulaci/flokulaci) huminových látek. Tímto způsobem se velmi dobře odstraňují zejména vysokomolekulární huminové látky. Naopak nízkomolekulární fulvokyseliny jsou odstraňovány podstatně hůře. Výhodou této technologie jsou zejména únosné investiční a provozní náklady a také možnost instalace v úpravárnách s velmi rozdílnou výkonovou kapacitou. Nevýhodou chemické úpravy používající hlinité sole je ale vznik špatně odvodnitelného kalu, s vysokými koncentracemi hliníku a někdy i nevyhovující kvalita upravené vody, a to především v závislosti na charakteru upravované vody.

Pro odstranění nízkomolekulárních záporně nabitých fulvokyselin je ve srovnání s chemickou úpravou vhodnější iontová výměna. Iontová výměna se pro odstranění huminových látek zdá být účinnější než adsorpce na aktivním uhlí, oxidech kovů nebo na anorganických ionexech jako jsou hlinítokřemičitany nebo silikagel. Naopak výhodou sorpčních procesů, zejména při použití aktivního uhlí je schopnost odstranit i elektroneutrální nízkomolekulární látky, které jsou ostatními procesy špatně odstranitelné. Účinnost odstranění huminových látek je obvykle nejvyšší při použití vysokotlakých membránových procesů (nanofiltrace), ale zde jsou investiční a provozní náklady vysoké. Výhodou membránové filtrace je také variabilita a relativní jednoduchost samotného provozu a schopnost velmi dobře upravit i vody s vysokým obsahem huminových látek. Oxidace huminových látek následovaná biofiltrací je metoda, kterou lze odstranit téměř všechny biologicky rozložitelné organické látky ve vodě, ale pro přímé odstranění huminových látek není příliš vhodná. Předcházet musí jejich razantní oxidace a rozštěpení makromolekul na menší, biologicky rozložitelné fragmenty, což celou technologii významně prodražuje.

Každá z výše zmiňovaných technologií má své výhody i nevýhody. Pro představu praktického využití jednotlivých způsobů odstranění huminových látek můžeme vycházet např. z norských zkušeností<sup>44</sup>. V Norsku mají 160 úprav, které upravují povrchové vody se zvýšenými koncentracemi huminových látek. Z toho 74 využívá klasického chemického způsobu, 63 membránové filtrace, 12 procesu iontové výměny a pouze 1 úpravna je založena na kombinaci ozonizace s biofiltrací.

*Tato práce byla podpořena z prostředků grantového projektu GA AV ČR IAA200600902, institucionálního výzkumného plánu AV0Z20600510 a výzkumného záměru MSM 6046137308.*

## LITERATURA

- Pivokonsky M., Klouček O., Pivokonska L.: *Water Res.* 40, 3045 (2006).
- Thurman E.: *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Nijhoff/Junk, Hague 1985.
- Pivokonska L.: *Kandidátská disertační práce*. ČVUT Praha, Praha 2007.
- Leenheer J. A., Croue J. P.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 18 (2003).
- Stum W., Morgan J. J.: *Aquatic Chemistry*. J. Wiley, New York 1996.
- Marhaba T. F., Pu Y.: *J. Haz. Mat.* 73, 221 (2000).
- Dolejš P.: *Procesy úpravy pitné vody z povrchových zdrojů obsahujících huminové látky - interakce teorie a praxe*. VUTIUM, Brno 2002.
- Edwards G. A., Amirtharajah A.: *J. Amer. Water Works Assoc.* 77, 50 (1985).
- Piccolo A.: *Soil Sci.* 166, 810 (2001).
- Wershaw R. L., Pickney D. J., Llaguno E. C.: *Anal. Chim. Acta.* 232, 31 (1990).
- McDonald S., Bishop A. G., Prenzler P. D., Robards K.: *Anal. Chim. Acta.* 527, 105 (2004).
- Nikolaou A. D., Lekkas T. D.: *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 29, 63 (2001).
- Uyguner C. S., Bekbolet M.: *Catal. Today.* 101, 267 (2005).
- Chin Y. P., Aiken G., O'Longhlin E.: *Environ. Sci. Technol.* 28, 1853 (1994).
- Watt B. E., Malcolm R. L., Hayes M. H. B., Clark N. W. E., Chipman J. K.: *Water Res.* 30, 1502 (1996).
- Barreto S. R. G., Nozaki J., Barreto W. J.: *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31, 513 (2003).
- Peuravuori J., Pihlaja K., Valimäki N.: *Environ. Int.* 23, 453 (1997).
- Domany Z., Galambos I., Vatai G., Moldar E. B.: *Desalination* 145, 333 (2002).
- Leenheer J. A., Wershaw R. L., Brown G. K., Reddy M. M.: *Appl. Hydrochem.* 18, 471 (2002).
- Žáček L.: *Chemické a technologické procesy úpravy vody*. NOEL, Brno 1999.
- Stumm W.: *Aquatic Surface Chemistry: Chemical Processes at the Particle – Water Interface*. J. Wiley, New York 1987.
- Bolto B., Dixon D., Eldridge R.: *React. Function. Polym.* 60, 171 (2004).
- Žáček L.: *Huminové látky v přirozených vodách a možnosti jejich odstraňování*. ZNP, Praha 1977.
- Matilainen A., Lindqvist N., Korhonen S., Tuhkanen T.: *Environ. Int.* 28, 457 (2002).
- Tan Y., Kilduff J. E., Kitis M., Karanfil T.: *Desalination* 176, 189 (2004).
- Owen D. M., Amy G. L., Chowdhury Z. K., Paode R., McCoy G., Viscosil K.: *J. Am. Water Works Assoc.* 87, 46 (1995).
- Bolto B., Dixon D., Eldridge R., King S.: *Water Res.* 36, 5066 (2002).
- Jacangelo J. G., DeMarco J., Owen D. M., Randtke S. J.: *J. Am. Water Works Assoc.* 87, 64 (1995).
- Bennett L. E., Drikas M.: *Water Res.* 27, 1209 (1993).
- Kim H. CH., Yu M. J.: *Water Res.* 39, 4779 (2004).
- Pivokonska L., Pivokonsky M., Tomášková H.: *Sep. Sci. Technol.* 43, 1687 (2008).

32. Polasek P., Mutl S.: *Guidelines to Coagulation and Flocculation for Surface Waters*. Volume 1: Design principles for coagulation and flocculation. P. Polasek & Associates, Marshalltown 1995.
33. Packham R. F.: *Proc. Soc. Water Treat. Exam.* 13, 316 (1964).
34. Gregor J. E., Nokes C. J., Fenton E.: *Water Res.* 31, 2949 (1997).
35. Edzwald J. K., Tobiason J. E.: *Water Sci. Technol.* 40, 63 (1999).
36. Fearing D. A.: *Ph.D. Thesis*, Cranfield University, Cranfield 2004.
37. Chow CH. W. K., Fabris R., Drikas M.: *J. Water Suppl. Res. Technol.-AQUA* 53, 85 (2004).
38. Vogelsang C., Andersen D. O., Hey A., Hakonsen T., Jantsch T. G., Muller E. D., Pedersen A., Varum K. M.: *Water Sci. Technol.: Water Supply*. 4, 121 (2004).
39. Nissinen T. K., Miittinen I. T., Martikainen P. J., Vartiainen T.: *Chemosphere* 45, 865 (2001).
40. Gregory J., Duan J.: *Pure Appl. Chem.* 73, 2017 (2001).
41. Polasek P., Mutl S.: *Water SA* 28, 69 (2002).
42. Bolto B., Abbt-Braun G., Dixon D., Eldridge R., Frimmel F., Hesse S., King S., Toifl M.: *Water Sci. Technol.* 40, 71 (1999).
43. Bolto B., Dixon D., Eldridge R., King S.: *Water Res.* 36, 2669 (2001).
44. Odegaard H., Eikebrokk B., Storhaug R.: *Water Sci. Technol.* 40, 37 (1999).
45. Costa A. R., Pinho M. N.: *Water Supply*. 4, 215 (2004).
46. Fettig J.: *Water Sci. Technol.* 40, 173 (1999).
47. Hur J., Schlautman M. A.: *J. Colloid Interface Sci.* 264, 313 (2003).
48. McCreary J. J., Snoeyink V. L.: *Water Res.* 14, 151 (1980).
49. Frimmel F. H.: *J. Contam. Hydrol.* 35, 201 (1998).
50. Ogino K., Kaneko Y., Minoura T., Agui W., Abe M.: *J. Colloid Interface Sci.* 121, 161 (1988).
51. Meier M., Dejanovic K. N., Maurice P. A., Chin Y. P., Aiken G. R.: *Chem. Geol.* 157, 275 (1998).
52. Weerd H. V., Riemsdijk V. W. H., Leijnse A.: *Environ. Sci. Technol.* 33, 1675 (1999).
53. Fu P. L. K., Symons J. M.: *J. Am. Water Works Assoc.* 82, 70 (1990).
54. Bolto B., Dixon D., Eldridge R., King S., Linge K.: *Water Res.* 36, 5057 (2002).
55. Croue J. P., Violleau D., Bodaire C., Legube B.: *Water Sci. Technol.* 40, 207 (1999).
56. Kitis M., Karanfil T., Wigton A., Kilduff J. E.: *Water Res.* 36, 3834 (2003).
57. Yong C.: *Water Res.* 33, 3056 (1999).
58. Schäfer A. I., Schwicker U., Fischer M. M., Fane A. G., Waite T. D.: *J. Membr. Sci.* 171, 151 (2000).
59. Graham N. J. D.: *Water Sci. Technol.* 40, 141 (1999).
60. Hozalski R. M., Bouwer E. J.: *Water Res.* 35, 198 (2001).
61. Zhou J. L., Banks C. J.: *Environ. Technol.* 13, 727 (1992).

**M. Pivokonský<sup>a</sup>, L. Pivokonská<sup>a</sup>, P. Bubáková<sup>a,b</sup>, and V. Janda<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Hydrodynamics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, <sup>b</sup>*Department of Water Technology and Environmental Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Treatment of Water Containing Humic Matter**

Humic matter is the prevailing constituent of natural organics in many surface water resources. Humic matter is a class of complex polycyclic high-molecular-weight compounds with molecular weights ranging from ten thousands to hundred thousands. Humic matter often varies in different types of surface water and for that reason different treatment technologies are used. The most common method is chemical water treatment based on coagulation/flocculation of humic substances. Besides, chemical processes and other methods can be used for removal of humic matter in water treatment, such as sorption, ion exchange, membrane filtration, oxidation and biological methods.

## DERIVÁTY PAKLITAXELU PRO CÍLENÝ TRANSPORT CYTOSTATIKA

MARIE PŘIBYLOVÁ<sup>a,b</sup>, MARCELA DVOŘÁKOVÁ<sup>a,c</sup> a TOMÁŠ VANĚK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoř rostlinných biotechnologií, Společná laboratoř Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. a Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6, <sup>b</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha 2, <sup>c</sup>Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha 2  
vanek@ueb.cas.cz

Došlo 20.3.09, přepracováno 22.3.10, přijato 8.4.10.

Klíčová slova: paklitaxel, cílený transport léčiv

### Obsah

1. Úvod
2. Paklitaxel
3. Strategie cíleného transportu cytostatika do nádorové tkáně
4. Deriváty paklitaxelu pro cílený transport cytostatika
  - 4.1. Transport cytostatika s kyselinou listovou
  - 4.2. Transport cytostatika s kyselinou hyaluronovou
  - 4.3. Transport cytostatika s protilátkami
  - 4.4. Transport cytostatika s peptidovými hormony
    - 4.4.1. Somatostatin
    - 4.4.2. Oxytocin
  - 4.5. Transport cytostatika se steroidními hormony
    - 4.5.1. Estradiol
  - 4.6. Transport cytostatika s mastnými kyselinami
  - 4.7. Transport cytostatika se sacharidy
5. Závěr

### 1. Úvod

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) zemřelo na rakovinu v roce 2004 ve světě 7,4 mil lidí, což představuje přibližně 13 % všech úmrtí<sup>1</sup>. V České republice mají zhoubné novotvary za následek každé čtvrté úmrtí. Vývoj počtu hlášených onemocnění má rostoucí trend; naštěstí vývoj úmrtnosti v ČR tento trend nekopíruje<sup>2</sup>.

V dnešní době existuje mnoho metod boje s nádorovým onemocněním, mezi ty základní patří onkologická chirurgie, chemoterapie a radioterapie.

Chemoterapie stejně jako ostatní jmenované metody má svá úskalí. Hlavním omezujícím prvkem při léčbě chemoterapeutiky je jejich nespecifický účinek, tzn. že klasická chemoterapeutika působí na buňky bez rozdílu, zda jde o nádorové či zdravé tkáně. Z tohoto důvodu je chemoterapie doprovázena řadou nežádoucích vedlejších účinků. Cílená chemoterapeutika jsou pro svou zvýšenou selektivitu vůči nádorovým buňkám slibnou budoucností pro redukci těchto nežádoucích účinků.

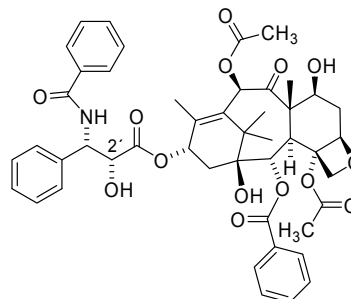
### 2. Paklitaxel

Paklitaxel, známý také pod obchodním názvem Taxol<sup>®</sup> (registrovaná obchodní značka firmy Bristol-Myers Squibb)<sup>3</sup>, patří do skupiny taxanů, přírodních diterpenoidů (obr. 1). Paklitaxel byl objeven v rámci programu National Cancer Institute, který prozkoumával protinádorovou účinnost tisíců extraktů rostlin<sup>4</sup>. Cytotoxická účinnost extraktu tisu *Taxus brevifolia* byla prokázána roku 1964 (cit.<sup>3</sup>) a roku 1971 byla poprvé publikována struktura paklitaxelu jako účinné složky tohoto extraktu<sup>5</sup>.

Cytostatická účinnost paklitaxelu spočívá v jeho schopnosti stabilizovat mikrotubuly a blokovat jejich depolymerizaci zpět na tubulin<sup>6</sup>. Mikrotubuly patří mezi životně důležité buněčné struktury, které se účastní nejen dělení buněk. Zásahem do funkce mikrotubulů se zastaví buněčné dělení.

Problémem při aplikaci paklitaxelu je jeho nízká rozpustnost ve vodě. Tento problém byl částečně vyřešen jeho intravenózním podáváním ve formě směsi ethanolu s derivatizovaným ricinovým olejem Cremophorem EL<sup>®</sup> (registrovaná obchodní značka firmy BASF Corporation)<sup>7</sup>.

Paklitaxel našel široké klinické využití. Poprvé byl schválen v roce 1992 americkou Food and Drug Administration pro léčbu nádorů vaječníků<sup>3</sup>. Dnes je paklitaxel používán při léčbě karcinomu prsu, vaječníků a určitých forem karcinomu plic<sup>8</sup>.



Obr. 1. Struktura paklitaxelu

Stejně jako ostatní cytostatika vykazuje paklitaxel u pacientů nežádoucí vedlejší účinky, jako např. reakce z přecitlivělosti na paklitaxel, neutropenie či periferní neuropatie<sup>4,9</sup>. Některé z těchto nežádoucích účinků jsou spojovány nejen se samým cytostatikem, ale také s jeho pomocnou látkou, již dříve zmiňovaným Cremophorem EL.

### 3. Strategie cíleného transportu cytostatika do nádorové tkáně

Jak již bylo zmíněno v úvodu, hlavním nedostatkem chemoterapeutik je jejich neselektivita cytotoxicity vůči nádorovým buňkám. Cílená chemoterapie je jednou z možností, jak tento nedostatek zmírnit a zvýšit efektivitu léčby. Důležitým pozitivem, souvisejícím se snížením nežádoucích vedlejších účinků léčby, je zlepšení života pacienta během léčby.

Strategie cíleného transportu je založena na faktu, že nádorové buňky se od zdravých buněk liší v některých strukturálních prvcích a dějích. Na základě toho jsou hledány látky, které po navázání na cytostatikum fungují jako nosiče či navigátory k těmto specifickým strukturám a pomáhají při vstupu cytostatika do buňky. Významnou roli přitom hraje také vazba cytostatika s touto navigační molekulou, tzv. spojka. Spojka musí zajistit takovou vazbu s cytostatikem, která neporuší schopnost vazby navigační molekuly na její receptory, a také nedovolí uvolnění cytostatika z výsledného konjugátu před dosažením cílové tkáně.

### 4. Deriváty paklitaxelu pro cílený transport cytostatika

Přípravu jednoho z prvních cílených konjugátů paklitaxelu publikoval Safavy<sup>10</sup> v roce 1999. Od té doby byla připravena řada cílených derivátů paklitaxelu lišících se ve svém přepravci k cílovým buňkám. V této práci bude podán průřez pracemi z posledních 10 let.

#### 4.1. Transport cytostatika s kyselinou listovou

Kyselina listová (pteroylglutamová kyselina) je důležitým ve vodě rozpustným vitamínem<sup>11</sup>. Kyselina listová je nezbytná pro normální růst buňky a její dělení. Redukovaná forma tohoto vitamínu, kyselina tetrahydrolistová (tetrahydrofolát), je koenzymem, který se účastní reakcí, při nichž se přenášejí jednoválcové zbytky<sup>12</sup>.

Folátový transport je prováděn dvěma rozdílnými systémy<sup>13</sup>. Z hlediska cílených derivátů cytostatik je důležitý přenos folátovými receptory, které jsou vázány k povrchu buňky přes glykosylfosfatidylinositolovou kotvu a přenos se děje endocytózou zprostředkovanou receptorem<sup>14</sup>.

Byly popsány<sup>15</sup> tři isoformy folátových receptorů – FR $\alpha$ , FR $\beta$  a FR $\gamma$ . Každá z těchto isoform se nachází na

specifické tkáni a má jinou vazebnou schopnost. Folátové receptory jsou ve velkém množství exprimovány mnoha druhy nádorových buněk, např. karcinomem vaječnicků či ledvin<sup>16</sup>.

Lee<sup>17</sup> připravil konjugáty kyseliny listové s paklitaxelem kovalentně vázaným na  $\gamma$ -karboxylovou skupinu folátu přes různé oligo(ethylenglykolové) spojky. Takto připravené konjugáty mají mít zachovanou schopnost vázat se na receptory a prostupovat do buňky endocytózou zprostředkovanou receptorem. Na základě testů hydrolyzy připravených konjugátů a testů *in vitro* v buněčných kulturách byl pro zkoušení *in vivo* vybrán konjugát paklitaxel-7-PEG-folát. U tohoto konjugátu byla zachována vazebná afinita k folátovým receptorům a v testech *in vivo* prokázána menší toxicita než u paklitaxelu. Konjugát ovšem nebyl v testech *in vitro* v buněčných kulturách selektivní vůči tumorovým buňkám s expresí folátových receptorů a v testech *in vivo* neprokázal zvýšenou účinnost ve srovnání s paklitaxelem<sup>17</sup>.

Autoři Wu, Liu a Lee<sup>18</sup> popsali originální způsob propojení liposomu a kyseliny listové jako nosičů paklitaxelu k folátovým receptorům. Liposom byl zvolen jako náhrada běžně používaného rozpouštědla Cremophor EL, čímž se měly eliminovat nežádoucí vedlejší účinky této látky. Další výhodou tohoto propojení měla být prodloužená cirkulace léčiva v systému a jeho selektivní cílení k folátovým receptorům na nádorových buňkách. Liposomy byly složeny ze směsi lipidů a folátu vázaného přes poly(ethylenglykol). Molární poměr cytostatikum:lipidy činil 1:33. Testy cytotoxicity byly provedeny v buněčné linii karcinomu úst KB, která má zvýšenou koncentraci folátových receptorů. Závěr této práce byl velmi pozitivní, neboť se ukázalo, že buněčný příjem liposomů nesoucích folát je vyšší než liposomů bez něj. Na základě pokusu, v němž byl buněčný příjem těchto liposomů blokován v závislosti na volném folátu, je možné dojít k závěru, že tyto liposomy jsou aktivní v interakci s folátovými receptory. U paklitaxelu v liposomech nesoucích folát byla IC<sub>50</sub> (koncentrace látky, která usmrtí 50 % buněk za určitou dobu expozice ve srovnání s kontrolou) přibližně čtyřikrát nižší než u paklitaxelu v necílených liposomech. IC<sub>50</sub> paklitaxelu rozpuštěného ve směsi Cremophor EL/ethanol byla ve srovnání s paklitaxelem v cílených liposomech přibližně 2,5 krát vyšší.

Další publikace, která se týká využití listové kyseliny a paklitaxelu k syntéze cíleného derivátu cytostatika, vyšla nedávno<sup>19</sup>. V této práci byly použity nanočástice připravené ze směsi poly(laktidu)-*d*- $\alpha$ -tokoferyl-poly(ethylenglykol)-sukcinátu a *d*- $\alpha$ -tokoferyl-poly(ethylenglykol)-sukcinátu s navázaným folátem. Paklitaxel zapouzdřený v těchto nanočásticích vykázal mnoho výhod ve srovnání s volným paklitaxelem. Pozitivním výsledkem byl důkaz, že částice s vázaným folátem jsou zacíleny na příslušné nádorové buňky, čímž se zvyšuje terapeutický efekt a snižují vedlejší účinky paklitaxelu.

#### 4.2. Transport cytostatika s kyselinou hyaluronovou

Kyselina hyaluronová (HA) je biopolysacharid vyskytující se v organismech. Mezi hlavní biologické funkce HA patří podpora viskoelasticity pojivových tkání a řízení hydratace tkání.

Kyselina hyaluronová je vysoce hydrofilní a v těle na sebe váže vodu. Její viskózní roztoky pak působí jako mazadla v pohyblivých částech těla, jako jsou klouby<sup>20</sup>. Bylo zjištěno, že kyselina hyaluronová hraje určitou roli i v procesu růstu nádorů<sup>21</sup>.

Receptory kyseliny hyaluronové CD44 a RHAMM jsou výrazně více exprimovány řadou nádorů, např. vaječnicků, žaludku či akutní leukemie<sup>20</sup>.

Auzenne<sup>22</sup> připravil na základě předchozí práce<sup>23</sup> konjugát paklitaxelu a kyseliny hyaluronové, v němž bylo využito této kyseliny jako hydrofilního nosiče, který zároveň pomáhá při specifickém příjmu léčiva receptory CD44. Testy byly prováděny v buněčných liniích karcinomu vaječnicků NMP-1 a SKOV-3ip, které exprimují receptory CD44. Selektivita buněčného příjmu konjugátu byla zjišťována blokováním receptorů CD44 volnou kyselinou hyaluronovou a následnou aplikací konjugátu paklitaxelu s kyselinou hyaluronovou. Výsledkem byla snížená cytotoxicita konjugátu ve srovnání s cytotoxicitou bez aplikace volné kyseliny hyaluronové. Tento závěr potvrzuje, že konjugát je přijímán hlavně CD44 receptory. Byly provedeny testy *in vivo*, v nichž prokazoval tento konjugát slibnou účinnost.

#### 4.3. Transport cytostatika s protilátkami

Monoklonální protilátky našly v protinádorové léčbě široké využití. Protilátky jsou v léčbě používány samostatně nebo mohou být konjugovány s radionuklidem či toxinem<sup>24</sup>.

Safavy<sup>25</sup> připravil konjugát paklitaxelu s monoklonální protilátkou cílenou na receptory epidermálního růstového faktoru. Tato protilátka – Erbitux (C225) – byla navázána amidovou vazbou na 2'-sukcinylpaklitaxel. Receptory pro epidermální růstový faktor (EGFR) jsou exprimovány např. buňkami karcinomu jícnu a plic<sup>26</sup>. EGFR hraje roli v buněčných procesech, jako je buněčné rozmnožování či ochrana před programovanou buněčnou smrtí<sup>27</sup>. Byla prokázána zvýšená cytotoxicita konjugátu paklitaxel-C225 ve srovnání s volným paklitaxelem, protilátkou C225 a směsí paklitaxelu s protilátkou C225 v buněčných liniích (A431, UM-SCC-1 a UM-SCC-6), které vyjadřují receptory epidermálního růstového faktoru. V testech *in vivo* byla sledována biodistribuce značeného konjugátu paklitaxel-C225 a protilátky C225. Vzhledem k tomu, že obě látky byly nalezeny ve stejných tkáních, bylo doloženo, že vazba paklitaxelu na protilátku neovlivňuje vazebné místo protilátky na antigen.

V další práci<sup>28</sup> byl paklitaxel spojen s protilátkou MC192, která je cílena na receptory p75. Receptor p75 je transmembránový receptor pro neurotrofiny. Mezi neurotrofiny patří např. nervový růstový faktor (NGF), neurotro-

fin 3 (NT3) nebo neurotrofin 4/5 (NT4/5). S nervovým růstovým faktorem je kromě receptoru p75 spojen ještě receptor trkA. Receptory trkA či p75 jsou exprimovány buňkami některých nádorů, např. melanomu<sup>29</sup>. Protilátka MC192 byla vázána na 2'-glutaryl-paklitaxel amidovou vazbou. Bylo zjištěno, že vazba paklitaxelu na tuto protilátku v poměru 1:1 neovlivňuje její vazebnou schopnost. Testy *in vitro* byly provedeny v buněčných liniích neuroblastomu B104 a prokázaly vyšší účinnost a selektivitu konjugátu ve srovnání s paklitaxelem při stejné koncentraci. V testech *in vivo* měl konjugát paklitaxel-MC192 významnou protinádorovou účinnost<sup>28</sup>.

#### 4.4. Transport cytostatika s peptidovými hormony

Další skupinou látek, které mají své receptory exprimovány nádorovými buňkami a mohou tedy sloužit jako nosiče paklitaxelu k určitým tkáním, jsou hormony. Tato kapitola je rozdělena na podkapitoly podle struktury hormonů, které se dělí na peptidové a steroidní<sup>30</sup>.

##### 4.4.1. Somatostatin

Somatostatin (SST) je tetradekapeptid, který vykazuje široké spektrum biologické účinnosti. Hlavní úlohou somatostatinu je zamezit uvolňování růstového hormonu. Somatostatin má antiproliferační (tlumící růst) vliv na některé druhy nádorů. Vzhledem k rychlé degradaci somatostatinu bylo intenzivně pracováno na přípravě jeho analogů s delší dobou působení, vyšší odolností proti degradaci a zvýšenou účinností. Vazebná místa pro somatostatin a jeho analogy byla nalezena na některých druzích nádorů<sup>31</sup>.

Huang<sup>32</sup> připravil konjugát paklitaxelu s oktapeptidovým analogem somatostatinu – oktrotidem (SMS 201-995, Sandostatin<sup>TM</sup>). Konjugát byl připraven navázáním oktrotidu na 2'-sukcinylpaklitaxel. Pro testy cytotoxicity a selektivity tohoto konjugátu byla vybrána buněčná linie karcinomu prsu MCF-7 a buněčná linie CHO (buňky z vaječnicků čínského křečka). V testech byla sledována struktura mikrotubulů, jader a chromatinu buněk po léčbě paklitaxelem, konjugátem oktrotid-paklitaxel a bez cytostatik. Z těchto pozorování byly vyvozeny závěry, že si konjugát zachoval biologickou aktivitu paklitaxelu. Selektivita cytotoxicity konjugátu byla sledována v již zmíněných buňkách MCF-7 (vysoká koncentrace somatostatinových receptorů) a buňkách CHO (nízká koncentrace somatostatinových receptorů). Na rozdíl od buněčné linie MCF-7, kde měl konjugát pouze mírně sníženou cytotoxicitu ve srovnání s paklitaxelem, byla cytotoxicita konjugátu v buněčné linii CHO výrazně nižší. Vstup konjugátu do buňky endocytózou zprostředkovanou somatostatinovými receptory (SSTR) byl zjišťován inkubací MCF-7 buněk s volným oktrotidem a následnou aplikací konjugátu. Výsledkem byla snížená cytotoxicita konjugátu ve srovnání s cytotoxicitou bez volného oktrotidu.

##### 4.4.2. Oxytocin

Hormon oxytocin (OT) je hypothalamický nonapep-

tid, který má mnoho biologických funkcí. Tou hlavní je působení oxytocinu na dělohu při porodu, další je např. vylučování mléka. Oxytocin má vliv i na chování jedinců spojené s reprodukcí a starostí o potomstvo<sup>33</sup>. Důvod, proč byl tento hormon vybrán jako nosič paklitaxelu, je výskyt jeho receptorů mimo jiné na nádorových buňkách prsu<sup>34</sup>.

Cavallaro<sup>35</sup> připravil konjugát paklitaxelu s oxytocinem, v němž byl využit jako nosič  $\alpha, \beta$ -poly[*N*-(2-hydroxyethyl)-DL-aspartamid] (PHEA) s navázaným poly(ethylen glykolem) (PEG). Tento polymerní nosič PHEA-PEG2000 slouží ke zvýšení rozpustnosti látky a k prodloužení přítomnosti léčiva v krevním oběhu. Struktura výsledného konjugátu tedy byla PHEA-PEG2000-sukcinyloxytocin-sukcinylpaklitaxel. Konjugát obstál v testech stability *in vitro*. Předběžné testy cytotoxicity byly provedeny s buňkami karcinomu prsu MCF-7, které exprimují oxytocinové receptory<sup>34</sup>. Testován byl paklitaxel, sukcinylpaklitaxel, PHEA-PEG2000-sukcinylpaklitaxel a PHEA-PEG2000-sukcinyloxytocin-sukcinylpaklitaxel. Testy *in vitro* v buněčných liniích ukázaly, že paklitaxel, sukcinylpaklitaxel a cílený konjugát PHEA-PEG2000-sukcinyloxytocin-sukcinylpaklitaxel vykazují téměř stejnou inhibiční účinnost, zatímco necílený konjugát PHEA-PEG2000-sukcinylpaklitaxel měl poloviční inhibiční účinnost. Tyto výsledky potvrzují, že vazba oxytocinu jako nosiče cytostatika k jeho receptorům zvyšuje cytotoxickou účinnost ve srovnání s necíleným derivátem.

#### 4.5. Transport cytostatika se steroidními hormony

Další skupinou potenciálních navigátorů paklitaxelu k cílovým tkáním jsou steroidní hormony.

##### 4.5.1. Estradiol

Estradiol-17 $\beta$  je pohlavní hormon patřící do skupiny estrogenů. Tento hormon je vylučován především vaječníky<sup>30</sup>. Estradiol se váže na dva typy receptorů ER- $\alpha$  a ER- $\beta$ . Estrogenní receptory (ER) jsou exprimovány např. buňkami nádoru prsu<sup>36</sup>.

Liu<sup>37</sup> připravil konjugáty paklitaxelu v polohách 2', 7 a 10 a estradiolu v polohách 11 a 16. Testy cytotoxicity byly provedeny v buněčné linii karcinomu vaječníků A2780 (ER negativní), v buněčné linii karcinomu prostaty PC-3 (ER- $\beta$  pozitivní) a ve dvou buněčných liniích karcinomu prsu MDA-MB-231 (ER- $\beta$  pozitivní) a MCF-7 (ER- $\alpha$  pozitivní).

Oba konjugáty, v kterých byla využita 2' poloha paklitaxelu, byly v buněčné linii karcinomu prostaty PC-3 téměř stejně účinné jako paklitaxel, jeden z konjugátů byl dokonce účinnější než paklitaxel. V obou buněčných liniích karcinomu prsu byly konjugáty méně účinné než paklitaxel. V těchto buněčných liniích byla cytotoxicita konjugátu vyšší v buněčné linii MDA-MB-231 (ER- $\beta$  pozitivní) ve srovnání s cytotoxicitou konjugátů v buněčné linii MCF-7 (ER- $\alpha$  pozitivní). Vzhledem k vyšší účinnosti konjugátů v buněčných liniích ER- $\beta$  pozitivních je možné předpokládat, že jsou tyto konjugáty cíleny k tomuto typu

estrogenových receptorů.

Oba konjugáty v poloze 7 paklitaxelu byly méně účinné než paklitaxel v buněčné linii karcinomu prostaty PC-3. Tyto konjugáty byly také mnohem méně účinné než paklitaxel v obou buněčných liniích karcinomu prsu. V těchto buněčných liniích byla cytotoxicita konjugátů pouze mírně vyšší v buněčné linii MCF-7 (ER- $\alpha$  pozitivní) ve srovnání s cytotoxicitou konjugátů v buněčné linii MDA-MB-231 (ER- $\alpha$  negativní).

Konjugát vytvořený v poloze 10 paklitaxelu projevoval cytotoxicitu srovnatelnou s paklitaxelem v buněčné linii PC-3. Konjugát byl výrazně méně účinný než paklitaxel v obou buněčných liniích karcinomu prsu. V těchto buněčných liniích byla cytotoxicita konjugátu několikrát vyšší v buněčné linii MCF-7 ve srovnání s cytotoxicitou konjugátu v buněčné linii MDA-MB-231.

#### 4.6. Transport cytostatika s mastnými kyselinami

Tento způsob transportu cytostatika k nádorovým tkáním se liší od předchozích způsobů. Není spojen s receptory cílových buněk, ale vychází z metabolismu nádorových buněk, které často ve zvýšené míře přijímají některé mastné kyseliny. Předpokládá se, že mastné kyseliny slouží nádorovým buňkám jako zdroj uhlíku<sup>38</sup>. Některé nenasyčené mastné kyseliny hrají také roli v prevenci nádorových onemocnění<sup>39</sup>.

Bradley<sup>40</sup> připravil 2'-*O*-acylkonjugát paklitaxelu a dokosaheptaenové kyseliny (DHA). DHA je  $\omega$ -3 přírodní nenasyčená mastná kyselina s šesti dvojnými vazbami.  $\omega$ -3-Nenasyčené mastné kyseliny jsou důležitě pro např. vývoj a funkci sítnice či mozkové kůry<sup>41</sup>.

Konjugát DHA-paklitaxel byl testován *in vitro* v 56 liniích nádorových buněk (test NCI) zahrnujících buňky leukemie, melanomu, nádorů plic a mnoho dalších. V tomto testu projevoval konjugát DHA-paklitaxel nižší cytotoxicitu ve srovnání s paklitaxelem. U obou látek – paklitaxelu i konjugátu DHA-paklitaxel – byl buněčný cyklus zablokovan v G<sub>2</sub>-M fázi buněčného cyklu. Bylo zjištěno, že konjugát DHA-paklitaxel je v testech *in vivo* méně toxický než paklitaxel. U obou látek byla myelosuprese limitujícím činitelem při zvyšování dávek. V experimentech na myších, jimž byl naočkován karcinom plic M109, vykázal konjugát DHA-paklitaxel mnohem vyšší protinádorovou účinnost ve srovnání s paklitaxelem. Další testy byly prováděny na myších, jimž byl implantován HT-29 lidský karcinom tlustého střeva. V těchto testech projevil konjugát DHA-paklitaxel vyšší účinnost než sám paklitaxel.

S cílem potvrdit předpoklad, že se účinnost konjugátu zvyšuje připojením DHA kyseliny, byla porovnána farmakokinetika konjugátu DHA-paklitaxel a paklitaxelu u myší s karcinomem plic M109. Bylo zjištěno, že koncentrace paklitaxelu pocházejícího z konjugátu DHA-paklitaxel zůstává v tumoru zvýšená po delší dobu než po podání samotného paklitaxelu<sup>40</sup>.

## 4.7. Transport cytotatika se sacharidy

D-Glukosa je základním zdrojem energie a důležitým článkem chemických pochodů. Je přijímána v potravě nebo syntetizována při glukoneogenezi. Glukosa je do buněk transportována integrálními transportními proteiny. Tyto přenašeče tvoří dvě strukturně a funkčně odlišné skupiny. V první skupině transportérů SGLT (1-6) je přenos glukosy spojen s transportem sodíku, jde o sekundární aktivní transport. Ten se uplatňuje při transportu glukosy proti koncentračnímu gradientu. Druhý typ přenosu glukosy přes membránu probíhá mechanismem usnadněné difuze a účastní se ho transportéry GLUT (1-12). GLUT transportéry se liší kinetikou, lokalizací a citlivostí na insulin<sup>42</sup>. Nádorové buňky často přijímají více glukosy než normální buňky. Tento příjem se uskutečňuje s účastí transportních proteinů GLUT, které jsou u nádorových buněk exprimovány ve vyšším množství než u zdravých buněk<sup>43</sup>.

Proto Liu<sup>44</sup> připravil konjugát paklitaxelu s methyl- $\alpha$ -D-glukopyranosidem vázaným v poloze 2' sukcinátovou spojkou. Tento konjugát paklitaxelu je rozpustnější ve vodě ve srovnání s paklitaxelem. Konjugát byl testován v osmi nádorových buněčných liniích, kde projevil nižší účinnost než paklitaxel. Výjimkou byla buněčná linie karcinomu prsu MCF-7, kde byl konjugát podobně účinný jako paklitaxel. Tato buněčná linie se vyznačuje několika isoformami glukosových transportérů (GLUT)<sup>45</sup>. Konjugát byl také testován v linii zdravých buněk RPTEC, kde neprojevoval cytotoxicitu, zatímco paklitaxel růst těchto zdravých buněk silně inhiboval. Vzhledem k tomu lze u konjugátu předpokládat nižší toxicitu pro zdravé buňky než u paklitaxelu a usnadněný přenos konjugátů glukosovými transportéry (GLUT).

## 5. Závěr

Cílené deriváty cytotatik jsou cenným přínosem při léčbě nádorových onemocnění. Bylo již publikováno mnoho prací na toto téma a jejich počet stále roste. Výběr molekul, které mohou působit jako navigátor cytotatika k určitým tkáním, závisí na stupni znalosti vlastností nádorových buněk. Lze tedy předpokládat, že se cytotatika budou stále zlepšovat. V této práci je uveden přehled prací, které se zabývají přípravou cílených derivátů paklitaxelu. Vhodné nosiče paklitaxelu ke specifickým tkáním jsou kyselina listová, kyselina hyaluronová, protilátky, peptidové hormony, steroidní hormony a sacharidy. Mnoho konjugátů paklitaxelu projevovalo slibnou protinádorovou účinnost v testech *in vitro* i *in vivo*. Naše laboratoř se zabývá přípravou konjugátů paklitaxelu především s peptidovými hormony, jejichž protinádorová účinnost se zjišťuje ve vybraných nádorových buněčných liniích. Příprava těchto konjugátů je předmětem patentu<sup>46</sup>.

## LITERATURA

1. World Health Organization. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html), staženo 25.2.2009.
2. Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky: *Zdravotnictví České republiky 2007 ve statistických údajích* (2008); [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz), staženo 3.12.2008.
3. Suffness M., Wall M. E., v knize: *Taxol<sup>®</sup>: Science and Applications* (Suffness M., ed.), kap. 1. CRC Press, Boca Raton 1995.
4. Rowinsky E. K., Donehower R. C.: *N. Engl. J. Med.* 332, 1004 (1995).
5. Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A. T: *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325 (1971).
6. Schiff P. B., Fant J., Horwitz S. B.: *Nature* 277, 665 (1979).
7. Straubinger R. M., v knize: *Taxol<sup>®</sup>: Science and Applications* (Suffness M., ed.), kap. 9. CRC Press, Boca Raton 1995.
8. Příbalová informace léku Paclitaxel-Teva 6 mg/ml firmy Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Česká republika.
9. Arbuck S. G., Blaylock B. A., v knize: *Taxol<sup>®</sup>: Science and Applications* (Suffness M., ed.), kap. 14. CRC Press, Boca Raton 1995.
10. Safavy A., Raisch K. P., Khzaeli M. B., Buchsbaum D. J., Bonner J. A.: *J. Med. Chem.* 42, 4919 (1999).
11. Eichholzer M., Tönz O., Zimmermann R.: *Lancet* 367, 1352 (2006).
12. Choi S. W., Mason J. B.: *J. Nutr.* 130, 129 (2000).
13. Kelemen L. E.: *Int. J. Cancer* 119, 243 (2006).
14. Kamen B.A., Capdevila A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5983 (1986).
15. Antony A. C.: *Annu. Rev. Nutr.* 16, 501 (1996).
16. Parker N., Turk M. J., Westrick E., Lewis J. D., Low P. S., Leamon C.P.: *Anal. Biochem.* 338, 284 (2005).
17. Lee J. W., Lu J. Y., Low P. S., Fuchs P. L.: *Bioorg. Med. Chem.* 10, 2397 (2002).
18. Wu J., Liu Q., Lee R. J.: *Int. J. Pharm.* 316, 148 (2006).
19. Pan J., Feng S.-S.: *Biomaterials* 29, 2663 (2008).
20. Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J.: *Vet. Med.* 53, 397 (2008).
21. Lin G., Stern R.: *Cancer Lett.* 163, 95 (2001).
22. Auzenne E., Ghosh S. C., Khodadadian M., Rivera B., Farquhar D., Price R. E., Ravoori M., Kundra V., Freedman R. S., Klostergaard J.: *Neoplasia* 9, 479 (2007).
23. Luo Y., Ziebell M. R., Prestwich G. D.: *Biomacromolecules* 1, 208 (2000).
24. Klener P.: *Onkologie* 2, 33 (2008).
25. Safavy A., Bonner J. A., Waksal H. W., Buchsbaum D. J., Gillespie G. Y., Khzaeli M. B., Arani R., Chen D.-T., Carpenter M., Raisch K. P.: *Bioconjugate Chem.* 14, 302 (2003).
26. Salomon D. S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N.: *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 19, 183 (1995).

27. Adam Z., Pour L., Vorlíček J., Hájek R., Koptíková J., Šmardová J.: *Remedia* 15, 390 (2005).
28. Guillemard V., Saragovi H. U.: *Cancer Res.* 61, 694 (2001).
29. Saragovi H. U., Gehring K.: *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 93 (2000).
30. Hanč O., Pádr Z.: *Hormony*. Academia, Praha 1982.
31. Schally A. V.: *Cancer Res.* 48, 6977 (1988).
32. Huang C. M., Wu Y. T., Chen S. T.: *Chem. Biol.* 7, 453 (2000).
33. Gimpl G., Fahrenholz F.: *Physiol. Rev.* 81, 629 (2001).
34. Ito Y., Kobayashi T., Kimura T., Matsuura N., Wakasugi E., Takeda T., Shimano T., Kubota Y., Nobunaga T., Makino Y., Azuma C., Saji F., Monden M.: *Endocrinology* 137, 773 (1996).
35. Cavallaro G., Maniscalco L., Campisi M., Schillaci D., Giammona G.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 182 (2007).
36. Bird C. E., Houghton B., Westenbrink W., Tenniswood M., Sterns E. E., Clark A. F.: *Can. Med. Assoc. J.* 124, 1010 (1981).
37. Liu C., Strobl J. S., Bane S., Schilling J. K., McCracken M., Chatterjee S. K., Rahim-Bata R., Kingston D. G. I.: *J. Nat. Prod.* 67, 152 (2004).
38. Sauer L. A., Nagel W. O., Dauchy R. T., Miceli L. A., Austin J. E.: *Cancer Res.* 46, 3469 (1986).
39. Larsson S. C., Kumlin M., Ingelman-Sundberg M., Wolk A.: *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 935 (2004).
40. Bradley M. O., Webb N. L., Anthony F. H., Devanesan P., Witman P. A., Hemamalini S., Chander M. C., Baker S. D., He L., Horwitz S. B., Swindell C. S.: *Clin. Cancer Res.* 7, 3229 (2001).
41. Connor W. E., Neuringen M.: *Prog. Clin. Biol. Res.* 282, 275 (1988).
42. Wood I. S., Trayhurn P.: *Br. J. Nutr.* 89, 3 (2003).
43. Ito S., Fukusato T., Nemoto T., Sekihara H., Seyama Y., Kubota S.: *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1080 (2002).
44. Liu D. Z., Sinchaikul S., Reddy P. V. G., Chang M. Y., Chen S. T.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 617 (2007).
45. Grover-McKay M., Walsh S. A., Seftor E. A., Thomas P. A., Hendrix M. J. C.: *Pathol. Oncol. Res.* 4, 115 (1998).
46. Vaněk T., Příbylová M., Dvořáková M., Barth T. (Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.): CZ 301004 B6.

**M. Příbylová<sup>a,b</sup>, M. Dvořáková<sup>a,c</sup>, and T. Vaněk<sup>a</sup>**  
<sup>a</sup> *Laboratory of Plant Biotechnologies, Joint Laboratory of Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic and Research Institute of Crop Production, Prague,* <sup>b</sup> *Department of Biochemistry,* <sup>c</sup> *Department of Organic and Nuclear Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic):* **Paclitaxel Derivatives for Targeted Delivery to Cancer Cells**

Paclitaxel is an important anticancer drug, which is used for treatment of ovarian, breast and lung cancer. The paclitaxel treatment shows two main limitations – poor water solubility of the drug and lack of tumor-specificity. Conjugation of paclitaxel with specific targeting compounds might improve its effectivity and decrease undesirable side effects. This review resumes the research results in the last ten years. Many targeted conjugates of paclitaxel were developed, folic acid, hyaluronic acid, monoclonal antibodies, hormones, fatty acids and glucose being used as tumor-targeting moieties in the conjugates. The conjugates were tested for cytotoxicity; many of them possess a better anticancer activity than free paclitaxel. The targeted delivery of paclitaxel to cancer cells is a potential promising chemotherapy.



## INTERPRETÁCIA CHEMICKÝCH VZORCOV POMOCOU WEBOVEJ SLUŽBY

PAVEL HOROVČÁK<sup>a</sup>, DUŠAN DUGÁČEK<sup>b</sup>  
a PETER CIRBES<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav riadenia a informatizácie výrobných procesov,

<sup>b</sup> Ústav geovied, Fakulta Baníctva, ekológie, riadenia  
a geotechnológií, Technická univerzita, Boženy Němcovej  
3, 040 00 Košice

Pavel.Horovcak@tuke.sk

Došlo 11.11.08, prijaté 10.4.09.

Kľúčové slová: webová služba, chemický vzorec, mashup,  
PHP

### Obsah

1. Úvod
2. Mashup
3. Webová služba – zdroj pre mashup
4. Webová služba pre zobrazenie chemického vzorca
5. Prezentácia chemického vzorca na webovej stránke
6. Záver

### 1. Úvod

Korektná a náležitá prezentácia anorganických chemických vzorcov na webových stránkach je podmienená vhodným riešením ich zobrazenia. Ide pritom najmä o riešenie indexovania znakov kvantifikátorov vo vzorcoch. Vzorce v rámci informačných systémov sú obyčajne umiestnené v databázovej tabuľke ako textové konštanty zapísané v štandardnom ASCII tvare. V súčasnosti sa využíva niekoľko riešení na zobrazenie vzorca. Ako prvé uvedieme použitie dolných alebo horných indexov pre zobrazenie kvantifikátorov počtu atómov alebo mocnenstva iónov (pomocou elementov <sup>, <sub>), ktoré je potrebné (obyčajne manuálne) doplniť na príslušné pozície. Druhým riešením je zobrazenie vzorca vo forme obrázka (pomocou elementu <img />), ktoré je doteraz jednou z najrozšírejších foriem. Tento spôsob je spojený s viacerými nedostatkami (problém pri zmene veľkosti textu, prácnosť vytvárania grafickej podoby jednotlivých vzorcov a spravovanie prístupu k súborom, ktoré ich reprezentujú). Ďalším spôsobom zobrazenia chemických vzorcov je značkovací jazyk MathML (Mathematical Markup Language). Jazyk je založený na XML (eXtended Markup Language), vznikol v r. 1998 a je primárne určený na zápis matematických vzorcov na webových stránkach<sup>1</sup>. Pretože

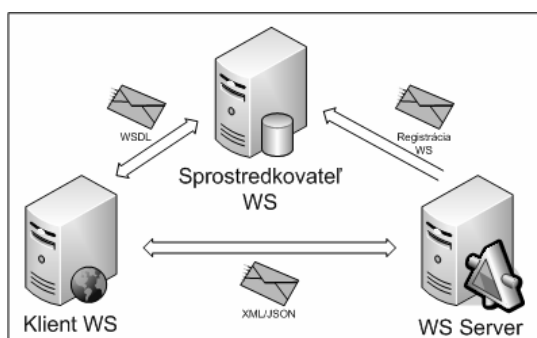
dodávatelia prehliadačov nevenujú dostatočnú pozornosť podpore jeho implementácie, zostáva jeho používanie aj v súčasnosti problematické<sup>2</sup>. MathML podporuje prehliadač Amaya (dvorný prehliadač w3c) a nové verzie Mozilly (Firefoxu), resp. Opery v XHTML dokumentoch. V zatiaľ najrozšírejšom prehliadači Microsoft Internet Explorer ale jeho podpora absentuje (pre IE je potrebný plugin MathPlayer). V podobnej situácii je aj značkovací jazyk CML (Chemical Markup Language), ktorý umožňuje zachytenie štruktúry chemických molekúl. Je tiež založený na používaní XML a na jeho interpretáciu je potrebný špecializovaný prehliadač<sup>3,4</sup>. Jazyk CML je tiež integrovaný v niekoľkých vývojových prostrediach (OpenBabel, JMOL, JChemPaint and XDrawChem, všetky na <http://www.sourceforge.net>). Za najvhodnejšie riešenie preto pokladáme vytvorenie špecializovanej webovej služby umožňujúcej automatické vkladanie elementov <sup>, <sub> do základného tvaru chemického vzorca a jej aplikáciu (integráciu) na strane klienta na základe využitia architektúry orientovanej na služby SOA (Service Oriented Architecture).

### 2. Mashup

Význam slova mashup (mash – zmes, zmiešanina, všehochuť) sa prenáša na význam webového mashupu. Mashup (podľa Wikipédie hybridná webová aplikácia, podľa Wiktionary počítačový slang – odvodené dielo pozostávajúce z dvoch spojených médií) zaznamenal výrazne narastajúci trend pri tvorbe moderného webu. Mashup je webová stránka alebo webová aplikácia využívajúca obsah (získava údaje) jedného alebo viacerých zdrojov na vytvorenie úplne novej služby<sup>5</sup> a prezentuje ju novým spôsobom<sup>6</sup>. V posledných niekoľkých rokoch sa objavil nový typ poskytovateľov obsahu, ktorí umožňujú zoskupovať a konzumovať tento obsah tretími stranami. Tento nový typ konzumentov sa zvyčajne označuje ako „mashup“<sup>7</sup>. Podľa tejto definície je mashup súbor služieb, webových stránok alebo aplikácií, ktoré kombinujú obsah z viacerých zdrojov do nového integrovaného pohľadu používateľa s pridanou hodnotou. Mashupy sa práve v súčasnosti stávajú nosnou časťou Webu 2.0 (cit.<sup>8</sup>). Obsah konzumovaný mashupom typicky pochádza z tretej strany (akou je napr. služba alebo webová stránka) prostredníctvom verejného rozhrania alebo API (Application Programming Interface – webové služby). Alternatívne metódy získavania obsahu pre mashup zahrňujú RSS (Really Simple Syndication) kanály a objektové konštrukcie JavaScriptu (JSON – JavaScript Object Notation, odľahčený výmenný formát dát). Existujú tri typy mashupov – konzumné mashupy (najbežnejšie), dátové mashupy a obchodné mashupy.

### 3. Webová služba – zdroj pre mashup

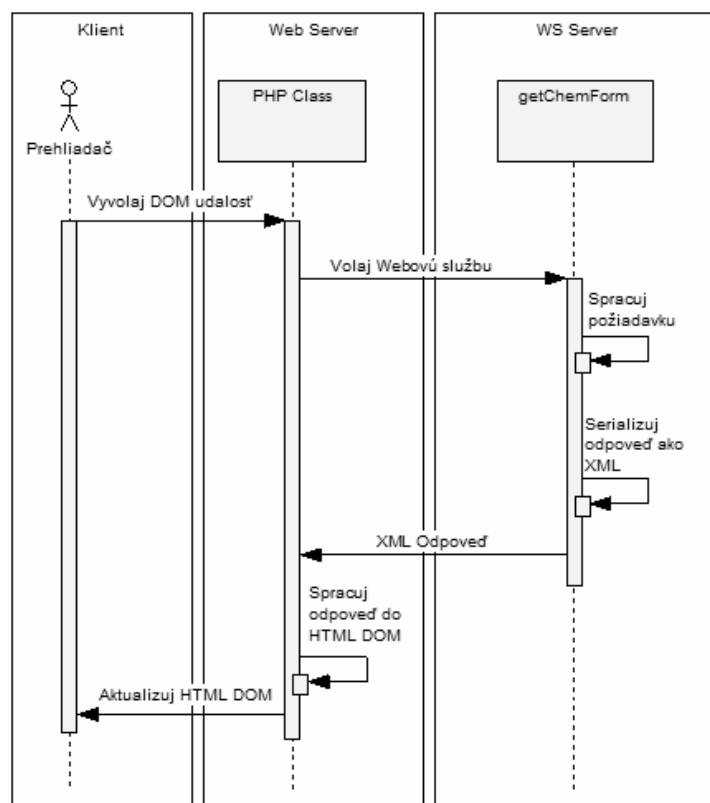
Webová služba (WS) predstavuje jednu z najdôležitejších možností realizácie služby v architektúre SOA. SOA je „voľne viazaná architektúra navrhnutá na splnenie podnikateľských potrieb organizácie“<sup>7</sup>. Podľa iného zdroja<sup>9</sup> neexistuje žiadna všeobecne odsúhlasená definícia SOA okrem toho, že je to architektúra, hlavným konštrukčným princípom ktorej je orientácia na služby. Čo hovorí definícia webovej služby? Z viacerých definícií môžeme spomenúť dve: a) Webová služba ako súhrn novo



Obr. 1. Vzťah zložiek webovej služby

nastupujúcich noriem, ktoré popisujú aplikačnú architektúru orientovanú na služby a založenú na komponentoch, je vybudovaná na princípe architektúry orientovanej na služby SOA<sup>10</sup>; b) WS je softvérový systém identifikovaný URI (Unified Resource Identifier), ktorého verejné rozhrania a väzby sú definované a popísané pomocou XML a jeho definícia môže byť objavená (nájdenná) inými softvérovými systémami. Tieto systémy môžu potom spolupracovať s WS spôsobom predpísaným v jej definícii pomocou výmeny XML správ prenášaných internetovými protokolmi<sup>11</sup>.

Webová služba poskytuje štandardný popis svojho rozhrania vo forme súboru WSDL (Web Services Description Language), ktoré umožňuje klientovi službu využívať. Zásadne je tento popis umiestnený na inom serveri ako samotná služba a predstavuje tak akúsi spojnicu (väzbu) medzi poskytovateľom (server) a konzumentom (klient) služby (obr. 1). Prepojenie medzi poskytovateľom služby a jej konzumentom a návaznosť jednotlivých operácií ilustruje obr. 2. SOA sa však nerovná (iba) WS, lebo síce každá WS vyhovuje SOA, ale nie každá služba v rámci SOA musí byť nutne WS. V súčasnosti k základným štandardom WS (XML, SOAP, WSDL, HTTP) pribudli ďalšie rozširujúce normy (napr. WS-ReliableMessaging, WS-Addressing, WS-Notification, WS-Security, WS-Policy,



Obr. 2. Prepojenie medzi poskytovateľom služby a jej konzumentom

WS-Choreography, WSML – WS Modeling Language<sup>12)</sup>, ktoré dopĺňujú využitie WS a ďalej rozširujú syntax WSDL.

#### 4. Webová služba pre zobrazenie chemického vzorca

Pre väčšinu anorganických chemických vzorcov je možné vystačiť s dolným a horným indexom. Obidva pritom majú adekvátnu podporu tak v jazyku HTML, ako aj na úrovni kaskádových štýlov. Úloha preto spočíva v algoritmickom riešení prevodu štandardného zápisu vzorca (číslo bez znamienka znamená počet atómov v molekule a znamienko + za číslom vyznačuje mocenstvo iónov), uloženého v ASCII tvare napr. v databázovej tabuľke, do tvaru doplneného elementami <sup> a <sub>, ktoré zabezpečujú správne zobrazenie indexov. Konverziu vzorca zabezpečuje samostatná prevodná funkcia, ktorej vstupom je chemický vzorec a výstupom je vzorec v doplnenom HTML tvare. Algoritmus funkcie prechádza po znakoch celou štruktúrou vzorca. Analyzuje aktuálny znak, ako aj jeden predchádzajúci a dva nasledujúce znaky. Na základe toho vyhodnotí definíciu horného a dolného indexu pridaním elementov <sup> alebo <sub>. Takto upravenému vzorcu „rozumie“ (a teda správne ho interpretuje) každý prehliadač.

Webová služba na zobrazenie (prevod) chemického vzorca poskytuje klientovi dve funkcie *getChemForm(\$vzorec)* a *getChemFormStr(\$vzorec)*. Každá funkcia má jeden vstupný parameter (*\$vzorec*) a jeden výstupný parameter – vzorec v HTML formáte. Funkcia *getChemForm(\$vzorec)* vracia výstupnú hodnotu v štandardnom XML formáte, funkcia *getChemFormStr(\$vzorec)* vracia výstupnú hodnotu priamo vo forme reťazca. Základom oboch funkcií je už spomínaná prevodná funkcia.

#### 5. Prezentácia chemického vzorca na webovej stránke

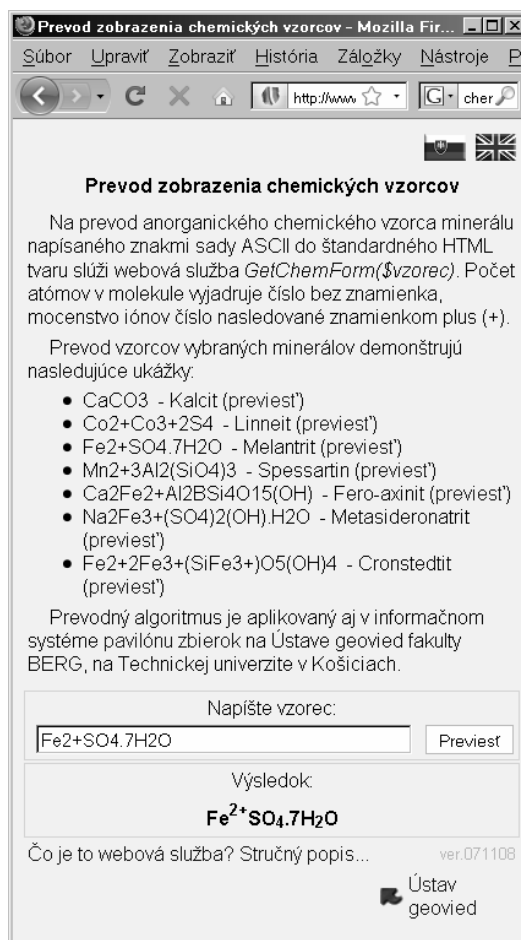
Zobrazenie chemického vzorca na webe klienta je riešené ako mashup, to znamená, že aplikácia využíva volanie webovej služby. Jednoduchú a efektívnu možnosť volania WS prináša okrem iných prostredí aj PHP vo verzii 5 s vyspelou podporou SOAP (Simple Object Access Protocol) vo forme rozšírenia, ktoré umožňuje jednoduché vytvorenie klienta služby na báze WSDL (štandardný spôsob) ako aj v non-WSDL móde (nízkoúrovňový prístup k WS). Rozhranie k webovej službe zabezpečuje WSDL súbor, ktorý špecifikuje názvy jednotlivých funkcií služby ako aj vstupné a výstupné parametre týchto funkcií a ich typy. Pre volanie webovej služby jej konzumentom (klientom) je nevyhnutné poznať odpovedajúci WSDL súbor, teda jeho umiestnenie a názov (URI). Principiálnu schému vzťahu medzi klientom, WSDL súborom a webovou službou ilustruje obr. 1. Volanie webovej služby na

strane klienta vyžaduje vytvorenie inštancie služby a následne volanie príslušnej funkcie v tvare:

```
$urlwsdl='http://omega.tuke.sk/pavel.horovcak/php_ws/wsdl/chemform.wsdl';
$ws = new SoapClient ($urlwsdl);
$result = html_entity_decode($ws->getChemForm($vzorec));
```

kde *\$vzorec* obsahuje chemický vzorec ako vstupný parameter metódy vo forme textového reťazca v ASCII tvare a *\$urlwsdl* je adresa WSDL súboru webovej služby.

Na demonštráciu využitia vytvorenej webovej služby bola zostavená jednoduchá testovacia stránka (<http://www.ispavilon.tuke.sk/chemformtest.php>). Táto stránka umožňuje zadanie vlastného chemického vzorca do vstupného poľa formulára alebo výber niektorého z pripravených demonštračných vzorcov. Tlačidlom „Previesť“ je vyvolaná webová služba a vykonaný prevod vzorca do HTML formátu, ktorý sa vzápätí zobrazí nižšie, v rámečku „Výsledok“ (obr. 3).



Obr. 3. Ukážka testovacej stránky

## 6. Záver

Navrhnutá a zrealizovaná webová služba je určená na prevod chemického vzorca zo štandardného ASCII tvaru do HTML formátu, ktorý zobrazuje počet atómov alebo mocenstvo iónov vo forme dolných alebo horných indexov. Tento formát je vhodný pre prehliadač klienta. Prístup k webovej službe je zabezpečený WSDL súborom služby, umiestneným na adrese 'http://omega.tuke.sk/pavel.horovcak/php\_ws/wsdl/chemform.wSDL'. Využitie WS je reálne všade tam, kde je potrebné prezentovať na webovej stránke vzorec, predovšetkým ak tento vzorec pochádza z nejakého externého zdroja (napr. databázová tabuľka, XML alebo textový súbor) alebo zo vstupného formulára. Zostavená WS okrem priameho využitia v klientovi môže byť tiež zložkou inej webovej služby, resp. stavebnicovým komponentom webovej aplikácie. Využívaním WS nastáva aj určitá zmena štandardných postupov návrhu a tvorby webovej aplikácie<sup>13</sup>. Pre správnú činnosť služby je na strane servera vyžadovaná podpora verzie PHP 5 s aktivovaným rozšírením pre SOAP. Uvedená webová služba je záujemcom voľne k dispozícii.

### Použité skratky

API	Application Programming Interface
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
CML	Chemical Markup Language
DOM	Document Object Model
HTML	HyperText Markup Language
HTTP	HyperText Transfer Protocol
JSON	JavaScript Object Notation
MathML	Mathematical Markup Language
PHP	PHP: Hypertext Preprocessor
RSS	Really Simple Syndication
SOA	Service Oriented Architecture
SOAP	Simple Object Access Protocol
URI	Unified Resource Locator
WS	Web Services
WSDL	Web Services Description Language
WSML	Web Services Modeling Language
XHTML	eXtensible HyperText Markup Language
XML	eXtended Markup Language

### LITERATÚRA

1. Bos B.: W3C Math Home [online] 2001 <http://www.w3.org/Math/> stiahnuté 1.10.2008.
2. Design Science: MathPlayer. <Display MathML in your Browser> [online] <http://www.dessci.com/en/products/mathplayer/> stiahnuté 1.10.2008.
3. Murray-Rust P.: Chemical Markup Language. [online] 1997 <http://www.xml.com/pub/a/w3j/s3.rustintro.html> stiahnuté 1.10.2008.
4. Murray-Rust P.: CML (Chemical Markup Language) Update. [online] 2002 <http://www.ccl.net/chemistry/resources/messages/2002/05/17.002-dir/index.html> stiahnuté 1.10.2008.
5. Next-Generation Applications Using Ajax and OpenAjax - An OpenAjax Alliance White Paper - 7 February 2007 [online] <http://www.openajax.org/whitepapers/Next-Generation%20Applications%20Using%20Ajax%20and%20OpenAjax.php> stiahnuté 1.10.2008.
6. Shu-Wai Ch.: *Programujeme Mashup aplikace pro Web 2.0 v PHP*. Computer press, a.s. Brno 2008.
7. Evdemon J.: Service Oriented Architecture (SOA) in the Real World, [online] 17 August 2007 <http://www.microsoft.com/downloads/details.aspx?FamilyID=cb2a8e49-bb3b-49b6-b296-a2dfbbe042d8&displaylang=en> stiahnuté 1.10.2008.
8. Plummer D. C., Potter K., Matlus R. T., Heng J., Jester R., Thompson E., Sarner A., Kolsky E., Caldwell F., Bace J., MacDonald N., Gammage B., Silver M. A., Fiering L., Basso M., Dulaney K., Smith D. M., Hafner B., Fabbi M., Bell M. A.: Gartner's Top Predictions for IT Organizations and Users, 2007 and Beyond. [online] 8.12.2006 <http://www.gartner.com/DisplayDocument?id=498768> stiahnuté 1.10.2008.
9. Exforsys: SOA Service Oriented Architecture [online] © 2008 Exforsys.com <http://www.exforsys.com/tutorials/soa.html> stiahnuté 1.10.2008
10. Samtani G.: Top five Web service myths. Architect – Web Services - Builder [online] Aug. 2002 <http://www.builderau.com.au/architect/webservices/soa/Top-five-Web-service-myths/0,339024590,320267536,00.htm> stiahnuté 1.10.2008.
11. Champion M., Ferris, Ch., Newcomer, E., Orchard, D.: Web Services Architecture. W3C Working Draft 14, [online] November 2002 <http://www.w3.org/TR/2002/WD-ws-arch-20021114/> stiahnuté 1.10.2008.
12. Bruijn J., Fensel D., Kerrigan M., Keller U., Lausen H., Scicluna J.: *Modeling Semantic Web Services*. The Web Service Modeling Language. Springer-Verlag, Berlin 2008.
13. Smutný P.: *Proceedings of 7th International Carpathian Control Conference: The Implementation Of Advanced Technologies In Intranet And Internet Web Portals* (Farana R., Smutný L., Babiuch M., ed.) str. 678. VŠB – Technical University of Ostrava, Ostrava 2006.

**P. Horovčák, D. Dugáček, and P. Cirbes** (*Institute of Control and Informatization of Production Processes, Institute of Geosciences, Faculty of Mining, Ecology, Process Control and Geotechnology, Technical University, Košice*): **Interpretation of Chemical Formulae Using Web Service**

Accurate minerals' chemical formulas interpretation in websites requires an adequate working out of their representation. Within the latest approaches and technologies

lies a Service Oriented Architecture, realized predominantly by Web Service. The paper is devoted to SOA utilization in problem solution of chemical formulas interpretation in internet environment by creation for this purpose intended web service. The web service calling on client side requires the service instantiation creation and subsequently calling of appropriate function in form:

```
$urlwsdl='http://omega.tuke.sk/pavel.horovcak/php_ws/wsd/chemform.wsd/';
```

```
$ws = new SoapClient ($urlwsdl);
```

```
$result = html_entity_decode($ws->getChemForm($formula));
```

where *\$formula* contains formula input string in an ASCII form and *\$urlwsdl* is a service's WSDL file address. The application functionality is documented by its calling in testing website (<http://www.ispavilon.tuke.sk/chemformtest.php>). Web service utilization is real everywhere where is necessary to present chemical formula on web site. Designed web service is disposable free of charge for the possible persons concerned.



JUBILEJNÍ 20. CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ KONFERENCE S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

## APROCHEM 2011

TECHNOLOGIE • ROPA • PETROCHEMIE • POLYMERY • BEZPEČNOST • PROSTŘEDÍ  
11. – 13. DUBEN 2011 • KOUTY NAD DESNOU • JESENÍKY • HOTEL DLOUHÉ STRÁNĚ

APROCHEM 2011 • PCHE • Na Dračkách 13, 162 00 Praha 6

T/F: 220 518 698, M: 607 671 866 • E: [pche@csvts.cz](mailto:pche@csvts.cz) • [www.aprochem.cz](http://www.aprochem.cz)

Připravuje PCHE s ČSPCH, ČSCH, ČSCHI, VŠCHT Praha, SCHP ČR, ÚCHP AV ČR.

## ODPADOVÉ FÓRUM 2011

6. ROČNÍK ČESKO-SLOVENSKÉHO SYMPOSIA  
VÝSLEDKY VÝZKUMU A VÝVOJE PRO ODPADOVÉ HOSPODÁŘSTVÍ

### OZE 2011 • 2. ročník konference ALTERNATIVNÍ ENERGIE

13. – 15. DUBEN 2011 • KOUTY NAD DESNOU • JESENÍKY • HOTEL DLOUHÉ STRÁNĚ

Připravuje CEMC – České ekologické manažerské centrum, Jevanská 12, 100 31 Praha 10  
T: 274 784 448, 723 950 237 • F: 274 775 869 • E: [symposium@cemc.cz](mailto:symposium@cemc.cz) • [www.odpadoveforum.cz](http://www.odpadoveforum.cz)

DOPROVODNÉ TECHNICKÉ VÝSTAVKY, FIREMNÍ PREZENTACE A LOGA  
v tištěných materiálech a na CD ROM

1. Cirkulář v září 2010. Přihlášky přednášek do 15. 1. 2011. Plná znění do 15. 3. 2011.
2. Cirkulář s Programem v únoru 2011. Přihlášky účasti budeme prosit do 31. 3. 2011.

Registrace na jedné akci umožní účast na obou za výhodných podmínek.  
Nepřehlédněte místo konání opět v Koutech nad Desnou, Jeseníky. Sledujte web.

Zveme Vás k účasti a těšíme se na společné setkání.

## MOŽNOSTI PŘÍPRAVY MAKROMOLEKULÁRNÍCH ANTIDEGRADANTŮ PRO POLYMERY

JIŘÍ PODEŠVA a JANA KOVÁŘOVÁ

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6  
podesva@imc.cas.cz

Došlo 15.7.10, přijato 30.9.10.

Klíčová slova: makromolekulární antidegradanty, anti-oxidanty, stabilizátory, degradace polymerů, stabilizace polymerů

### Obsah

1. Úvod
2. Mechanismy degradace
3. Mechanismy působení antidegradantů
4. Syntézy
5. Závěr

### 1. Úvod

Polymerní materiály vystavené povětrnosti nebo zpracovatelským podmínkám podléhají – v důsledku komplexních procesů, zejména fotooxidace a termooxidace – nežádoucím chemickým změnám svých makromolekul, tedy degradaci, která má za následek postupnou ztrátu jejich užitečných vlastností. Nejobvyklejším způsobem ochrany proti degradaci je přidavek antidegradantů, v množství většinou do 1 procenta, což prakticky nevyžaduje změnu způsobu zpracování polymeru. Na trhu je široká škála těchto látek, vhodných pro ochranu různých polymerních typů. V literatuře existuje určitá nejednotnost v terminologii: výraz antidegradant se nevyskytuje příliš často, i když je podle našeho názoru vhodným obecným termínem. Slovem „stabilizátor“, zejména ve slovním spojení světelný nebo UV stabilizátor, se v užším smyslu míní látka, chránící polymer před působením záření, ale často se užívá právě v obecném smyslu „antidegradant“. Klasifikace antidegradantů (viz níže) je spíše formální, protože jeden a týž antidegradant často působí více mechanismy, a většinou se účinky těchto látek překrývají.

Titul předkládaného příspěvku byl takto zvolen proto, že jednodušší výraz „polymerní stabilizátory“, který lze rovněž vztáhnout na tuto tematiku, by mohl být zavádějící. Je-li totiž např. do příkazového řádku Web of Science zadán vyhledávací profil s dvouslovným spojením „polymer\* stabilizer\*“, pak značná část nalezených prací se týká zcela jiných oblastí: Jednak jsou to disperzní polymerizace běžných monomerů, kde makroskopickému vy-

srázení vznikajících makromolekul z polymerizačního média lze bránit tak, že rostoucí disperzní částice jsou udržovány v koloidním stavu (stabilizovány) pomocí předem přidaného polymeru (v technické praxi je to často polyvinylpyrrolidon). Další část prací nalezených pod tímto profilem je věnována jakýmkoliv, tedy i běžným komerčním nízkomolekulárním stabilizátorům ve smyslu „stabilizers for polymers“. V tomto sdělení se však budeme zabývat pouze takovými látkami, ve kterých jsou účinné skupiny, chránící daný polymer před degradujícími vlivy vnějšího prostředí, připojeny kovalentními vazbami k řetězci polymeru, s výhodou chemicky téhož, jaký má být chráněn, což má význam pro kompatibilitu. Ve výsledném systému pak účinné substituenty visí buď na všech řetězcích, anebo pouze na menší části z nich, která se přidává jako tzv. „masterbatch“ a je rozptýlena v matici chráněného polymerního materiálu. Hlavním předmětem předkládaného článku je syntéza těchto látek, ale pokládáme za nutné stručně (a zjednodušeně) zmínit i chemickou podstatu degradací a účinku antidegradantů.

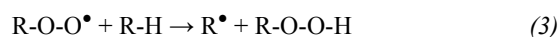
### 2. Mechanismy degradace

Rozlišuje se termooxidativní a fotooxidativní degradace, i když oba procesy často probíhají souběžně. Jejich průběhy závisí samozřejmě na chemické povaze daného polymeru; my je budeme ilustrovat na příkladu nejběžnějších masově vyráběných polymerů, totiž polyolefinů (např. polyethylenu nebo polypropyleny), ale mnohé ze zde uvedených schémat platí i pro jiné polymery, např. polydieny.

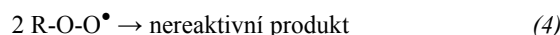
Termooxidace je složitý autooxidační a autoakcelerující řetězový proces, který probíhá i bez přítomnosti světla či obecně záření, ale samozřejmě téměř neprobíhá v nepřítomnosti kyslíku. V navrženém autooxidačním schématu (viz např. cit.<sup>1</sup>) vzniká iniciační reakcí polymerní radikál, a to homolytickým rozštěpením vazby C-H působením tepla, případně v kombinaci s mechanickým namáháním, podle rovnice (1):



kde R reprezentuje uhlíkatý řetězec polymeru. V propagačním kroku reaguje radikál  $\text{R}^\bullet$  s kyslíkem a vzniklý peroxidický radikál odtrhává další vodík:



Pro jednoduchost vynecháme větvící reakce a mechanismus uzavřeme terminační reakcí:



kde chemická povaha produktu závisí na struktuře radikálů R.

U fotooxidační degradace (viz např. cit.<sup>1,2</sup>) se předpo-

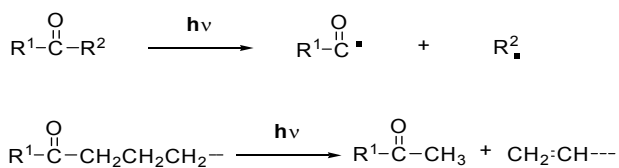


Schéma 1. Norrishovy reakce

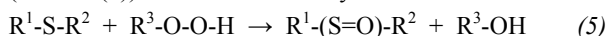
kládá, že propagační a terminační kroky jsou srovnatelné s degradací termooxidační, a hlavní rozdíl je v iniciaci, tedy tvorbě primárního radikálu. Polyolefiny neabsorbují záření v oblasti viditelného světla, takže absorpujícími species musí být látky buď již přítomné v polymeru formou minoritní příměsi (např. polymerizační katalyzátory) nebo skupiny vzniklé přímo na řetězci skladováním polymeru na vzduchu, např. karbonyly, které i v malém množství mohou iniciovat fotodegradaci Norrishovými reakcemi (schéma 1), přičemž pouze první z těchto reakcí vede k radikálům.

### 3. Mechanismy působení antidegradantů

Antidegradanty působící proti termooxidaci, tedy antioxidanty, jsou látky velmi důležité pro ochranu nejen polyolefinů. Rozlišujeme antioxidanty primární a sekundární. Mezi ty první patří např. aromatické aminy nebo látky obsahující vhodně stericly chráněnou fenolickou strukturu, které jsou – na rozdíl od aromatických aminů – zdravotně nezávadné. Fenolické antioxidanty působí tak, že blokují cyklický propagační krok (viz např. cit.<sup>4</sup>), popsaný zde rovnicemi (2) a (3). Mechanismus jejich transformace působením peroxoradikálů je uveden na schématu 2.

Sekundární antioxidanty, většinou organické sloučeniny fosforu nebo síry, nejčastěji pak thioethery, působí tak, že rozkládají hydroperoxydy, které se tvoří během propagační reakce (rovnice (2) a (3)), mění je neradikálovou cestou na alkoholy a samy se přeměňují na sulfoxidy

(rovnice (5)) či dále až na sulfony:



Antidegradanty zabraňující fotooxidativní degradaci se označují jako světelné stabilizátory nebo UV-stabilizátory. Ty lze podle účinku dělit na UV absorbéry (např. substituované deriváty *o*-hydroxybenzofenonu či *o*-benzotriazolu), zhasiče excitovaných stavů (quenchers, např. různé cheláty niklu) nebo lapače radikálů (scavengers). Pro polyolefiny jsou nejdůležitějšími UV-stabilizátory stericly chráněné deriváty piperidinu, tzv. HALS (hindered amine light stabilizers), které se během degradačního procesu oxidují na nitroxidy. Ty působí jako lapače radikálů, se kterými dávají alkyloxyaminy. Podle Denisovova cyklu se pak reakcí alkyloxyaminů s peroxoradikály regenerují nitroxidy (schéma 3).

Pro předkládaný článek, který je zaměřen zejména na syntézu makromolekulárních antidegradantů, je podstatná skutečnost, že mechanismus působení antidegradantu v zásadě nezávisí na tom, zda je jeho struktura přítomna ve volné formě jako příměs v polymerní matici nebo vhodně připojena chemickou vazbou k řetězci.

### 4. Syntézy

Makromolekulární antidegradanty jsou předmětem celé řady přehledných článků, většinou obecných, bez omezení na určitý typ polymeru určeného k ochraně<sup>5–11</sup> nebo i zaměřeného na určitý druh, např. kaučuky a jejich vulkanizáty<sup>12,13</sup>. Důvodem, proč již více než dvě dekády probíhá jejich intenzivní výzkum, je jedna nevýhodná vlastnost jejich nízkomolekulárních analogů, které se přidávají do masově vyráběných technických polymerů: koncentrace těchto nízkomolekulárních komerčně dostupných chránících sloučenin může v polymerní matici s časem postupně klesat, zejména v extrémních podmínkách, jako jsou např. vysoké teploty, mechanické namáhání nebo působení vnějších kapalin, neboť malé molekuly se mohou z matrice vypařovat nebo být vymývány (extrahovány).

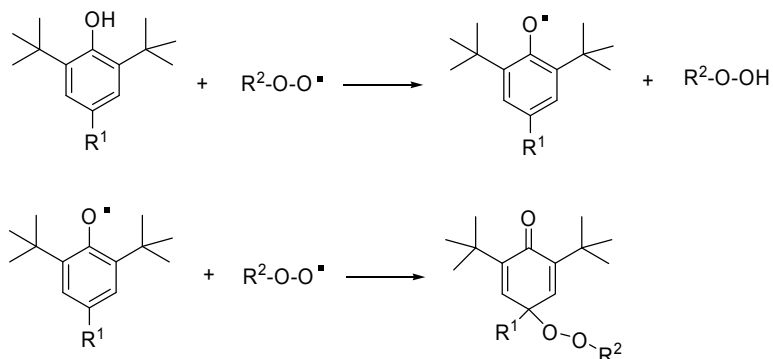


Schéma 2. Transformace fenolických antioxidantů

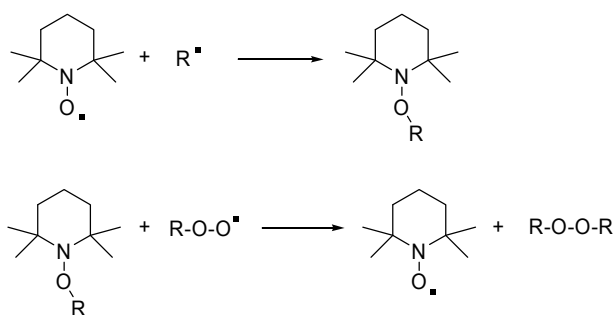
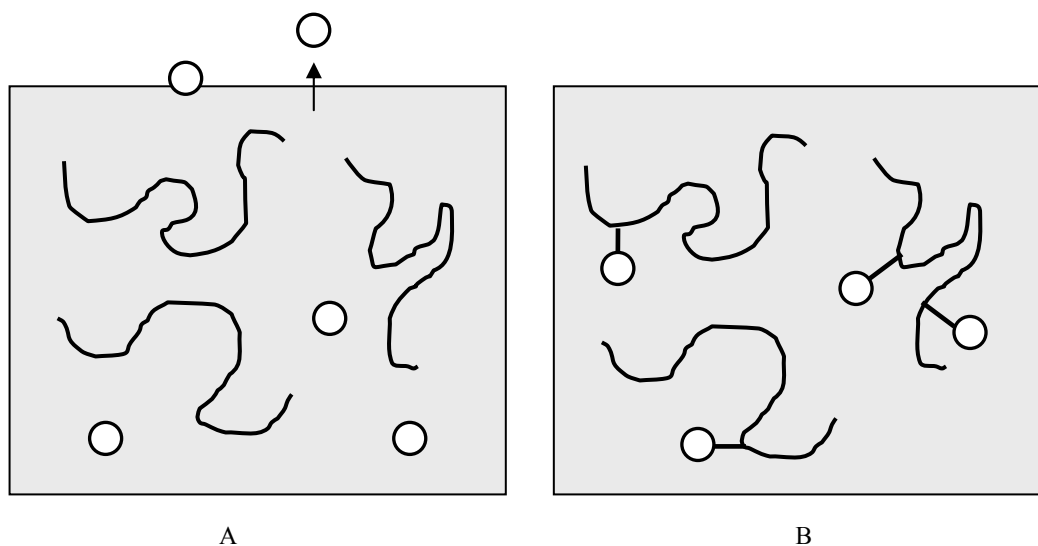


Schéma 3. Denisovův cyklus

Tím samozřejmě slábne i jejich účinek. Částečně lze tomuto efektu zabránit zvyšováním molární hmotnosti antidegradantů, ale jen do jisté míry a navíc tím většinou roste cena tohoto aditiva. Pokud je však účinná látka připojena k makromolekule, přičemž jedna makromolekula může nést těchto substituentů více, klesá přirozeně její tenze park nule a rovněž tak její schopnost difundovat polymerní maticí, jak je schématicky znázorněno na obr. 1. Dalo by se očekávat, že nižší rychlost difuze může zhoršit „akční radius“ chránící skupiny, ale do značné míry lze tuto nevýhodu omezit tím, že mezi polymerní řetězec a vlastní účinnou strukturu se zabuduje ohebný distanční řetězec (tzv. spacer), takže tato struktura pak visí na konci krátkých větví. Vliv délky distančního řetězku na antidegradantní účinnost nebyl dosud systematicky studován, ale na základě některých údajů lze soudit, že není velký rozdíl v účinnosti volného (volně maticí difundujícího) a chemicky připojeného antidegradantu (viz dále).

Studované materiály lze klasifikovat jednak podle chemické struktury účinné látky, přítomné na řetězci, jednak podle způsobu syntézy.



Obr. 1. Schématické srovnání antidegradantu přítomného v polymerní maticí formou nízkomolekulární příměsi (A) a formou substituentu kovalentně vázaného k řetězci (B). U případu A je znázorněno vypařování příměsi z matrice

Ve schématu 4 je uvedeno několik příkladů struktur antidegradantů, včetně poloh, ze kterých vychází připojení k polymerním řetězcům. Tak např. existují polymerní antioxidanty obsahující stěrky chráněný fenolický substituent, polymerní světelné stabilizátory nesoucí HALS, polymerní UV absorbéry skupiny triazinů, benzotriazolů nebo benzofenonu, deriváty fenylendiaminu, a mnoho jiných.

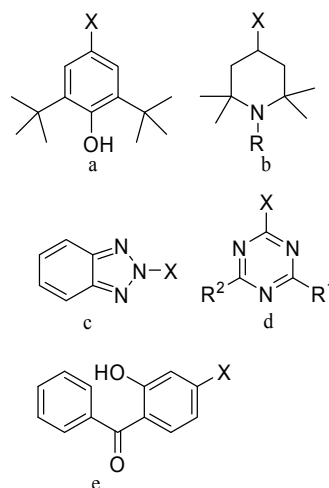


Schéma 4. Příklady účinných struktur antidegradantů: deriváty 2,6-di-*tert*-butylfenolu (a, antioxidant), 2,2,6,6-tetramethylpiperidinu (b, HALS, světelný stabilizátor), benzotriazolu (c), 1,3,5-triazinu (d) a benzofenonu (e, UV absorbéry). X symbolizuje směr připojení dané struktury k polymernímu řetězci, většinou se vázaným distančním řetězčkem (spacerem), R je vodík nebo methyl, R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup> jsou variabilní substituenty



Existují v zásadě dvě strategie syntézy makromolekulárních antidegradantů: 1) polymerizace derivátu nízkomolekulárního antidegradantu nesoucího vhodnou polymerizovatelnou skupinu, např. vinylovou, případně jeho kopolymerizace s jiným monomerem, a 2) připojení nízkomolekulárního antidegradantu k předem připravenému polymernímu řetězci vhodnou chemickou (tzv. polymeranalogickou) reakcí. Zjednodušeně je to znázorněno na schématu 5. Obě strategie jsou známy již dosti dlouho (zhruba od počátku 80. let) a v obou případech vznikají modifikované řetězce, které lze označit jako autostabilizující (self-stabilizing).

Postup 1) je používán pro zabudování monomerů nesoucích UV absorbéry (např. cit.<sup>14,15</sup>), antioxidanty<sup>16</sup> a lapače radikálů na bázi HALS<sup>17,18</sup> do polymerních řetězců. Tak např. kopolymery 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinylmethakrylátu nebo 1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidinylmethakrylátu s běžnými vinylovými monomery, jako je styren, methylmethakrylát a další, byly s úspěchem přidávány jako aditivum do polypropylenu, čímž se oproti nízkomolekulárním analogům zvýšila radiační odolnost této matrice při současném významném snížení extrahovatelnosti<sup>19</sup>. Kromě vinylové skupiny se může např. k antidegradantu jako polymerizovatelná funkce připojit i maleimidová struktura<sup>20</sup> nebo norbornenová struktura, jejíž polymerizací s otevřením kruhu (metatéze) pomocí speciálních katalyzátorů a následnou hydrogenací vzniká polymerní antioxidant, schopný stabilizovat polypropylen (cit.<sup>21,22</sup>). Tyto (ko)polymery mohou být i modelovým materiálem pro studium fyzikálních jevů spojených s absorpcí UV záření, viz např. cit.<sup>23</sup>. V posledních letech je tento postup často uplatňován v nejrůznějších technických aplikacích, což je usnadněno tím, že několik radikálově polymerizovatelných antidegradantů nesoucích vinylovou skupinu je dostupných na trhu, např. 1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidinyl-methakrylát, 2-hydroxy-4-akryloyloxyethoxybenzofenon (Cyasorb® UV-416) nebo 2-[3-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-hydroxyfenyl]ethylmethakrylát (Tinuvin®

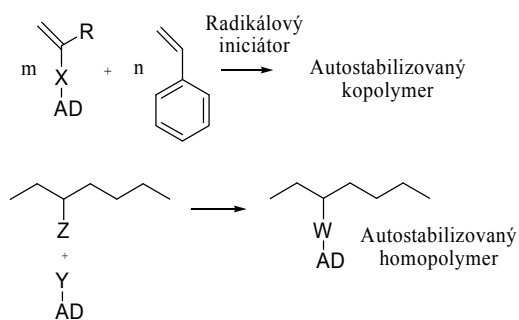


Schéma 5. Zjednodušené srovnání dvou základních syntetických postupů přípravy makromolekulárních antidegradantů na příkladech radikálové kopolymerizace vinylových monomerů a polymeranalogické reakce na předem připraveném polymerním substrátu. R je vodík nebo methyl, X je vhodná skupina, např. COO nebo inertní spacer, AD označuje antidegradant a Y a Z jsou skupiny reagující za vzniku W

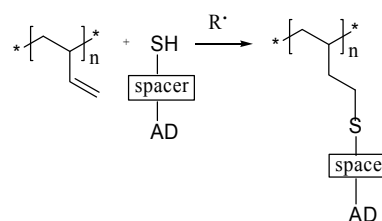


Schéma 6. Radikálová adice antidegradantu (AD) na visící vinylovou skupinu 1,2 polybutadienu prostřednictvím thiolové skupiny. R• znázorňuje volný radikál vzniklý rozpadem iniciátoru

R-794). Tyto látky se používají jako komonomery spolu s běžnými vinylovými monomery pro přípravu kopolymerů s nejrůznějším použitím, jako je stabilizace polymerních emulzí, ochrana polymerních filmů (povlaků) apod.; jen za období 2008–2009 jsou předmětem několika desítek patentů, viz např. cit.<sup>24–27</sup>.

Strategie 2) vyžaduje, aby na řetězci byly přítomny nebo dodatečně vytvořeny reaktivní skupiny, na které lze možno připojit – prostřednictvím komplementárních skupin – vhodně upravené molekuly antidegradantů. Z formálního hlediska lze pokládat tento proces za roubování polymeru (grafting). Tak např. polybutadien obsahující větší podíl 1,2 monomerních jednotek (nesoucích tzv. visící vinylovou skupinu) může sloužit jako substrát pro adice. Obsahuje-li adovaná molekula antidegradantu thiolovou skupinu, je možno ji na visící vinyl snadno adovat radikálovým mechanismem za použití běžného radikálového iniciátoru (schéma 6).

Nejstarší práce tohoto druhu popisují úspěšné adice dvou antidegradantů nesoucích SH skupinu na butadienovou složku akrylonitril-butadien-styrenového latexu (ABS), tj. částečně zesíťovaného kopolymeru vzniklého kopolymerizací akrylonitrilu a styrenu v přítomnosti polybutadienu<sup>28–30</sup>.

Podobný postup byl úspěšně uplatněn v případě OH-telechelických polybutadienů s krátkým řetězcem (tzv. kapalných kaučuků LBH vyráběných v Kralupech), na jejichž vinylové skupiny byl adován jednak 6-sulfanylhexyl-3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyfenyl)propanoát, jednak (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-4-sulfanylbutanoát, a také obě tyto sloučeniny současně na jeden a týž řetězec<sup>31–33</sup>. Takto modifikované kapalně kaučuky byly přimíchávány do původního kapalného kaučuku a bylo prokázáno, že účinnost jak fenolické, tak i piperidinové struktury není měřitelně ovlivněna připojením k polybutadienovému řetězci, přičemž ziskem je trvalá přítomnost těchto struktur v matrici. Navíc, v případě kombinovaného produktu byl zjištěn synergický účinek. Pro ověření, že tento účinek není omezen na krátké řetězce kapalného kaučuku (o molární hmotnosti 2–3000 g mol<sup>-1</sup>), byla provedena analogická studie, kdy OH-telechelické kapalně polybutadieny byly prostřednictvím svých koncových skupin OH předem zabudovány do elastomerního polyurethanu (o molární

hmotnosti řádově desítek tisíc  $\text{g mol}^{-1}$ ), na jehož visící vinyly pak byla adována první z obou uvedených thiolových sloučenin<sup>34</sup>. Ani zde nebyla antioxidační účinnost fenolické skupiny snížena jejím připojením k řetězci. Jiný přístup zvolili Hetflejš a spol.<sup>35</sup>, kteří k nízkomolekulárním antidegradantům fenolického a piperidinového typu připojili místo skupiny SH skupinu OH (oddělenou od vlastní účinné struktury krátkým siloxanovým řetízkiem – spacerem) a tyto produkty pak přidávali do reakční směsi pro přípravu polyurethanů (spolu s OH-telechelickým kapalným kaučukem a běžným diisokyanátem). Zde se účinné struktury zabudovávaly pouze na konci řetězce a sloužily tedy současně jako regulátory molární hmotnosti polyurethanu. I zde se prokázalo, že – v přepočtu na stejnou molární koncentraci účinných struktur – nezáleží na tom, zda antidegradant je přítomen v polymerní matici ve volném stavu (jako nízkomolekulární příměs) nebo připojen kovalentní vazbou k řetězci.

Zajímavý je postup Lukáče a spol., kteří získali bromovaný polyethylen tak, že provedli hydrobromaci polyoktenameru, vzniklého polymerizací cyklooktenu. V řetězci tohoto polymeru se střídá 6 skupin  $\text{CH}_2$  a jedna vazba  $\text{C}=\text{C}$ , která reaguje s  $\text{HBr}$ . Nukleofilní substitucí bromu na řetězci produktu hydrobromace 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidinem zabudovali tuto antidegradantovou strukturu na řetězec<sup>36</sup>. Podobnou substitucí použili Tseng a spol.<sup>37</sup>, kteří nechali reagovat kooligomer styrenu a chloromethylstyrenu s 2,6-di-*tert*-butylfenoxidem draselným za vzniku polymerního antioxidantu, kde derivát fenolu je připojen k řetězci v poloze 4 benzenového jádra. Jednoduchým, i když nepřilíhš dobře definovaným způsobem byl na polyethylen naroubován derivát fenolického antioxidantu nesoucí na molekule maleimidovou skupinu, a to za podmínek zpracování v tavenině v přítomnosti radikálových iniciátorů<sup>38</sup>.

## 5. Závěr

Makromolekulární antidegradanty jsou polymery, k jejichž řetězci jsou chemickou vazbou připojeny struktury odvozené od nízkomolekulárních antioxidantů, stabilizátorů a dalších chránících sloučenin, a které jsou výhodné pro ochranu polymerních matic proti vlivu vnějších podmínek (zejména kyslíku a záření), jestliže za těchto podmínek je zvýšené riziko vypařování nebo vymývání nízkomolekulárních látek (např. při vyšších teplotách nebo mechanickém namáhání). Tento referát uvádí zejména přehled vybraných syntéz makromolekulárních antidegradantů. V poslední době se kromě akademických prací na toto téma stále častěji vyskytují studie technologické. To je dokladem, že koncept polymerně vázaných antidegradantů byl úspěšně realizován a že další výzkum a vývoj je velmi žádoucí.

*Tato práce vznikla za podpory Ministerstva průmyslu a obchodu ČR (grant FR-TI2/338).*

## LITERATURA

- Al-Malaika S., v knize: *Atmospheric Oxidation and Antioxidants* (Scott G., ed.), sv. 1, str. 45. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1993.
- Gugumus F., v knize: *Oxidation Inhibition in Organic Materials* (Pospíšil J. a Klemchuk P. P., ed.), sv. 2, str. 29. CRC Press, Boca Raton 1989.
- Müller H., v knize: *Plastic Additives Handbook* (Gächter R. a Müller H., ed.), str. 110. Hanser Publisher, München 1990.
- Pospíšil J., v knize: *Oxidation Inhibition in Organic Materials* (Pospíšil J., Klemchuk P. P., ed.), svazek I, str. 33. CRC Press, Boca Raton 1990.
- Scott G., v knize: *Polymer Stabilization and Degradation* (Klemchuk P. P., ed.). ACS Symp. Ser. 280, str. 173. American Chemical Society, Washington, D.C. 1985.
- Pospíšil J.: *Angew. Makromol. Chem.* 158, 221 (1988).
- Švec P., Rosík L., Horák Z., Večerka F., v knize: *Styrene-Based Plastics and Their Modification*, str. 251. Ellis Horwood, New York 1989.
- Pospíšil J., v knize: *Oxidation Inhibition in Organic Materials* (Pospíšil J., Klemchuk P. P., ed.), svazek I, str. 193. CRC Press, Boca Raton 1990.
- Pospíšil J.: *Advan. Polym. Sci.* 101, 65 (1991).
- Lau W. W. Y., Pan J. Q., v knize: *Polymeric stabilizers and antioxidants. Desk Reference of Functional Polymers, Syntheses and Applications*, Part 4 (Arshady R., ed.), str. 621. Amer. Chem. Soc., Washington, D. C. 1997.
- Pospíšil J., Habicher W. D., Nešpůrek S.: *1<sup>st</sup> International Symposium on Reactive Polymers in Inhomogeneous Systems, in Melts and at Interfaces, July 16-19, 2000*, Dresden University of Technology. *Macromol. Symposia* 164, 389 (2001).
- Huntink N. M., Datta R. N., Noordermeer J. W. M.: *Rubber Chem. Technol.* 77, 476 (2004).
- Datta R. N., Huntink N. M., Datta S., Talma A. G.: *Rubber Chem. Technol.* 80, 436 (2007).
- Vogl O., v knize: *Polymer Stabilization and Degradation* (Klemchuk P. P., ed.), ACS Symposium Series 280, str. 197-210. American Chemical Society, Washington, D.C. 1985.
- Crawford J. C.: *Prog. Polym. Sci.* 24, 7 (1999).
- Rabek J. F.: *Photostabilization of Polymers*. Elsevier, New York 1990.
- Monotobu M: *Polym. Degrad. Stabil.* 25, 121 (1989).
- Gugumus F.: *Angew. Makromol. Chem.* 190, 111 (1991).
- Wang H., Chen W.: *J. Appl. Polym. Sci.* 69, 2649 (1998).
- Oh D. R., Kim H. K., Lee N., Kim T. H.: *Bull. Korean Chem. Soc.* 22, 629 (2001).
- Xue B., Ogata K., Toyota A.: *Polym. Degrad. Stabil.* 93, 347 (2008).
- Xue B., Toyota A.: *Polym. Bull.* 62, 327 (2009).

23. Keck J., Stuber G. J., Kramer H. E. A.: *Angew. Makromol. Chem.* 252, 119 (1997).
24. Mukuta T., Masaaki K. (Mitsubishi Rayon Co.): JP 2009144047 (2009).
25. Okawara C., Yoshida S., Hachisuka T. (Mitsubishi Plastics): WO 2009096390 (2009).
26. Kim J. U., Kim D. B., Kim J. H. (Dongjin Semichem Co.): KR 2009072015 (2009).
27. Morihiro S. (Nippon Shokubai Co.): JP 2009013337 (2009).
28. Fernando W. S. E., Scott G.: *Eur. Polym. J.* 16, 971 (1980).
29. Ghaemy M., Scott G.: *Polym. Degrad. Stabil.* 3, 405 (1981).
30. Kolawole E. G., Scott G.: *J. Appl. Polym. Sci.* 26, 2581 (1981).
31. Podešva J., Kovářová J.: *J. Appl. Polym. Sci.* 87, 885 (2003).
32. Podešva J., Kovářová J., Spěváček J.: CZ 296584 (2006).
33. Podešva J., Kovářová J., Spěváček J.: CZ 299104 (2008).
34. Podešva J., Kovářová J., Hrdíčková M., Netopilík M.: *Polym. Degrad. Stabil.* 94, 647 (2009).
35. Hetflejš J., Šabata S., Podešva J., Kovářová J., Prokůpek L., Netopilík M., Spěváček J., Sýkora J.: *Polym. Degrad. Stabil.* 95, 579 (2010).
36. Lukáč I., Chmela S., Pilichowski J. F., Lacoste J.: *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* A35, 1337 (1998).
37. Tseng T.-W., Tsai Y., Lee J.-S.: *Polym. Degrad. Stabil.* 58, 241 (1997).
38. Kim T. H., Kim H. K., Oh D. R., Lee M. S., Chae K. H., Kaang S. Y.: *J. Appl. Polym. Sci.* 77, 2968 (2000).

**J. Podešva and J. Kovářová** (*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Preparation of Macromolecular Antidegradants for Application in Polymers**

Macromolecular antidegradants are common antioxidants, UV-stabilizers or other protective compounds attached to polymer chains by covalent bonds. Similarly as their low-molar-mass analogs (precursors), they protect polymer materials against undesirable changes (e.g., decrease of molar mass, change of color etc.) due to ambient conditions (oxygen, light, UV radiation) but they do not evaporate and cannot be extracted or washed out from polymers. At present, these polymeric additives appear in publications, patents and technological studies more frequently than previously. The review describes selected syntheses of macromolecular antidegradants.

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### ŠTÚDIUM LAKTÁZY V IMOBILIZOVANÝCH BUNKÁCH A KULTIVAČNOM MÉDIU *Arabidopsis thaliana*

JÁN STANO<sup>a</sup>, KLAUS NEUBERT<sup>c</sup>, WERNER  
ROOS<sup>d</sup>, KAROL MIČIETA<sup>e</sup>, MARCELA  
KOREŇOVÁ<sup>a</sup> a VÍTAZOSLAVA BLANÁRIKOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Záhrada liečivých rastlín, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava,

<sup>b</sup> Katedra molekulárnej a subcelulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, <sup>c</sup> Ústav biochémie a biotechnológie, Univerzity Martina Luthera, ul. K. Mothesa 3, 06120 Halle, <sup>d</sup> Ústav farmaceutickej biológie a farmakológie, Oddelenie molekulárnej biológie University Martina Luthera, ul. K. Mothesa 3, 06120 Halle,

<sup>e</sup> Katedra botaniky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Révová 39, 811 02 Bratislava  
micieta@fns.uniba.sk

Venované Prof. RNDr. Danielovi Grančaiovi CSc. odborníkovi v oblasti farmakognózie z Farmaceutickej fakulty UK v Bratislave pri príležitosti 60. narodenín.

Došlo 16.10.09, prepracované 5.2.10, prijaté 18.2.10.

Kľúčové slová: distribúcia, imobilizácia, permeabilizácia, *Arabidopsis thaliana*, laktáza

### Úvod

Je zaujímavé, že sacharidom, ako súčasťou každého živého organizmu a organickej súčasťou početných prírodných látok s dôležitými funkciami v širokom spektre rôznych biologických procesov popri aminokyselinách a nukleových kyselinách sa až v ostatných desaťročiach venuje náležitá pozornosť.

Kvalita potravín je vo veľkej miere podmienená a závislá na kvalite, kvantite, štruktúre a fyzikálno-chemických vlastnostiach sacharidov, peptidov a iných jej zložiek. Biotransformácia niektorých látok hrá dôležitú úlohu v rôznych biotechnologických procesoch<sup>1–3</sup>. Pri biosyntéze, biotransformácii a štúdiu prírodných látok sa využíva celý rad multifunkčných enzýmových komplexov.

Ukázalo sa, že sacharidy, ako aj ich deriváty a glykozidázy majú dôležitú úlohu v rôznych oblastiach základného a aplikovaného výskumu<sup>4–6</sup>.

Imobilizácia enzýmov reprezentuje efektívny spôsob ochrany početných biokatalyzátorov, ktoré nachádzajú uplatnenie vo výrobných procesoch. Rastlinné bunky prvýkrát imobilizoval Brodelius<sup>7</sup>. Obaľovanie (enkapsulácia) buniek a enzýmov hydrogélmi patrí medzi veľmi často používané imobilizačné techniky. Spontánnu adhéziu, ako aj kovalentnú väzbu buniek na povrch nosičov popísali Jirků a spol.<sup>8</sup>, Gill a Ballestros<sup>9</sup>. Pri imobilizácii sa nedávno použil polyvinylalkohol<sup>10</sup> a glutaraldehyd<sup>11</sup>.

Laktáza ( $\beta$ -D-galaktózid galaktohydroláza EC 3.2.1.23),  $\beta$ -galaktózidáza katalyzuje hydrolyzu laktózy na glukózu a galaktózu – štiepi  $\beta$ -(1-4)-0-glykozidickú väzbu. Okrem laktázy možno laktózu hydrolyzovať aj chemicky (kyslou hydrolyzou). Študovaný enzým sa používa aj pri biosyntéze galakto-oligosacharidov a cerebrálnych galaktolipidov<sup>12</sup>.

Rozvoj imobilizačných techník, dôkaz a stanovenie aktivity biokatalyzátorov sú závislé na progrese biotechnologických procesov. Hlavnou bariérou transportu početných látok sú membrány buniek, a preto sme pozornosť sústredili aj na ich permeabilizáciu. Predpokladáme, že imobilizované bunky alebo biokatalyzátory rastlinného pôvodu, podobne ako mikrobiálne, môžu v budúcnosti zohrať dôležitú úlohu v biotechnologických procesoch<sup>7</sup>. V predloženej práci sa študoval vplyv permeabilizácie na enzýmovú hydrolyzu laktózy pomocou imobilizovaných buniek *Arabidopsis thaliana*, ako aj distribúcia intra- a extracelulárnej laktázy z testovaných buniek.

Dostupnosť jednoduchej a rýchlej skríningovej metódy detekcie laktázy a tiež imobilizácie študovaného enzýmu, má veľký význam ako pre vedecko-výskumné, tak aj pre priemyselné účely. Pri tejto jednoduchej a rýchlej metóde dôkazu a stanovenia laktázy sa výhodne používajú syntetické substráty:  $\beta$ -naftylamidy, *o*- resp. *p*-nitroanilidy galaktózy.

### Experimentálna časť

#### Rastlinný materiál

Kalusové a suspenzné kultúry arábovky Thalovej [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cv. *Columbia*] sa odvodili z kľúčnych rastlín. Tieto kultúry sa pestovali v kultivačnom médiu podľa Linsmayera a Skooga<sup>13</sup> s prídavkom 1 mg l<sup>-1</sup> kyseliny 2,4-dichlórfenoxiactovej, 0,1 mg l<sup>-1</sup> kinetínu a 3% sacharózy, na rotačnej trepačke v priebehu 14 dní podľa Viehwegera a spol.<sup>14</sup>.

#### Permeabilizácia buniek

Bunky pestované v suspenznej kultúre sa jednotlivito

permeabilizovali Tweenom, alkoholom, hexadecyltrimetylamoniumbromidom a hexadecylpyridiniumchloridom nasledovne: po 20 g suspenzne pestovaných buniek sa po odfiltrovaní a premytí 1,5 l 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl permeabilizovalo 70 ml: 5 % Tweenu 20, 5 % Tweenu 80, 30 % etanolu, 50 % etanolu, 0,1 % hexadecyltrimetylamoniumbromidom, 0,1 % hexadecylpyridiniumchloridom resp. 3 hodiny za pomalého miešania (60 rpm) pri laboratórnej teplote. Permeabilizované bunky sa po premytí 3,5 l destilovanej vody a 4 l 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl imobilizovali glutaraldehydom.

#### Imobilizácia buniek glutaraldehydom

20 g permeabilizovaných buniek sa prenieslo do 70 ml 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl, pomaly sa pridalo 7 ml 25% glutaraldehydu a pri laboratórnej teplote sa za pomalého miešania (60 rpm) imobilizovali 2 hodiny. Imobilizované bunky sa premyli 3,5 l destilovanej vody, 4 l 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl a uchovávali v 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl pri 4 °C.

#### Stanovenie čerstvej hmotnosti a sušiny

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

#### Využitie glukózy

Využitie glukózy suspenznými a imobilizovanými bunkami sa sledovalo

60 minút. Bunky suspenzných kultúr a imobilizované bunky sa preniesli do roztoku glukózy 200 mg l<sup>-1</sup> v 0,05 mol l<sup>-1</sup> Na-fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,0 a úbytok glukózy sa sledoval podľa Trindera<sup>15</sup>.

#### Životaschopnosť buniek

Životaschopnosť buniek sa sledovala podľa Dixon<sup>6</sup> za použitia trifenylnitrofenylchloridu (TTC), fluoresceín-diacetátu a kyslíkovej elektródy.

#### Dôkaz a stanovenie intra- a extracelulárnej laktázy

Pri dôkaze a stanovení intra- a extracelulárnej laktázy sa použili syntetické chromogénne substráty β-naftylamid a p-nitroanilid β-D-galaktózy.

#### Dôkaz extracelulárnej enzýmovej aktivity

Pri dôkaze extracelulárnej laktázy sa použil ako substrát 1-naftyl-β-D-galaktopyranozid. Laktáza enzýmovo hydrolyzuje substrát. Uvoľnený 2-naftol po reakcii s hexazotovaným p-rozanilínom alebo Fast Blue BB tvorí korešpondujúce azofarbivo. Extracelulárna laktáza sa identifikovala metódou podľa Lojdu a spol.<sup>17</sup> a Stowarda a Pearsa<sup>18</sup>.

10 mg 1-naftyl-β-D-galaktopyranozidu sa rozpustilo v 0,5 ml dimetylformamidu a 10 ml Mc Ilvainovho tlmivého roztoku pH 5,0. Do tohoto roztoku sa pridalo 10 mg Fast Blue BB alebo 10 ml pufrovaného hexazonium p-rozanilínu (9,4 ml Mc Ilvainovho tlmivého roztoku pH 5,0; 0,6 ml roztoku hexazonium p-rozanilínu a tento

roztok sa 0,1 N NaOH upravil na pH 5,0). K tejto zmesi sa pridalo ešte 10 ml 2% agaru v Mc Ilvainovom tlmivom roztoku pH 5,0 a autoklávovalo obvyklým spôsobom<sup>16</sup>.

Hexazonium p-rozanilín sa pripravil podľa Lojdu a spol.<sup>17</sup> nasledovne: Roztok A: 400 mg p-rozanilínu sa rozpustilo v 8 ml destilovanej vody a 2 ml HCl. Roztok B: 4% NaNO<sub>2</sub>. Roztok A a B sa zmiešali v rovnakých množstvách.

Takto pripravené agarové platne sa inokulovali bunkami kalusových kultúr a sterilne vypestovanými kľúčnymi rastlinami (3–5 dní starých) a inkubovali 20–100 minút.

#### Stanovenie intra- a extracelulárnej aktivity laktázy

##### Príprava enzýmu

Intracelulárna aktivita laktázy sa stanovila za použitia buniek suspenznej kultúry. Bunky (10 g) sa odfiltrovali a premyli 3 l destilovanej vody, zhomogenizovali vo vychladenej trecej miske s Mc Ilvainovým tlmivým roztokom pH 4,7 v pomere 1:1 (g ml<sup>-1</sup>). Homogenát sa prefiltraval cez silikónovú tkaninu, centrifugoval (10 min, 15 000 g pri 4 °C) a použil ako enzýmový preparát.

Pri stanovení extracelulárnej aktivity sa použilo kultivačné médium bez buniek (centrifugácia 10 min, 2000 g, mikroskopická kontrola neprítomnosti buniek). Supernatant sa použil na stanovenie extracelulárnej aktivity enzýmu.

##### Stanovenie aktivity enzýmu

Aktivita študovaného enzýmu sa stanovila modifikovanou metódou podľa Kim a spol.<sup>19</sup> za použitia p-nitrofenyl-β-D-galaktopyranozidu ako substrátu. Reakčná sústava obsahovala vhodné množstvo enzýmu (0,1–0,3 ml) 3·10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup> substrát v 2 ml Mc Ilvainovho tlmivého roztoku pH 4,7. V kontrolných pokusoch bol enzýmový preparát tepelne inaktívovaný (10 min pri 100 °C). Zmes sa inkubovala 15 min pri 30 °C a reakcia sa zastavila pridaním 2 ml 1 mol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Koncentrácia enzýmovo uvoľneného p-nitroanilínu sa stanovila spektrofotometricky pri 405 nm oproti kontrole. Enzýmová aktivita je vyjadrená v kataloch. Obsah bielkovín sa stanovil podľa Doumasa a spol.<sup>20</sup> za použitia hovädzieho sérumalbumínu ako štandardnej bielkoviny.

## Výsledky a diskusia

Rozvoj imobilizačných techník má veľký vplyv na vývoj biotechnológií. Imobilizácia buniek resp. biokatalyzátorov predstavuje veľmi dôležitý spôsob uchovávania (stabilizácie) vysokoúčinných biokatalyzátorov (enzýmov), ktoré sú dôležité pre biotransformačné procesy<sup>7,9,21</sup>.

Enkapsulácia (obaľovanie) buniek resp. enzýmov hydrogélmi prírodného resp. syntetického pôvodu nachádza široké uplatnenie v základnom a aplikovanom výskume, ako aj v priemyselnom meradle<sup>9</sup>. V tejto práci sme

zamerali svoju pozornosť na štúdium permeabilizácie a imobilizačnej techniky pomocou glutaraldehydu (bez použitia nosiča) na aktivitu laktázy v bunkách *Arabidopsis thaliana*.

Pri histochemickom a biochemickom štúdiu hydrolytických enzýmov sa výhodne aplikujú rôzne chromogénne substráty<sup>10,19</sup>. V predloženej práci sa použili tieto syntetické substráty 1-naftyl- $\beta$ -D-galaktopyranozid a *p*-nitroanilid- $\beta$ -D-galaktopyranozid<sup>15–17</sup>. Inokulá sa ponechali na kultivačných médiách so substrátom a bez substrátu 1–2 h. Rastlinné extracelulárne  $\beta$ -galaktozidázy sa detekovali pomocou červenohnedého zafarbenia, ktoré vzniká simultánnou azokopoláciou hexazotovaného *p*-roznilínu alebo Fast Blue BB resp. a zo substrátu enzýmovu uvoľneného 2-naftolu. Po inokulácii kultivačného média bez substrátu resp. inaktivovaným kalusom (10 min pri 100 °C) sa žiadne zafarbenie nepozorovalo. Červenohnedé zafarbenie vzniká na mieste kontaktu inokula s kultivačným médiom, v ktorom je prítomný 1-naftyl- $\beta$ -D-galaktopyranozid a hexazotovaný *p*-roznilín alebo Fast Blue BB.

Po vysadení sterilných klíčnych rastlín na agarové platne s 1-naftyl- $\beta$ -D-galaktopyranozidom a hexazotovaným *p*-roznilínom resp. bázickým fuksínom sa pozorovali farebné zmeny na koreňku a koreňových vláskoch ako aj na mieste ich kontaktu s platňou. Po inokulácii agarových platní kalusmi s 1-naftyl- $\beta$ -D-galaktopyranozidom a hexazotovaným *p*-roznilínom resp. bázickým fuksínom sa na mieste kontaktu kalusu s platňou pozorovali farebné zmeny, spôsobené tvorbou azofarbív. Tieto sa tvoria simultánnou azokopoláciou enzýmovu uvoľneného 2-naftolu s hexazotovaným *p*-roznilínom resp. bázickým fuksínom. V prípade tepelne inaktivovaného rastlinného materiálu (klíčne rastliny resp. kalusy 5 min 100 °C) sa azofarbivo netvorí. Laktáza ako aj iné hydrolázy majú významnú úlohu v metabolizme bunkovej steny a v jej prestavbe<sup>21–24</sup> v priebehu ontogenézy.

Porovnanie distribúcie intra- (38,8 %) a extracelulárnej (61,2 %) aktivity študovaného enzýmu poukazuje na minoritné zastúpenie intracelulárnej a majoritné zastúpenie extracelulárnej formy laktázy (tab. I).

Tabuľka I

Aktivita laktázy v 10-dňových bunkách suspenznej kultúry a v kultivačnom médiu *Arabidopsis thaliana*

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g <sup>-1</sup> sušiny]	Aktivita [pkat g <sup>-1</sup> sušiny]	Špecifická aktivita [pkat mg <sup>-1</sup> proteínov]
Intracelulárna aktivita (homogenat izolovaných buniek)	1	14,36±0,10	3,70±0,07	0,26
Extracelulárna aktivita (kultivačné medium bez buniek) <sup>a</sup>	10	6,36±0,10	5,83±0,10	0,92

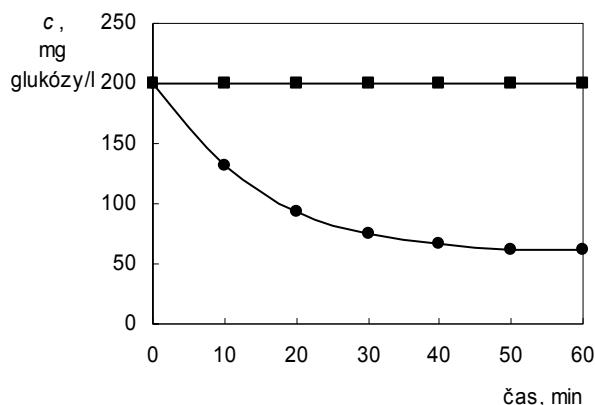
<sup>a</sup> Odpovedajúce obsahu izolovaných buniek

Pri imobilizácii *Arabidopsis thaliana* glutaraldehydom sa v porovnaní s bunkami suspenzných kultúr pozorovali niektoré menšie zmeny – mierna plazmolýza a zhlukovanie buniek. U buniek imobilizovaných glutaraldehydom sa pri testovaní s 2,3,5-trifenyltetrazoliumchloridom (TTC), fluoresceindiacetátom a meraní spotreby kyslíka nezaznamenala životaschopnosť (obr. 1).

Permeabilizácia buniek *Arabidopsis thaliana* Tweenom 20, Tweenom 80, etanolom, hexadecyltrimetylamoniumbromidom a hexadecylpyridiniumchloridom vedie k preukaznému poklesu proteínov a miernejšiemu poklesu aktivity enzýmu. Špecifická aktivita študovaného enzýmu sa okrem aplikácie etanolu mierne zvyšuje (tab. II).

Srinivasan a spol.<sup>22</sup> zistili, že po permeabilizácii bunkovej steny kvasiniek dochádza k preukaznému zvýšeniu aktivity fenylnalanínamoniumlyázy (PAL). Pri permeabilizácii bunkovej steny suspenzných kultúr rastlinných buniek sa také významné zvýšenie enzymovej aktivity nepozorovalo.

Enzymová hydrolýza substrátu *p*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranozidu ( $\beta$ PNG) je v priebehu 3,5 h lineárna,



Obr. 1. Časový priebeh využitia glukózy v bunkách *Arabidopsis thaliana* imobilizovaných glutaraldehydom a v bunkách suspenznej kultúry (10 g buniek, 20 ml tlmivého roztoku s glukózou); ■ glutaraldehyd, ● suspenzná kultúra

Tabuľka II

Obsah bielkovín a aktivita laktázy v 10-dňových bunkách *Arabidopsis thaliana* a v bunkách suspenznej kultúry permeabilizovanej 5% Tweenom 20, 5% Tweenom 80, 30% etanolom, 50% etanolom, 0,1% hexadecyltrimetylamóniumbromidom (HTAB), 0,1% hexadecylpyridíniumchloridom (HPCH) v bunkách imobilizovaných glutaraldehydom

Bunky		Proteíny [mg g <sup>-1</sup> sušiny]	Aktivita [pkat g <sup>-1</sup> sušiny]	Špecifická aktivita [pkat mg <sup>-1</sup> proteínov]
Suspenszia		14,40 ± 0,1	3,70 ± 0,01	0,26
Permeabilizované	0,1%HTAB	6,80 ± 0,14	4,05 ± 0,03	0,59
	0,1%HPCH	6,80 ± 0,07	4,05 ± 0,05	0,59
	5% Tween 20	6,80 ± 0,14	4,03 ± 0,03	0,59
	5% Tween 80	6,80 ± 0,18	4,03 ± 0,04	0,59
	30% etanol	6,80 ± 0,18	3,62 ± 0,02	0,53
	50% etanol	6,80 ± 0,18	3,61 ± 0,01	0,53
Imobilizované	0,1%HTAB	6,80 ± 0,18	3,51 ± 0,02	0,52
	0,1%HPCH	6,70 ± 0,07	3,51 ± 0,02	0,52
	5% Tween 20	6,70 ± 0,14	3,52 ± 0,01	0,52
	5% Tween 80	6,70 ± 0,07	3,50 ± 0,01	0,52
	30% etanol	6,70 ± 0,14	3,31 ± 0,01	0,49
	50% etanol	6,70 ± 0,07	3,30 ± 0,01	0,49

dosiahne 60–70% konverzie substrátu a potom sa prakticky zastaví. Výsledky nášho štúdia ukázali, že hodnota optimálneho pH laktázy v kultivačnom médiu a v imobilizovaných bunkách je 4,7. Tepelné optimum študovaného enzýmu imobilizovaných buniek je pri 60 °C a suspenznej kultúry pri 56 °C. Podobné vlastnosti má aj invertáza buniek medovky<sup>23</sup>.

Porovnanie distribúcie intra- a extracelulárnej laktázy poukazuje na to, že prevažná časť enzýmu (tab. I) sa na rozdiel od invertázy a aminopeptidázy nachádza v kultivačnom médiu<sup>23,24</sup>. Špecifická aktivita extracelulárnej laktázy je 4,15 vyššia než intracelulárnej laktázy.

Sacharóza je pravdepodobne najčastejším zdrojom uhlika a energie pri kultivácii pletivových a suspenzných kultúr<sup>14,26</sup>.

Ako už bolo uvedené, laktáza katalyzuje enzýmovú hydrolyzu laktózy na glukózu a galaktózu. Popri laktáze sa v rastlinách nachádza aj melibiáza a invertáza<sup>23</sup>, a preto sme v predloženej práci sledovali vplyv glukózy, fruktózy, melibiózy, rafinózy, stachyózy a sacharózy na aktivitu laktázy v nativných a imobilizovaných bunkách *Arabidopsis thaliana*. Výsledky testov ukázali, že sacharóza a fruktóza aktivitu študovaného enzýmu neovplyvňuje, kým glukóza a stachyóza mierne inhibuje. Miera inhibície galaktózidázy galaktózou, melibiózou a rafinózou je funkciou jej koncentrácie (tab. III).

Hamilton a spol.<sup>25</sup> zistili, že pri využití sacharózy rastlinnými pletivovými kultúrami sa sacharóza najskôr enzýmovo transformuje na glukózu a fruktózu. Obsah oboch sacharidov v kultivačnom médiu je v prvých dňoch inokulácie približne rovnaký. V prítomnosti glukózy bunky fruktózu nevyužívajú.

Inhibičný účinok 2-sulfanyletanolu 0,1–0,5 mmol l<sup>-1</sup> možno odstrániť pridaním 5–10 mmol l<sup>-1</sup> ditiotritolu, čo

poukazuje na to, že –SH skupiny sú pre enzýmovú reakciu nepostrádateľné<sup>27</sup>.

Bunky imobilizované glutaraldehydom uchovávané v 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl v prítomnosti konzervačných látok (chloramfenikol, chlortetracyklíniumchlorid, (1-metyldodecyl)dimetylamín *N*-oxid<sup>28</sup> a azid sodný si v priebehu 6 mesiacov uchovávajú pomerne vysokú enzýmovú aktivitu (tab. IV). Mierne zvýšenie aktivity v priebehu uchovávaní spôsobuje pravdepodobne disociácia inhibítora, ktorý sa na enzým naviazal v priebehu imobilizácie.

Imobilizované bunky možno po vysušení pri laboratornej teplote uchovávať aj v uzavretých nádobách pri 4 °C, resp. 20 °C. Dehydratované imobilizované bunky sa nechajú pred použitím nabobtnať vo fyziologickom alebo tlmivom roztoku 10–30 min. Aktivita takto stabilizovaného biokatalyzátora (enzýmu) sa periodicky testovala (každé 2 týždne) v priebehu 6 mesiacov. Po 2 týždňoch bola zostatková aktivita 92%, po 1 mesiaci 74 % a po 2 mesiacoch 52 %. V nasledujúcom období (4.– 6. mesiac) sa nepozorovali výrazné zmeny aktivity sledovaného enzýmu. Po 6 mesiacoch sa zistila 46% zostatková aktivita. Je všeobecne známe, že imobilizované bunky majú v porovnaní so suspenznými kultúrami tieto výhody: zabezpečenie nepretržitého prietoku, zlepšenie separácie biokatalyzátora, predĺženie polčasu biokatalyzátora, fyzikálnu ochranu voči strižným silám, ochranu pred zhukovaním, stimuláciu produkcie sekundárnych metabolitov, konzerváciu multifunkčného systému<sup>6–9,21</sup>.

V bunkách imobilizovaných zosieťovaním glutaraldehydom je aktivita sacharázy, tyrozindekarboxylázy, DOPA dekarboxylázy a laktázy v porovnaní s aminopeptidázami pomerne vysoká<sup>11,24,28</sup>.

Kravske mlieko obsahuje 4,8 % vo vode nedostatočne rozpustného mliečného cukru – laktózy. Konzumácia väč-

Tabuľka III

Vplyv vybraných cukorných efektorov na aktivitu laktázy v imobilizovaných bunkách a v bunkách suspenznej kultúry *Arabidopsis thaliana*

Efektor	Koncentrácia [mmol l <sup>-1</sup> ]	% pôvodnej aktivity <sup>a</sup>	
		A	B
Galaktóza	100	9	15
	50	13	24
	10	26	30
	5	51	57
	1	84	87
	0,1	97	98
Melibióza	100	77	78
	50	82	83
	20	87	88
	10	92	94
Rafinóza	100	91	93
	50	95	96
	20	98	99
Stachyóza	100	94	95
	50	96	97
	20	99	99
Glukóza	100	84	95
	50	90	97
	20	95	99
Fruktóza	100	100	100
	50	100	100
	20	100	100
Sacharóza	100	100	100
	50	100	100
	20	100	100

<sup>a</sup> A – imobilizované bunky, B – bunky suspenznej kultúry

šieho množstva laktózy sa môže prejavovať laxatívnym účinkom, ktorý sa v niektorých prípadoch upravuje medikamentózne. Príprava mlieka so zníženým obsahom laktózy má z uvedeného dôvodu veľký praktický význam. Vedľajším produktom výroby syrov je srvátka s vysokým obsahom laktózy. Jej využitie je pre spomínané vlastnosti limitované<sup>1,29</sup>.

Výsledky práce Wena a spol.<sup>30</sup> poukazujú na dôležitú úlohu enzýmov pri výžive rastlín, úrodnosti pôdy, bioremediácii a rezistencii rastových vrcholov koreňov voči patogénom. Rozsiahle laboratorné experimenty nasvedčujú, že k sekrécii laktózy, bunkami rastových vrcholov a koreňových vláskov, podnecuje predovšetkým edafón. Objasnenie mechanizmu tejto reakcie si vyžaduje ďalšie štúdiu.

Biotransformácie sú nielen dôkazom alternatívneho a účinného riešenia syntézy početných biologicky účin-

ných látok, ale sú súčasne zárukou environmentálne nezávadných technológií, čím prispievajú k ochrane životného prostredia<sup>6,9</sup>.

Vzhľadom na už spomenuté vlastnosti laktózy v súvislosti s mliekom<sup>29</sup>, ako aj význam laktázy pri výžive a raste rastlín, delení buniek a štúdiu jednotlivých zložiek bunkovej steny kontinuálne modifikovaných v priebehu rastu a diferenciacie<sup>12,31–33</sup>, predpokladáme, že imobilizovaná laktáza spolu s inými glykozidázami rastlinného pôvodu nájde uplatnenie pri biotransformácii látok dôležitých pre farmaceutický a potravinársky priemysel. Nové zdroje laktázy sa môžu využiť pri biotransformácii laktózy a derivátov galaktozyl-polyolov (galaktooligosacharidov), ktoré majú široké uplatnenie vo farmácii<sup>12,31,34</sup>.

Štúdium štruktúry početných biologicky aktívnych látok a aplikácia testovaného enzýmu, ako aj iných biokatalyzátorov je ďalšou možnosťou ich uplatnenia<sup>34–43</sup>.



Tabuľka IV

Stabilita laktázy v imobilizovaných bunkách *Arabidopsis thaliana* v priebehu skladovania

Konzervačná látka	Pôvodná aktivita [%] <sup>c</sup>				
	0 mesiacov	1 mesiac	2 mesiace	3 mesiace	6 mesiacov
—	100	—	—	—	—
CLCTC (50 mg l <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	65	67	70	78	89
ATDNO (100 mg l <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	64	65	69	79	90
Chloramfenikol (50 mg l <sup>-1</sup> )	64	65	69	79	91
Azid sodný (200 mg l <sup>-1</sup> )	64	65	70	78	91
Zamrznuté v 0,15 mol l <sup>-1</sup> NaCl	65	66	70	80	93

<sup>a</sup> CLCTC – chlortetracyklíniumchlorid, <sup>b</sup> ATDNO – (1-metyldodecyl)dimetylamín *N*-oxid, <sup>c</sup> pôvodná aktivita = enzýmová aktivita (100 %) v bunkách suspenznej kultúry pred imobilizáciou

Na základe uvedených skutočností možno konštatovať, že dostupnosť jednoduchej a rýchlej skríningovej metódy detekcie laktázy má veľký význam ako pre vedecko-výskumné, tak aj technologické účely.

## Záver

V práci sa študovala vhodnosť aplikácie glutaraldehydu pri imobilizácii buniek suspenzných kultúr *Arabidopsis thaliana*. Výsledky experimentov ukázali, že bunky *Arabidopsis thaliana* po permeabilizácii Tweenom 20, Tweenom 80, etanolom, hexadecylpyridiniumchloridom možno pri zachovaní pomerne vysokej aktivity laktázy imobilizovať glutaraldehydom. Takto imobilizované bunky je vhodné uchovávať v roztoku 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl v prítomnosti konzervačných látok (chloranfenikol, chlortetracyklíniumchlorid, (1-metyldodecyl)dimetylamín *N*-oxid a azid sodný alebo ich vysušiť a takto uchovávať. Prevažná časť testovaného enzýmu 61,2 % sa nachádza v kultivačnom médiu (extracelulárna forma), kým intracelulárna forma je minoritná 38,8 %.

Pomocou histochemických testov sa potvrdila sekrécia laktázy kalusom a bunkami suspenzných kultúr resp. ako aj koreňovými vláskami a rastovými vrcholmi koreňa kľúčnych rastlín na svoj povrch.

Využitie laktázy v potravinárstve a vo farmácii ako aj pri štúdiu jej úlohy pri výžive rastlín, bioremediácii a rezistencii rastových vrcholov voči parazitom si vyžaduje vyhľadávanie vhodných zdrojov študovaného enzýmu. Dostupnosť jednoduchej a rýchlej skríningovej metódy laktázy je pre toto štúdium nepostrádateľná.

*Práca bola vypracovaná v rámci riešenia grantového projektu VEGA 1/0182/09. Za odbornú a technickú spoluprácu touto cestou ďakujeme doc. Dr. S. Königovi a pani I. Bayreuthovej z Ústavu biochémie a biotechnológie, Univerzity Martina Luthera v Halle.*

## LITERATÚRA

1. Szczodrac J.: Acta Biotechnol. 19, 235 (1999).
2. Siekel P., Mičieta K.: Biológia (Bratislava) 53, 791 (1998).
3. Timko J., Siekel P., Turňa J., Ferenčík I., Glasa M., Kuchta T., Kúdela O., Lacinová L., Valková D.: Geneticky modifikované organizmy. Veda, Bratislava 2004.
4. Pereira R. A., Batista J. A. N., Da Silva M. C. M., Neto O. B. O., Figuiera E. L. Z., Jiméz A. V., Grosside-Sa M. F.: Phytochemistry 67, 2009 (2006).
5. Romero-Gómez S., Augur C., Viniestra-González G.: Biotechnol. Lett. 22, 1255 (2000).
6. Trelles J. A., Bentancor L., Schoijet A., Porro S., Lewkowicz E. S., Sinisterra J., Iribarren A. M.: Chem. Biodiversity 1, 280 (2004).
7. Brodelius P., Deus B., Moesbach K., Zenk M. H.: FEBS Lett. 103, 93 (1979).
8. Jirků V., Macek T., Vaněk T., Krumphanzl V., Kubánek V.: Biotechnol. Lett. 3, 447 (1981).
9. Gill I., Ballesteros A.: Trends Biotechnol. 18, 282 (2000).
10. Wu K. Y. A., Wisecarver K. D.: Biotechnol. Bioeng. 39, 221 (1992).
11. Stano J., Nemeč P., Weissová K., Kovács P., Kákoniová D., Lišková D.: Phytochemistry 38, 859 (1995).
12. O'Connells, Walsh G.: Appl. Biochem. Biotechnol. 141, 1 (2007).
13. Linsmeyer, E.M., Skoog, F.: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18, 100 (1965).
14. Viehweger K., Dordschbal B., Roos W.: Plant Cell 14, 1509 (2002).
15. Trinder P.: J. Clin. Pathol. 22, 158 (1969).
16. Dixon R. A.: Plant Cell Culture. A Practical Approach. IRL Press, Oxford 1991.
17. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T. H.: Enzyme Histochemistry. A Laboratory Manual. Springer, Berlin 1979.

18. Stoward P. J., Pearse A. G. E.: *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Vol. 3. Churchill Livingstone, Edinburgh 1991.
19. Kim W. D., Kobayashi O., Kaneko S., Sakakibara Y., Park G. G., Kusakabe I., Tanaka H., Kobayashi H.: *Phytochemistry* 55, (2002).
20. Dumas T. B., Bayse D. D., Carter R. J., Peters T., Schaffer R.: *Clin. Chem.* 27, 1642 (1981).
21. Bálež V., Gemeiner P., Kuniak E., Rexová-Benková E., Vojtíšek V., Zemek J.: *Enzymové inžinierstvo*, Alfa, Bratislava 1987.
22. Srinivansan-Nagajyothi A. R., Gowda L. R., Bhat S. G.: *Biotech. Tech.* 8, 729 (1994).
23. Stano J., Diettrich B., Mičieta K., Blanáriková V., Koreňová M.: *Chem. Listy* 102, 815 (2008).
24. Stano J., Mičieta K., Koreňová M., Blanáriková V.: *Chem. Listy* 101, 65 (2007).
25. Hamilton R., Pedersen H., Chin C. K.: *Biotechnol. Bioeng.* 14, 383 (1984).
26. Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
27. Machová B.: *Diplomová práca*. Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava 1994.
28. Devinsky D., Lacko I., Nagy A., Krasnec L.: *Chem. Pap.* 32, 106 (1978).
29. Rogalski J., Lobarzewski J.: *Acta Biotechnol.* 15, 211 (1995).
30. Wen F., Celay R., Price I., Eboho J. J., Hawes M. C.: *Plant Soil* 304, 133 (2008).
31. Klewicki R.: *Eng. Life Sci.* 7, 268 (2007).
32. Ali M. S., Jahangir M., Hussan S. S., Choudhary M. I.: *Phytochemistry* 60, 295 (2002).
33. Saura-Walls M., Fauré R., Brumer H., Teeri T. T., Cottaz S., Driguez H., Planas A.: *J. Biol. Chem.* 283, 21853 (2008).
34. Hemavathi A. B., Hebbar H. V., Raghavarao K. S. M. S.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, 522 (2008).
35. El Ashry E. H. S., Rashed N., Shobier A. S. H.: *Pharmazie* 55, 251 (2000).
36. Gantulga D., Turan Y., Bevan D. R., Esen A.: *Phytochemistry* 69, 1161 (2008).
37. Shimoda K., Hamada H., Hamada H.: *Phytochemistry* 69, 1135 (2008).
38. Zhang L., Liao Ch. Ch., Huang H. Ch., Shen Y. Ch., Yang L. M., Kuo Y. H.: *Phytochemistry* 69, 1398 (2008).
39. Hitagawa H., Tsutsumi K., Ikegami-Kuzuhara A., Nadanaka S., Goto F., Ogawa T., Sugahara K.: *J. Biol. Chem.* 283, 27 438 (2008).
40. Barth A., Siekel P., Sedlářová E., Valent A., Tokhtaeva E.: *Acta Histochem.* 107, 253 (2005).
41. Bilka F., Balážová A., Bilková A., Šubr Z., Pšenák M.: *Biol. Plantarum* 47, 111 (2003).
42. Shimoda K., Ishimoto H., Kamiue T., Kobayashi T., Hamada H., Hamada H.: *Phytochemistry* 70, 207 (2009).
43. Bilková A., Balážová A., Obložinský M., Bilka F.: *Farm. Obzor* 75, 152 (2006).

**J. Stano<sup>a</sup>, K. Neubert<sup>c</sup>, W. Roos<sup>d</sup>, K. Mičieta<sup>e</sup>, M. Koreňová<sup>a</sup>, and V. Blanáriková<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> Botanic Gardens, <sup>b</sup> Department of Molecular and Subcellular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovakia, <sup>c</sup> Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin Luther University, Halle/Saale, Germany, <sup>d</sup> Department of Molecular Biology, Institute of Pharmaceutical Biology and Pharmacology, Martin Luther University, Halle/Saale, Germany, <sup>e</sup> Department of Botany, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovakia): **Study of Immobilized and Extracellular Lactase in Mouse-ear Cress**

Cells in suspension culture of mouse-ear cress (*Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh. cultivar, Columbia were permeabilized with Tween 20, Tween 80, ethanol, and hexadecyltrimethylammonium bromide or hexadecylpyridinium chloride, and immobilized using glutaraldehyde. Lactase showed a pH optimum at 4.7 and the optimal temperatures for immobilized cells and cell cultures was 60 °C and 56 °C, respectively. Four-hour enzyme hydrolysis of the tested substrate proceeded with a conversion of 60–70 %. The immobilized cells showed a high lactase activity, fair stability in long-term storage and convenient physicochemical properties. The culture medium after removing cells was used for identification and determination of enzyme activity. The extracellular activity of lactase estimated in cell suspension accounts for 61 % of the total activity, the rest being due to the intracellular activity. The specific extracellular activity is 4.15 times higher than the intracellular one. Using a histochemical method, secretion of lactase by root tips, root hairs, callus and suspension cells was detected. The described method permits a rapid, simple and specific identification of lactase.

## VÝVOJ ANALYTICKEJ METÓDY PRE STANOVENIE HLAVNÝCH PRVKOV METÓDOU ED XRF SPEKTROMETRIE

VIERA VOJTEKOVÁ<sup>a</sup>, AUGUSTÍN MAJCHRÁK<sup>b</sup>, DANIELA MACKOVÝCH<sup>b</sup> a JANA BLÁŠKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univerzita P. J. Šafárika, Ústav chemických vied, Katedra analytickej chémie, Moyzesova 11, 041 67 Košice,

<sup>b</sup> Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Geoanalytické laboratóriá, Markušovská cesta 1, 052 40 Spišská Nová Ves, Slovensko

vojtekv@kosice.upjs.sk

Došlo 3.8.09, prepracované 26.1.10, prijaté 18.2.10.

Kľúčové slová: validácia, prvková analýza, CRM, XRF spektrometria, životné prostredie, pôdy, sedimenty, horniny

### Úvod

Analýza metódou röntgenfluorescenčnej (XRF) a energiodisperznej röntgenfluorescenčnej (ED XRF) spektrometrie má významné postavenie v elementárnej analýze tuhých a kvapalných vzoriek so zložitými maticami. Patrí k nedeštruktívnym metódam a využíva sa v geochemických a environmentálnych laboratóriách pri analýze celkových obsahov i v analýze špeciálnej<sup>1,2</sup>. Prináša rýchlu, presnú a správnu informáciu o prvkovom zložení a vzhľadom na to môže nahrádzať, alebo byť referenčná k metódam, ktoré sú spojené s kyselinovými (sintračnými) rozkladmi<sup>3-6</sup> a ktoré pri zložitých prvkových maticiaciach vždy nezaručujú prijateľnú analytickú výťažnosť<sup>7,8</sup>. Táto práca prezentuje vývoj a validáciu metódy kvantitatívneho stanovenia hlavných prvkov v prírodných vzorkách metódou ED XRF s úpravou tuhých vzoriek tavením so zmesou tetraboritanu a metaboritanu lítneho do tvaru sklenených perál. Je validované stanovenie nasledujúcich prvkov: Si, Al, Fe, Mn, Ca, Mg, Na, K, Ti, a P.

### Experimentálna časť

#### Úprava vzoriek

Geochemické vzorky, sedimenty, pôdy, prašné spady, atď., sa po vysušení pri laboratórnej teplote ručne rozdružili v porcelánovej miske a potom sa upravil podsitný podiel vzorky v planetárnych (vibračných) mlynch na zrnitosť menšiu ako 0,09 mm. U sedimentov sa upravovala frakcia so zrnitosťou menšou ako 0,125 mm, u pôd, frakcia pod 2 mm. Geologické vzorky vyžadujú trojstupňovú prípravu: drvenie, mletie a jemnú úpravu na zrnitosť pod

0,09 mm. Úprava zrnitosti vzorky je pri XRF spektrometrii veľmi dôležitá, lebo úmerne so znižujúcou sa zrnitosťou, stúpa intenzita meraného signálu a zlepšuje sa reprodukovateľnosť stanovenia. Pre prípravu pevných vzoriek pre XRF bolo zvolené tavenie boritanových perál, ktoré eliminuje vplyvy mineralogické, kryštalografické, zrnitostné a vplyvy chemických väzieb a zaisťuje dobrú reprodukovateľnosť stanovení. Používa sa pre hlavné maticové prvky. Pri príprave je dôležitý výber taviaceho téglika, tavidla, jeho množstva a optimalizácia taviaceho procesu (rôzne povrchové napätie, viskozita, teplota taveniny atď.). Veľkosť perly závisí od typu automatického podávača spektrometra (32–40 mm). Perly boli pripravené tavením 0,5 g vzorky a 7 g zmesi tetraboritanu a metaboritanu lítneho (66:34 hm. %) s prídavkom pár kryštálikov jódu pred koncom tavy (zníženie zmáčanlivosti taveniny), v indukčnej peci s postupným zvyšovaním teploty na 1200 °C (čas 3 až 4 min). Perla sa z téglika vyklopila po vychladnutí taveniny na vzduchu. Boli použité tégliky zo zliatiny platiny a zlata v hmotnostnom pomere (95:5).

#### Experimentálne podmienky

Experimentálne podmienky boli optimalizované na ED XRF spektrometri SPECTRO X-LAB 2000, firmy Spectro, Nemecko, (rozsah prvkov: Na (11) – U (92); RTG lampa – Rh s Be okienkom, výkon lampy  $P_{\max} = 300$  W; RTG generátor:  $U = 1-60$  kV,  $I = 1-80$  mA,  $P_{\max} = 3,5$  kW; detektor polovodičový Si(Li), chladený  $N_2(l)$ , rozlíšiteľnosť 150 eV na čiari  $K_{\alpha}Mn$ ; rozptylové terčíky Al, HOPG kryštál; výveva o kapacite  $5$  m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>). Ďalšie experimentálne podmienky sú uvedené v tab. I.

#### Validácia – testované parametre

Bolo validované stanovenie hlavných prvkov, s prípravou vzoriek metódou tavených perál pre nasledujúce matrice:

Tabuľka I

Experimentálne podmienky merania (pre tavené perly)<sup>a</sup>

Prvok	Terčík
Si	HOPG
Al	HOPG
Fe	HOPG
Ti	HOPG
Ca	HOPG
Mg	Al
Mn	HOPG
P	HOPG
Na	Al
K	HOPG

<sup>a</sup> Čiara  $K_{\alpha}$ , napätie/prúd 14,5 kV/ 12mA, merací čas 300 s

riečne a jazerné sedimenty, pôdy, silikáty, vápence, magnezity, ílové minerály. Štúdia obsahuje nasledovné validačné charakteristiky:

1. *Štúdium presnosti* (opakovateľnosť). Presnosť je tu vyjadrená blízkosťou opakovaných stanovení jednej vzorky, opakovateľnosti, ktorá je vyjadrená smerodajnou odchýlkou ( $s$ ) a relatívnou smerodajnou odchýlkou (RSD) opakovaných meraní<sup>9–11</sup>.

2. *Štúdium správnosti* (výťažnosť). Realizovaná periodickým zaradovaním RM do analytického postupu. Správnosť metódy je tu definovaná ako blízkosť zhody stanoveného a certifikovaného obsahu prvku v RM; je vyjadrená výťažnosťou<sup>9–11</sup>.

3. *Pre určenie medzi detekcie (LOD) a stanovenia (LOQ)* bolo použité „ $3\sigma$  kritérium“, ktorým je určená medza detekcie analytu ako trojnásobok smerodajnej odchýlky šumového signálu (LOD). Medza stanovenia bola vypočítaná ako 10násobok smerodajnej odchýlky šumového signálu (LOQ)<sup>10,11</sup>.

4. *Dlhodobá stabilita* analytického systému bola skontrolovaná pomocou regulačných diagramov (RD), čiže formou časovej závislosti, s opakovaným meraním obsahu prvku v CRM a vyhodnotením a celkovej odchýlky stanovenia od certifikovaných hodnôt za hodnotené časové obdobie. Požiadavky na priebeh RD za sú nasledovné: 1. obsah analytu v CRM zaradovaného do prevádzkových meraní nesmie prekračovať hodnotu  $3s$  – hornú a dolnú regulačnú medzu; 2. počet bodov v RD nad a pod centrálnou líniou (CL), má byť rovnaký. CL je čiara, označujúca hodnotu certifikovaného obsahu prvku<sup>10,11</sup>.

5. *Kalibrácia a kalibračný rozsah metódy*

Správnosť bola overená dvoma spôsobmi: analýzou viacerých CRM a určením odchýlky presnosti a správnosti, ktorá je uvedená vyššie, a účasťou v medzilaboratórnom teste, kde sa výsledky hodnotia pomocou tzv. z-skóre (dvojrozmerný štatistický parameter), ktorý možno vypočítať podľa vzťahu (1):

$$z = \frac{\bar{x} - \mu}{s} \quad (1)$$

kde  $z$  – hodnotiaci parameter;  $\bar{x}$  – priemer stanovených obsahov;  $\mu$  – prijatá referenčná hodnota;  $s$  – cieľová smerodajná odchýlka – je daná koeficientom spôsobilosti ( $k_s$ ) a prijatou referenčnou hodnotou t.j.:  $s = 0,5 \cdot k_s \cdot \mu$ . Cieľová smerodajná odchýlka a koeficient spôsobilosti – kritériá posudzovania výsledkov vo vzťahu k prijatej referenčnej hodnote v medzilaboratórnom teste.

Interval z-skóre je pre uspokojivé výsledky určený rozmedzím  $\langle -2; +2 \rangle$ . Odchýlky (presnosti a správnosti) sú príspevkami k celkovej kombinovanej štandardnej neistote merania. Pre jej odhad bol použitý model nezávislých premenných, ktorý zahŕňa súčet jednotlivých príspevkov neistoty<sup>9,12,13</sup>. Kombinovaná štandardná neistota  $u_c$  je potom daná ako:

$$u_c(x(p, q, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots} \quad (2)$$

$u(p)$ ,  $u(q)$  – jednotlivé príspevky neistoty a rozšírená štandardná neistota  $U_R$  je daná ako:

$$U_R(x(p, q, \dots)) = k \cdot \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots} \quad (3)$$

$k$  – koeficient rozšírenia; pre 95% pravdepodobnosť výsledku v uvádzanom „neistotom“ intervale, je  $k = 2$ . Rozšírené neistoty stanovení v jednotlivých koncentračných rozsahoch sú v tejto práci tiež udávané s  $k = 2$ .

## Výsledky a diskusia

Validácia bola realizovaná v súlade s metodickými pokynmi pre validáciu<sup>10</sup>. Na overovanie charakteristík a kalibráciu boli použité certifikované (CRM), laboratórne (LRM) a rezortné RM. Validáčnne charakteristiky – LOD, LOQ, presnosť, správnosť, dlhodobá stabilita a validovaný kalibračný rozsah boli určené nasledovne.

Presnosť, vyjadrená ako RSD pri ED XRF spektrometrickej analýze hlavných prvkov vo väčšine prípadov nepresahovala hodnotu 5 %. Výnimkou bol len nižší kalibračný rozsah pre  $P_2O_5$ , v koncentračnom intervale od 0,02 do 0,10 %, kde bola dosiahnutá presnosť analýzy od 6 do 12 %, vyjadrená ako RSD. Pre výpočet medzi stanovenia, (10násobok smerodajnej odchýlky šumového signálu) boli použité výsledky analýz šiestich RM s obsahmi prvkov blízkymi medzi detekcie. Pri stanoveniach boli dodržané podmienky opakovateľnosti<sup>9,10,11</sup>. V tab. II sú uvedené LOQ pre oxidy validovaných makroprvkov.

Presnosť bola vypočítaná z výsledkov stanovení šiestich. Správnosť bola vyjadrená výťažnosťou. Správnosť môže byť ilustrovaná graficky (pre  $Al_2O_3$  viď obr. 1a). Bola počítaná zo všetkých RM použitých pri validácii metódy a pre jednotlivé prvky je uvedená v tab. III. Okrem správnosti tab. III uvádza aj ostatné charakteristiky pre všetky študované prvky, ktoré reprezentujú validačné charakteristiky stanovené pri vývoji metódy a kalibrácie. Sú súhrnom a výsledkom matematického

Tabuľka II  
Medze stanovenia (LOQ) pre oxidy makroprvkov

Oxidy hlavných prvkov	LOQ [% obsahu]
SiO <sub>2</sub>	0,20
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,10
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,04
CaO	0,03
MgO	0,03
TiO <sub>2</sub>	0,03
MnO	0,03
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,02
Na <sub>2</sub> O	0,02
K <sub>2</sub> O	0,05

Tabuľka III

Presnosť, správnosť, koeficient korelácie kalibračnej priamky ( $R^2$ ) a validovaný kalibračný rozsah pre hlavné prvky

Oxid prvku	Presnosť – opakovateľnosťou RSD [%]	Správnosť – výťažnosťou [%]	Správnosť – smernicou (b); $b \approx 1$	Koeficient korelácie ( $R^2$ )	Validovaný koncentračný rozsah [% obsahu]
SiO <sub>2</sub>	0,2–1,0	98,6–112,2	0,9963	0,9997	0,20–88,89
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2–3,0	97,9–112,5	1,0089	0,9998	0,10–34,90
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,3–2,0	95,8–110,9	1,0330	0,9980	0,04–10,83
CaO	0,3–3,0	93,0–108,2	0,9931	0,9997	0,03–54,59
MgO	0,3–5,0	92,0–104,2	0,9758	0,9999	0,03–44,28
TiO <sub>2</sub>	0,6–2,5	100,8–107,2	1,0435	0,9971	0,03–1,20
MnO	1,5–7,0	95,2–115,0	1,0660	0,9972	0,03–0,52
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6,0–12,0	91,0–109,0	0,9916	0,9916	0,02–0,10
	2,0–5,0	93,5–104,5	0,9916	0,9916	0,10–0,316
Na <sub>2</sub> O	3,0–7,0	97,1–108,7	1,0009	0,9976	0,02–4,65
K <sub>2</sub> O	0,7–3,0	92,0–110,6	0,9953	0,9876	0,05–5,06

Tabuľka IV

Výsledky stanovenia RM a základné validačné charakteristiky pre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

RM	Certifikovaný obsah [% obsahu]	Stanovený obsah [% obsahu]	Presnosť – opakovateľnosťou s [%]	Presnosť – opakovateľnosťou RSD [%]	Správnosť – výťažnosťou [%]
Mokrú	0,5	0,6	0,0144	2,84	112,52
Stupava	1,3	1,3	0,0251	1,95	98,17
GSD 10	2,8	2,7	0,0482	1,73	97,90
ISE 9.7.4.4	6,7	6,8	0,0489	0,72	101,45
GSD 9	10,6	10,6	0,0441	0,42	99,94
ISE 9.7.2.3	10,9	11,0	0,0509	0,46	100,80
NIST 2711	12,3	12,4	0,0571	0,46	100,42
GEOPT 3	13,1	13,2	0,0402	0,30	100,37
TELGART	13,1	13,3	0,0475	0,36	101,59
NIST 2709	14,2	14,3	0,0207	0,15	100,67
GEOPT 1	14,7	14,8	0,0749	0,51	100,69
GEOPT 2	15,1	15,2	0,1111	0,73	100,44
BM	16,3	16,2	0,0602	0,37	99,54
Vonšov	17,4	17,9	0,1067	0,60	102,62
TB	20,6	20,6	0,0732	0,36	99,76
Chebsko	34,9	35,3	0,1569	0,44	101,33

spracovania charakteristík pre každý prvok v celom validovanom kalibračnom rozsahu s použitím potrebného množstva RM. Presnosť opakovateľnosťou a správnosť výťažnosťou sú tu doplnené o parameter „správnosť smernicou priamky“ a koeficient korelácie ( $R^2$ ) kalibračnej závislosti (priamky). Ideálna smernica takejto priamkovej závislosti ( $b = 1$ ) ilustruje 100% výťažnosť študovaných prvkov. Overe-

nie správnosti týmto spôsobom (priamkovými závislosťami so smernicou  $b$ , blízkou 1 ( $b \approx 1$ )), je uvedený v tab. III, v 4. stĺpci a na obr. 1a. Odlišnosti od tejto hodnoty znamenajú nižšie, alebo vyššie výťažnosti. Ako doplňujúca informácia je v tab. III uvádzaný aj koeficient korelácie ( $R^2$ ). Vzhľadom na dostatočný počet bodov v týchto závislostiach je diskusia o koeficiente korelácie možná. Jeho hodnoty sú prijateľné a dostatočne

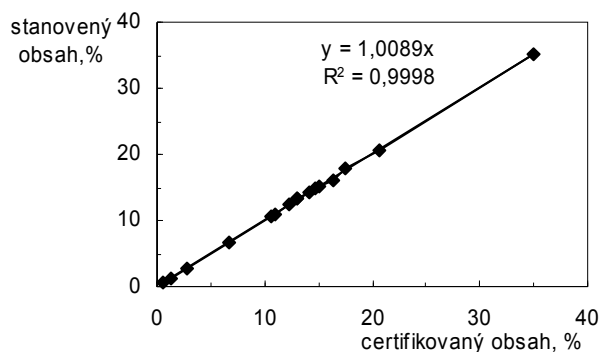
Tabuľka V

Vyhodnotenie výsledkov stanovenia prvkov v pôdach v medzilaboratórnom teste

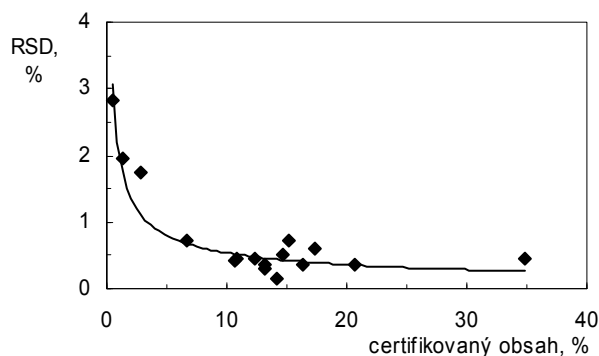
Obsah [%] <sup>a</sup>	Absolútna hodnota parametra z, „z-skóre“ <sup>c</sup>								nevyhodnoten <sup>e</sup>
	z  < 1		1 <  z  < 2		2 <  z  < 3		z  > 3		
	n <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>	n <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>	n <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>	n <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>	n <sup>b</sup>
97,2	54	75	14	19,4	2	2,8	2	2,8	23
97,3	86	82,7	10	9,6	3	2,9	5	4,8	20
97,4	72	73	22	22	1	1	4	4	21
98,1	91	86	13	12,2	1	0,9	1	0,9	22
98,2	88	81,5	12	11,1	1	0,9	7	6,5	24
98,3	87	84,5	9	8,7	2	1,9	5	4,9	30
98,4	77	84	9	10	2	2	4	4	39
99,1	85	82	16	15	1	1	2	2	33
99,2	80	81,6	14	14	2	2	2	2	42
Súčet <sup>d</sup>	720	81,3	119	13,4	15	1,7	32	3,6	252

<sup>a</sup> súčet obsahov makroprvkov v % ; <sup>b</sup> n – počet stanovení; <sup>c</sup> % – percento z počtu vzoriek s príslušným obsahom a so zodpovedajúcou hodnotou z; <sup>d</sup> súčet – súčet všetkých realizovaných stanovení

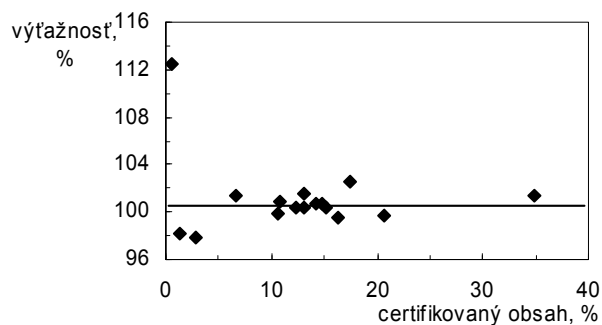
a



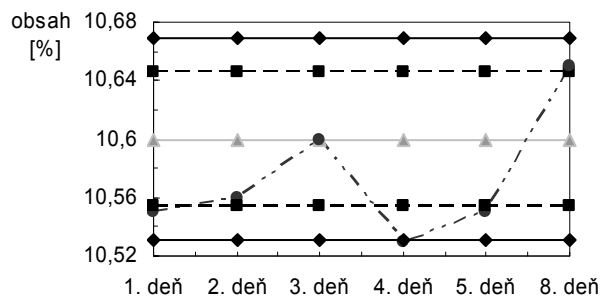
b



c



d



Obr. 1. Grafické znázornenie určených validačných charakteristík a regulačný diagram (RD) pre Al: a) hodnotenie výťažnosti pomocou smernice priamky ( $b \approx 1$ ) pre RM v celom pracovnom rozsahu; b) hodnotenie odchýlky od 100% výťažnosti pre RM v celom pracovnom rozsahu; c) hodnotenie RSD stanovenia pre RM v celom pracovnom rozsahu; d) príklad vedenia RD v časovom rozsahu 1 pracovného týždňa pre CRM – GSD 9

Tabuľka VI

Vyhodnotenie dlhodobej stability merania pre železo a titán v CRM „Bufalo river sediment“

Prvok	Certifikovaný obsah $\pm U^a$ [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	Nameraný obsah [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	Smerodajná odchýlka $-s$ [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	RSD [%]
Fe	41 100 $\pm$ 1000	40 977	367,05	0,9
Ti	4570 $\pm$ 180	4628	74,25	1,6

<sup>a</sup> rozšírená neistota merania

vzdialené ( $R \approx 0,9$ ) od kritickej hodnoty korelačného koeficientu ( $R_{\text{krit}}$ ), ktorá je pre výpočtové podmienky a hladinu významnosti  $\alpha$  rovná  $R_{\text{krit}}=0,482$  ( $\alpha = 0,05$  – zodpovedá pravdepodobnosti 95 %; počet bodov v závislosti  $n = 15$ ).

Charakteristiky potrebné pre spracovanie sú vzorovo uvedené pre  $\text{Al}_2\text{O}_3$  v tab. IV, ktorá obsahuje výsledky stanovenia RM, certifikovaný obsah RM, priemernú hodnotu stanovenia RM, odchýlku presnosti (opakovateľnosťou) a správnosti (výťažnosťou), v koncentračnom rozsahu, ktorý bude validovaný a v ktorom sa budú pohybovať prevádzkovo stanovované vzorky. Smerodajná odchýlka  $s$  a RSD porovnáva nameraný a certifikovaný obsah, výťažnosť má pre obsahy prvkov blízke medzi stanovenia väčší rozptyl hodnôt. Súvisí to s väčšou RSD merania pri nízkych koncentráciách. Príklad grafického znázornenia validačných charakteristík, ktoré môže byť alternatívou k tabuľkovej forme, spolu s RD pre  $\text{Al}_2\text{O}_3$  uvádza obr. 1a–d.

Ďalším spôsobom overenia správnosti je medzilaboratórna štúdia, ktorá bola v rámci validácie realizovaná. Hodnotenia výsledkov pomocou z-skóre je uvedené v tab. V.

Akceptovateľné z-skóre je z intervalu  $<-2;+2>$ . Kvalita výsledkov analýz pôd bola veľmi dobrá: 94,7 % analýz (81,3+13,4) vyhovuje podmienke, že absolútna hodnota  $|z| < 2$  (viď tab. V, posledný riadok stĺpca 3 a 5). Parametrom z-skóre neboli vyhodnotené analýzy len v tom prípade, keď počet výsledkov z jednotlivých laboratórií bol  $< 6$ . Zhodnotených bolo 30 vzoriek pôd, ktoré sú zoradené podľa stúpajúceho obsahu pre makroprvky, stopové obsahy nie sú uvedené (viď tab. V).

Dlhodobá stabilita bola vyhodnotená regulačnými diagramami (obr. 1d) a celkovou odchýlkou stanovenia od certifikovaných hodnôt (tab. VI). Príklad RD pre modelové obdobie 1 týždeň je uvedený na obr. 1d pre  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Pri kontrole dlhodobej stability boli splnené požiadavky na priebeh RD za hodnotené obdobie. Obsah analytu v CRM periodicky zaradzovaného do prevádzkových meraní neprekročil hodnotu  $3s$  (hornú a dolnú regulačnú medzu diagramu) a dlhodobá stabilita bola hodnotená za obdobie 1,5 roka. Jej vyhodnotenie pre prvky Fe a Ti, v CRM „Bufalo river sediment“, uvedené v tab. VI, hovorí, že v priebehu 1,5 roka bola RSD stanovenia menšia ako 2 %.

Validovaný kalibračný rozsah a kalibrácia: základná užívateľská kalibrácia je dodaná výrobcem na základe požiadaviek laboratória. Bolo na ňu použitých 51 CRM s potrebným rozsahom prvkov a obsahov. Zahŕňali rôzne

typy vzoriek (sedimenty, pôdy, silikáty, granity, bazalty, diority, vápence, oxidy prvkov, rudy, uhlie, atď) a pochádzali z uvádzaných zdrojov: United States Geological Survey, USA (USGS); Canadian Certified Reference Materials Project, Canada (CCRMP); Centre Recherches Petrographiques et Géochimiques, France (CRPG); Bureau of Analysed Samples, UK (BAS); Geological Survey of Japan, Japan (GSJ); Institute of Geophysical and Geochemical Exploration, China (IGGE); Zentrales Geologisches Institut, Berlin (ZGI); Bureau Comunitaire de Références, Brussels (BCR); South African Reference Material (SARM). Softvér spektrometra umožňuje rozšíriť základnú kalibráciu pomocou pridaných CRM a LRM, kalibráciu pre ďalšie prvky a vytvorenie úplne novej kalibrácie pre inú vzorkovú maticu. Boli vytvorené nové kalibrácie pre kvantitatívny rozbor hlavných prvkov v prírodných maticiach meraných z tavených perál. Validačné charakteristiky stanovené pri vývoji kalibrácie metódou tavených perál pre makroprvky sú uvedené na obr. 1a–d, v tab. III; IV; V a tab. VI.

Ako kalibračné a overovacie štandardy boli použité: a) medzinárodné CRM: riečne sedimenty (NIST 2704, GSD 9, GSD 10, GSD 12, STSD 2, STSD 4); pôdy (NIST 2709, NIST 2711, GSS 4, RENDZINA 12-2-09); úletové popolčky (ECH, ENO, EOP); uhlie (SARM 18, SARM 20); horniny (Graisen GnA, Granit GM, Bazalt BM, GEOPT 1-5, NIST 70a, NIST 278, NBS 688, SY-4, ZVVC); b) rezortné RM; c) interné (laboratórne) RM (LRM): napr. riečne sedimenty (Voznica, Telgárt, ZŠ atď.); zeolity, pôdy (ISE 921, ISE 982); žula (Ž-1).

## Záver

Bola vypracovaná analytická metóda pre kvantitatívne stanovenie hlavných prvkov v environmentálnych, geochemických a geologických vzorkách. Experimentálne určené charakteristiky zodpovedajú požiadavkám pre validáciu analytického stanovenia metódou ED XRF. Validovaná analytická metóda je prevádzkovo realizovateľná s presnosťou (opakovateľnosť) do 5 % a správnosťou (výťažnosť) v intervale 85–115 % v celom kalibračnom rozsahu. Dosažené medze detekcie pre oxidy kovov sa pohybovali v intervale 0,02–0,20 %, v závislosti od prvku. Pri štúdiu dlhodobej stability merania, RSD nepresiahli hodnotu 2 %. Metóda bola validovaná pre širokú škálu prírodných tuhých materiálov (pôdy,

horniny, riečne a jazerné sedimenty) a externé overenie medzilaboratórnym testom potvrdzuje jej vhodnosť pre analýzu makroprvkov v silikátových materiáloch. Vyhovuje pre potreby environmentálneho a geologického výskumu, prieskumu, monitoringu, a geochemického mapovania. Bola podkladom pre návrh a vypracovanie odvetvovej technickej normy MŽP Slovenskej republiky. Publikovaná práca má poslúžiť ako rámcová informácia a metodická pomôcka pre prevádzkového analytika, pri vývoji a validácii analogických metód.

#### Zoznam použitých skratiek

CL	centrálna línia v regulačnom diagrame
CRM	certifikovaný referenčný materiál
HOPG	grafit (vysoko orientovaný pyrolytický grafit)
ED XRF	energirovodisperzný röntgenfluorescenčný, -é, -á (spektrometria)
LOD	medza detekcie
LOQ	medza stanovenia
LRM	laboratórny referenčný materiál
REC	výťažnosť (recovery)
RD	regulačný diagram
RM	referenčný materiál
RSD	relatívna smerodajná odchýlka
XRF	röntgenfluorescenčný, -é, -á (spektrometria)

#### LITERATÚRA

1. Wegscheider W., Ellis A. T., Goldbach K., Leyden D. E., Mahan K. I.: *Anal. Chim. Acta* 188, 59 (1986).
2. Baranowski R., Rybak A., Sobczyński T.: *Polish J. Environ. Stud.* 10, 297 (2001).
3. Pentiu T., Ponta M., Levei E., Gheorghiu E., Kasler I., Lordos E.A.: *Chem. Pap.* 62, 114 (2008).
4. Arain M. B., Kazi T. G., Jamali M. K., Jalbani N., Afridi H. I., Shah A.: *Chemosphere* 70, 1845 (2008).
5. Šestinová O., Brehuv J., Hančulák J., Špaldon T., Fedorová E.: *Chem. Listy* 102, 465 (2008).
6. Matúš P., Kubová J.: *Chem. Listy* 96, 174 (2002).
7. Vojteková V., Nováková J., Mackových D., Blašková J.: *Chem. Pap.* 62, 160 (2008).
8. Vojteková V., Nováková J., Mackových D.: *Environ. Chem. Lett.* 7, 1 (2008).
9. Ellison S. L. R., Rösslein M., Williams A.: *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements*, 2. vyd. EURACHEM CITAC Guide CG 4, Laboratory of the Government Chemist, London 2000.
10. MSA-L/05, *Validácia kalibračných metód*. SNAS, Bratislava 2002.
11. Suchánek M., Plzák Z., Šubrt P., Koruna I.: *Kvalimetric 7. Validace analytických metod*. Eurachem – ČR, Praha 1998.
12. MSA 0105-97 (EAL-G23): *Vyjadrovanie neistôt pri kvantitatívnych skúškach*. SNAS, Bratislava 1997.
13. MSA 0104-97 (EAL-R2): *Vyjadrovanie neistôt pri kalibrácii*. SNAS, Bratislava 1997.

#### V. Vojteková, A. Majchrák, D. Mackových, and J. Blašková (Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Sciences, P.J. Šafárik University, Košice, Slovakia): Development of an Analytical Method for Determination of Major Elements by Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry

The present work aims to be a methodical tool and frame information for an engineering analyst in pursuing the validation of similar analytical methods. A method was developed for determination of major elements in solid environmental matrices (soils, ores, river and lake sediments). The determination has been carried out using fused lithium tetraborate pearls. The obtained validation characteristics correspond with those required for analytical validation of the method. The present method shows repeatability within 5 % and accuracy 85–115 % in the whole determination range. Detection limits for metal oxides ranged from 0.02 to 0.20 %. The RSDs in a long-term stability study did not exceed 2 %. The validation results and other tests confirm suitability of the ED XRF spectrometry for analysis of major elements in solids of environmental and geological origin and compatibility with the methods used in reference laboratories. The method is practical in terms of sample preparation, costs and time saving.



## POROVNÁNÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ ERGOSTEROLU A JEJICH VYUŽITÍ PŘI ANALÝZE PŮDY PODHORSKÉ PASTVINY

JIŘÍ JIROU<sup>a,b</sup>, JAN TRÍSKA<sup>c</sup>, KAMILA RŮŽIČKOVÁ<sup>c</sup>, NADĚŽDA VRCHOTOVÁ<sup>c</sup>, MILOSLAV ŠIMEK<sup>a,b</sup> a DANA ELHOTTOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav půdní biologie, Biologické centrum AV ČR, v. v. i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, <sup>b</sup> Katedra biologie ekosystémů, řírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, <sup>c</sup> Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR, v. v. i., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, jirout.jiri@email.cz, triska@usbe.cas.cz, ruzickova@usbe.cas.cz, nada@usbe.cas.cz, misim@upb.cas.cz, danael@upb.cas.cz

Došlo 8.6.09, přepracováno 25.1.10, přijato 18.2.10.

Klíčová slova: ergosterol, GC-MS-MS, HPLC, GC-FID, biomasa hub, půda, skot

### Úvod

Současné znalosti o mikrobiálních společenstvech v půdě naznačují, že z celkového množství mikroorganismů v přírodních vzorcích je obvykle možné kultivovat méně než 1 % všech mikroorganismů<sup>1</sup>. Pro detekci a identifikaci všech mikroorganismů, včetně nekultivovatelných, byly vyvinuty metody založené na detekci buněčných markerů, z nichž některé jsou specifické pro určité skupiny mikroorganismů<sup>2</sup>. Ergosterol se považuje za jeden z vhodných markerů biomasy živých saprotrofních hub<sup>3</sup>, protože je hlavním strukturním steroidem fosfolipidické dvojvrstvy houbové buněčné stěny<sup>4–7</sup>. Stanovení ergosterolu jako buněčného markeru pro určení biomasy hub bylo přijato jako spolehlivá, robustní a relativně levná metoda sledování biomasy hub v půdních ekosystémech<sup>8–13</sup>.

Ergosterol, stejně jako další lipidické látky, je snadno extrahovatelný z přírodních vzorků pomocí nepolárních organických rozpouštědel<sup>14</sup>. Koncentrace ergosterolu se dosud nejčastěji stanovovala metodou HPLC<sup>9</sup>. Během HPLC mohou ale společně s ergosterolem koeluovat i další látky, které znesnadňují vlastní stanovení ergosterolu<sup>10,15,16</sup>. Nověji zavedené metody GC-MS analýzy řeší tyto problémy díky vysoké účinnosti separace zkoumaných látek moderními kapilárními kolonami a nabízejí tak lepší selektivitu při detekci biomarkerů v přírodních materiálech a vzorcích<sup>14</sup>.

Cílem práce bylo nalézt citlivou metodu pro stanovení ergosterolu a tuto metodu porovnat v rámci metod používaných v mikrobiální ekologii – GC-FID, GC-MS-MS, HPLC a vyvinutou metodu následně použít pro stanovení biomasy hub v půdních vzorcích podhorské pastviny ovlivněné skotem.

### Materiál a metody

#### Použité chemikálie a přístroje

Zásobní roztok ergosterolu (Sigma-Aldrich, Praha) o koncentraci 500 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  byl připraven vždy těsně před analýzami navážením a rozpuštěním v *n*-hexanu, případně v methanolu. Oba typy standardu byly naředěny příslušným rozpouštědlem pro získání kalibrační křivky v rozsahu 1 až 200 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ . Roztok nederivatizovaného ergosterolu o koncentraci 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  v *n*-hexanu byl použit jako vnější standard pro GC-FID a GC-MS-MS měření, zatímco roztok ergosterolu o koncentraci 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  v methanolu byl použit jako vnější standard pro HPLC analýzu. Použitá rozpouštědla měla stupeň kvality LiChrosolv<sup>®</sup> a čistotu  $\geq 99,8$  % (methanol, acetonitril), resp.  $\geq 98$  % (*n*-hexan) (Merck KGaA, Německo).

Linearita odpovědi na různé koncentrace standardu ergosterolu v rámci kalibrační křivky byla testována na třech přístrojích:

- 1) GC-FID (HP 5890 series II) – plynový chromatograf s plamenově-ionizačním detektorem a kapilární kolonou Zebron ZB-5ms (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex, USA) s těmito parametry analýz: nosný plyn helium o konstantním vstupním tlaku 150 kPa, počáteční teplota kolony 60 °C (1 min), dále teplotní program 15 °C  $\text{min}^{-1}$  do 200 °C a následně 2,5 °C  $\text{min}^{-1}$  do 275 °C, na této teplotě prodleva 15 min. Vyhodnocení analýz bylo prováděno softwarem Clarity<sup>™</sup> (Data APEX).
- 2) Finnigan GCQ<sup>®</sup> (ThermoQuest) – plynový chromatograf v kombinaci s hmotnostním detektorem typu iontové pastí a kapilární kolonou Zebron ZB-5ms (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ , Phenomenex, USA) s těmito parametry: nosný plyn helium s konstantní vstupní rychlostí 40 cm  $\text{s}^{-1}$ , teplota nástřiku 250 °C, počáteční teplota kolony 60 °C, dále teplotní program 20 °C  $\text{min}^{-1}$  do 200 °C, poté 4 °C  $\text{min}^{-1}$  do 275 °C a na této teplotě prodleva 20 min. Hmotnostní spektrometr pracoval ve dvou režimech: skenování v plném rozsahu *m/z* 50–500 Da („full scan“) a režim MS-MS, při kterém byl vybrán jako prekurzorový ion molekulový ion ergosterolu o *m/z* 396 Da. Vyhodnocení analýz bylo prováděno softwarem Xcalibur (Finnigan Corp.).
- 3) HPLC s detektorem s diodovým polem (DAD) (Agilent 1100 Series G1315B) a kolonou Gemini C18, 110A (5  $\mu\text{m}$ , 2  $\times$  150 mm; Phenomenex, USA). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril : voda

(90:10) o konstantním průtoku 0,41 ml min<sup>-1</sup>, DAD detektor pracoval v rozsahu vlnových délek 200 až 600 nm. Ergosterol byl detegován při vlnové délce 282 nm. Vyhodnocení analýz bylo prováděno softwarem ChemStation (Hewlett Packard).

#### Příprava vzorků a chemická analýza

Půdní vzorky byly odebrány v květnu 2008 z podhorské pastviny používané jako zimoviště skotu (Borová u Chvalšín, Jihočeský kraj)<sup>17</sup>. Zimoviště skotu představuje ekosystém silně ovlivněný aktivitou dobytka<sup>18</sup>. V rámci vybraného zimoviště byly zkoumány půdy na plochách s různou mírou zátěže paseným skotem, tj. silně ovlivněná (S) a středně ovlivněná (M) půda, které byly porovnány s neovlivněnou půdou podhorské pastviny (C)<sup>19,20</sup>. Půdní vzorky byly z každé plochy odebrány ve třech nezávislých opakováních. Každé opakování sestávalo ze tří podvzorků, které byly zhomogenizovány přesátím (síta 4 mm) a smíchány. Půdy byly do analýzy skladovány při 4 °C. Koncentrace celkového dusíku (N<sub>tot</sub>) byla stanovena Kjeldahlovou mineralizační metodou<sup>21</sup>, koncentrace organického uhlíku (C<sub>ox</sub>) metodou spalování<sup>22</sup> a koncentrace dostupného P (P<sub>av</sub>) metodou Mehlich III (cit.<sup>23</sup>).

#### Extrakce ergosterolu

Celkový ergosterol byl extrahován z 250 mg půdy použitím modifikované metody mikrovlnné extrakce (MAE, microwave assisted extraction) podle Montgomeryho a spol.<sup>10</sup>. K půdě ve zkumavce se šroubovacím uzávěrem byly přidány 2 ml methanolu a 0,5 ml 2M-NaOH. Naplněné zkumavky byly zahřívány v mikrovlnné troubě po dobu 2 × 20 s na střední výkon (cca 500 W) s 10minutovou pauzou mezi zahříváními. Následně byly zkumavky ochlazeny pod tekoucí vodou a obsah zkumavek byl zneutralizován 1 ml 1M-HCl; byly přidány další 2 ml methanolu a ergosterol byl extrahován *n*-hexanem (3 × 2 ml). Celkový extrakt byl odpařen do sucha dusíkem a rozpuštěn v 200 μl *n*-hexanu.

Klasická metoda extrakce ergosterolu<sup>10</sup> spočívala v promíchání 8 g půdy s 30 ml methanolu (2×), výsledný extrakt byl smíchán s 50 ml ethanolu a 1,6 g KOH a následně zahříván po dobu 30 min. Po ochlazení byl ergosterol extrahován 3 × 50 ml hexanu, výsledný extrakt byl odpařen do sucha na rotační odparce a odparek byl rozpuštěn v 1 ml hexanu. Vzorky byly derivatizovány acetanhydridem při teplotě 60 °C po dobu 60 min za přítomnosti suchého pyridinu<sup>14</sup>.

Před samotnými analýzami byl vzorek získaný metodou MAE rozdělen na dvě poloviny. Z první poloviny byl 1 μl vzorku v hexanu nanesen do injektoru GC-FID nebo GC-MS-MS. Pro HPLC byl *n*-hexan z druhé poloviny vzorku odfoukán proudem dusíku a nahrazen stejným objemem methanolu; 5 μl vzorku v methanolu bylo nanášeno do injektoru HPLC.

#### Statistické analýzy

Získaná data byla analyzována softwarem STATISTICA6 (StatSoft, Inc., USA). Pro hodnocení statistické významnosti rozdílu mezi půdami byla použita jednocestná analýza variance (ANOVA) s Tukey HSD post-hoc srovnáním. Pearsonova korelace (Pearson *r*) byla použita pro definici závislosti koncentrace ergosterolu na vybraných chemických parametrech. Hladina významnosti byla  $\alpha \leq 0,05$ .

#### Výsledky a diskuse

##### Příprava vzorků

V rámci předběžného pokusu bylo zjištěno, že derivatizace nepřinesla zlepšení vlastností ergosterolu pro detekci metodou GC-MS-MS, a to jak u vnějšího standardu, tak v případě analyzovaného půdního vzorku. Derivatizace se běžně využívá pro chemickou úpravu molekul analytu za účelem zlepšení vlastností analyzovaných látek. Tímto postupem lze zvýšit separační účinnost, rozlišení a citlivost při detekci biomarkeru<sup>14,16</sup>. Nicméně v tomto případě byly chromatografické píky standardu i hledaného analytu v půdním vzorku i při vynechání derivatizačního kroku souměrné a dobře separované. Zároveň u derivatizovaných vzorků nebylo dosaženo zvýšení citlivosti detekce.

Oproti klasické metodě extrakce, při níž je návratnost ergosterolu z půdních vzorků 70 až 95 %, vykázala metoda mikrovlnné extrakce (MAE) jak vyšší návratnost ergosterolu (90 ± 6 %), tak zároveň nižší variabilitu. Variační koeficient (CV) byl v případě MAE 13 %, zatímco u klasické metody téměř trojnásobný (CV = 36 %).

Metoda MAE je také ekonomičtější a méně zatěžuje životní prostředí. Při použití MAE se používá pouze 10 ml organických rozpouštědel, zatímco při použití klasické metody extrakce je objem organických rozpouštědel větší než 250 ml (cit.<sup>14</sup>). Proto jsme se rozhodli používat při dalších analýzách výhradně metodu MAE urychlenou vynecháním derivatizačního kroku.

##### Analýza GC-FID

Detekční limit metody GC-FID byl při použití čistého roztoku standardu ergosterolu 10 ng μl<sup>-1</sup>. Za daných podmínek a ve stanoveném rozsahu kalibrační křivky byla linearita odezvy detektoru horší než v případě GC-MS-MS a HPLC (odezvu lépe vystihuje kvadratická funkce ( $r = 0,9944$ ) než lineární ( $r = 0,9809$ )). Vzhledem k vyššímu detekčnímu limitu metody lze říci, že GC-FID není příliš vhodná metoda pro stanovení ergosterolu v případě nízkých navážek používaných při metodě mikrovlnné extrakce MAE. Při použití vyšších navážek půdy je nutné používat větší objemy organických rozpouštědel a ztrácí se tak ekonomická i ekologická výhodnost MAE metody. Druhou nevýhodou tohoto stanovení je skutečnost, že retenční čas ( $t_R$ ) je jediným parametrem pro identi-

fikaci látky. Retenční čas však není natolik přesnou charakteristikou, aby bylo možné pouze na jejím základě nalézt a identifikovat zkoumanou látku v přírodních vzorcích.

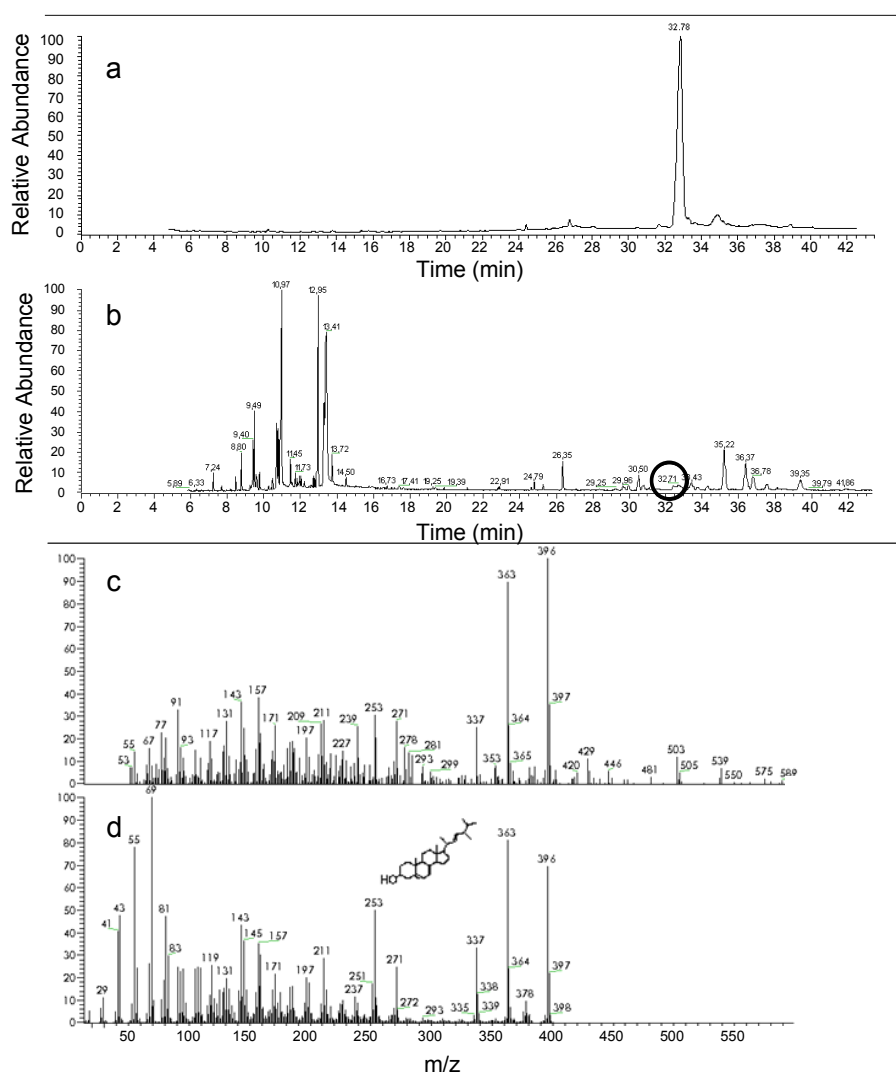
#### Analýza GC-MS-MS

Detekční limit metody GC-MS-MS za použití čistého ergosterolu byl  $1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ . V případě GC-MS-MS byla odezva detektoru lineární v celém rozsahu kalibrační křivky. Rovnicí kalibrační křivky ( $y = 12476x + 28200$ ;  $r = 0,9980$ ) je vyjádřena závislost plochy píku ergosterolu ( $y$ ) na jeho koncentraci ( $x$ ) [ $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ].

Celkový iontový chromatogram (TIC, total ion chromatogram) standardu ergosterolu stanovený v režimu „full

scan“ je zobrazen na obr. 1a. Retenční čas ( $t_R$ ) pro standard ergosterolu byl  $32,8 \pm 0,15$  min. Následovalo měření půdních vzorků v režimu „full scan“, v tomto případě byla nalezena látka s  $t_R$  odpovídajícím ergosterolu ( $32,8 \pm 0,17$  min) (obr. 1b). Identifikace ergosterolu byla provedena porovnáním hmotnostního spektra látky nalezené v půdním vzorku (obr. 1c) se spektrem v knihovně spekter Xcalibur NIST (obr. 1d).

Hmotnostní spektra látek identifikovaných jako ergosterol v půdních vzorcích (tj. látek s  $t_R = 32,8 \pm 0,17$  min) obsahovala všechny důležité ionty pro identifikaci hledaného analytu. Selektivní režim MS-MS byl proto charakterizován specifickým retenčním oknem a vybraným prekurzorovým iontem (molekulární ion ergosterolu  $m/z$  396 Da), čímž došlo k odfiltrování látek nesouvisející-



Obr. 1. Celkový iontový chromatogram (TIC) GC-MS vnějšího standardu (ergosterol, Sigma-Aldrich,  $100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) s  $t_R = 32,78$  min (a) a TIC půdního vzorku S ( $t_R$  hledané látky =  $32,71$  min) (b). Srovnání hmotnostního spektra hledané látky (c) s hmotnostním spektrem ergosterolu v knihovně spekter Xcalibur NIST (d). Měřeno na přístroji Finnigan GCQ<sup>®</sup> (ThermoQuest) v režimu „full scan“, podmínky stanovení jsou uvedeny v textu

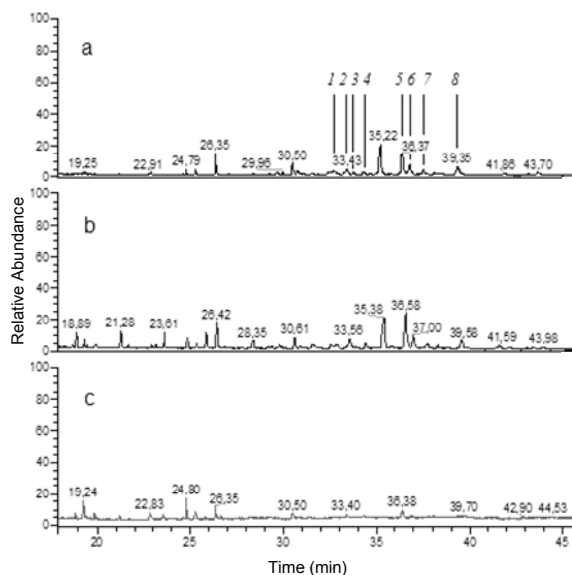
cích se stanovením a samotné měření ergosterolu tak bylo citlivější a přesnější. Obr. 2c a 2d ukazují podobnost rozpadového hmotnostního spektra v rozsahu  $m/z$  100–396 Da u prekurzorového iontu z látky v půdním vzorku (obr. 2a) a ve standardu (obr. 2b). Toto porovnání bylo použito jako další důkaz identifikace ergosterolu v půdních vzorcích.

Během analýzy GC-MS v režimu „full scan“ jsme zaznamenali další píky v TIC půdních vzorků (obr. 3). Látky odpovídající těmto píkům byly identifikovány na základě hmotnostních spekter a pomocí příslušných standardů jako kampesterol ( $t_R = 33,40$  min), stigmasterol ( $t_R = 34,33$  min) a  $\beta$ -sitosterol ( $t_R = 36,37$  min) (tři nejčastější fytoosteroly v půdě<sup>24,25</sup>), případně ergostanol a sitostanol ( $t_R = 36,78$  min), což jsou steroly biohydrogenované mikroflórou z trávicího traktu zvířat<sup>25</sup>. Dále jsme zjistili, že nejen počet látek v profilu sterolů, ale také jejich relativní množství ve vzorcích bylo vyšší v půdách zatížených skotem (S a M) ve srovnání s neovlivněnou půdou (C). Přítomnost fytoosterolů a příslušných stanolů v půdách S a M je výsledkem zpracování rostlinné stravy pasenými zvířaty a následným vyloučením ve formě exkrementů na povrch půdy na zatížených částech zimoviště skotu<sup>25</sup>.  $\beta$ -Sitosterol se vyskytoval nejen v TIC půdních vzorků, ale byl detegován i během selektivního režimu MS-MS (obr. 3a). Vysvětlením detekce tohoto sterolu může být přítomnost prekurzorového iontu ergosterolu ( $m/z$  396 Da) ve fragmentačním spektru  $\beta$ -sitosterolu a poměrně široké retenční okno.

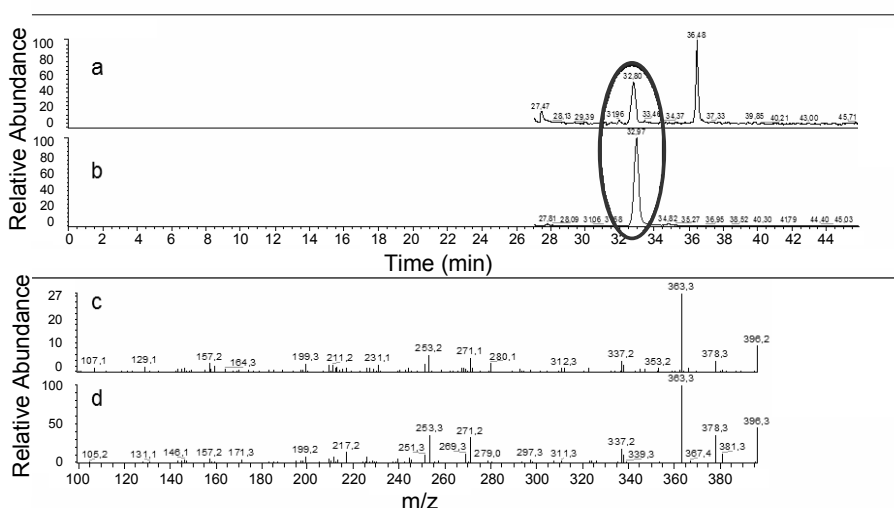
#### Analýza HPLC

Detekční limit pro metodu HPLC za použití čistého ergosterolu byl srovnatelný s GC-MS-MS, tj. 1 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

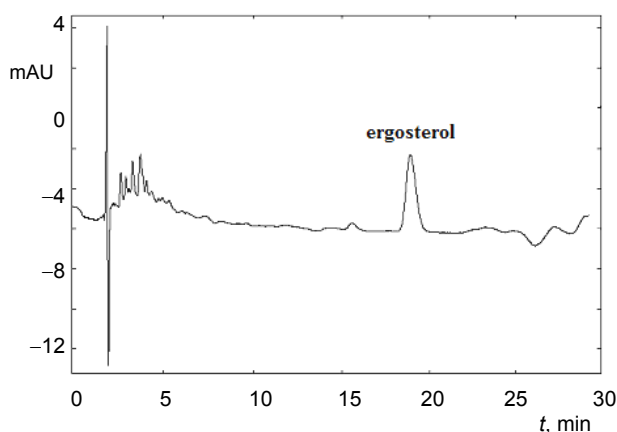
Odezva detektoru byla v celém rozsahu kalibrační křivky lineární a rovnici kalibrační křivky ( $y = 18,04x + 5,85$ ;  $r = 0,9998$ ) je vyjádřena závislost plochy píku ergosterolu ( $y$ ) na jeho koncentraci ( $x$ ) [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ].



Obr. 3. Detail celkového iontového chromatogramu (TIC) v režimu „full scan“ půdních vzorků podél gradientu zátěže půdy skotem u silně (a) a středně zatížené (b) půdy v porovnání s nezatíženou půdou (c). Identifikované píky: 1 – ergosterol; 2 – kampesterol; 3 – ergostanol; 4 – stigmasterol; 5 –  $\beta$ -sitosterol; 6 – sitostanol; 7 –  $\beta$ -amyryn; 8 –  $\alpha$ -amyryn. Měřeno na přístroji Finnigan GCQ<sup>®</sup> (ThermoQuest) v režimu „full scan“, podmínky stanovení jsou uvedeny v textu



Obr. 2. Srovnání chromatogramu GC-MS-MS iontu  $m/z$  396 Da u půdního vzorku S ( $t_R$  hledané látky = 32,80 min) (a) a vnějšího standardu ( $t_R$  ergosterolu = 32,97 min) (b) a porovnání rozpadového spektra prekurzorového iontu ( $m/z = 396$  Da) ergosterolu v půdním vzorku (c) a ve standardu (d) po použití metody GC-MS-MS. Podmínky stanovení jsou uvedeny v textu



Obr. 4. HPLC chromatogram vzorku z půdy se střední zátěží (M). Měřeno na HPLC přístroji Agilent 1100 Series G1315B s detektorem s diodovým polem (DAD), podmínky stanovení jsou uvedeny v textu

Retenční čas ergosterolu v půdním vzorku byl za daného nastavení 19,2 min. Použitím 95 % methanolu namísto 90 % acetonitrilu jako mobilní fáze bylo možné zkrátit dobu analýzy z 25 na 13 min, nicméně jak rozlišení piků, tak kvantifikace ergosterolu se zhoršily, zejména v případě kvantifikace ergosterolu v půdních vzorcích.

Na chromatogramu vzorku z půd zatížených pastvou skotu získaném metodou HPLC při 282 nm (obr. 4) nebyly nalezeny žádné další steroly ani látky koelující s ergosterolem. Stanovení při 282 nm je pro detekci ergosterolu poměrně vhodné, neboť při této vlnové délce má ergosterol typické maximum v absorpčním spektru<sup>26</sup>. Přesto lze v literatuře nalézt případy falešně pozitivních identifikací ergosterolu metodou HPLC s UV detektorem<sup>15</sup>, případně interferencí s látkami v jiných přírodních vzorcích (vzorky vody, detritu, atd.)<sup>16,27</sup>. Problém případné koeluce ergosterolu s neidentifikovanými látkami ze vzorku během HPLC lze vyřešit například acetylací ergosterolu<sup>16</sup> a následným stanovením acetátu ergosterolu při vlnové délce 282 nm.

#### Srovnání metod GC-MS-MS a HPLC

Stanovení koncentrace ergosterolu v půdních vzorcích závisí na použité analytické metodě. Srovnáním metod GC-MS-MS a HPLC jsme našli významné rozdíly v hodnotách koncentrací ergosterolu. Hodnoty získané při analýzách GC-MS-MS byly v průměru o 30 % vyšší než hodnoty získané metodou HPLC, zejména pak při vyšších koncentracích ergosterolu. Vysvětlením tohoto jevu mohou být ztráty způsobené převáděním ergosterolu z extrakčního nepolárního rozpouštědla (hexan) do polárního rozpouštědla vhodného pro HPLC (methanol). Polarita rozpouštědla má v případě ergosterolu podstatný vliv na jeho rozpustnost, jelikož se zvyšující se polaritou rozpouštědla rozpustnost ergosterolu klesá<sup>28,29</sup>.

Variační koeficient (CV) rostl se zvyšující se koncentrací

trací ergosterolu v půdách S a M rychleji u měření metodou HPLC (CV = 0,10, resp. 0,24) než v případě metody GC-MS-MS (CV = 0,05, resp. 0,10). Vzhledem k selektivitě metody GC-MS-MS jsme se rozhodli používat pro studium společenstev hub v půdě na zimovišti skotu pouze výsledky získané touto metodou.

Výhodou kombinace dvou režimů („full scan“ a MS-MS) při analýzách přírodních vzorků metodou GC-MS je možnost detekce celého profilu sterolů v režimu „full scan“. Při použití moderních kapilárních kolon (např. se stacionární fází 5 % fenyl – 95 % dimethylpolysiloxan) dochází k vynikajícímu rozdělení jednotlivých sterolů a příslušných stanolů<sup>27</sup>. Oproti tomu je analýza celkového profilu sterolů metodou HPLC komplikovaná nedostatečnou selektivitou při separaci sterolů a stanolů v přírodních vzorcích<sup>27</sup>. Jednotlivé steroly se mezi sebou liší svými absorpčními spektry<sup>30</sup> a HPLC při jedné vlnové délce tyto látky nedeteguje.

#### Koncentrace ergosterolu v půdě zimoviště

Mezi vybranými místy podél gradientu zátěže půdy skotem jsme našli statisticky významné rozdíly v koncentraci ergosterolu. Půda C bez vlivu skotu obsahovala  $0,93 \pm 0,34 \mu\text{g g}^{-1}$  (průměr  $\pm$  směrodatná odchylka,  $n = 3$ ) ergosterolu, zatímco půda M  $14,01 \pm 0,77 \mu\text{g g}^{-1}$  a půda S  $29,28 \pm 3,07 \mu\text{g g}^{-1}$  ergosterolu. Rozdíly mezi půdami S, M i C byly statisticky průkazné. Kromě toho byla u zkoumaných půd zjištěna pozitivní korelace mezi koncentrací ergosterolu a koncentrací  $C_{ox}$  ( $r = 0,9333$ ;  $p = 0,0002$ ),  $N_{tot}$  ( $r = 0,9500$ ;  $p = 0,0001$ ) a  $P_{av}$  ( $r = 0,9363$ ;  $p = 0,0002$ ).

V dostupné literatuře lze nalézt minimum údajů týkajících se množství ergosterolu v půdách evropských pastvin<sup>11,31</sup>. Stanovení ergosterolu v těchto pracích byla prováděna metodou HPLC za použití směsi hexan:propan-2-ol v poměru 98:2 (v/v), resp. methanolu jako mobilní fáze<sup>11,31</sup>. Na extenzivně využívaných pastvinách ve Velké Británii<sup>11</sup> a v Nizozemí<sup>31</sup> byly takto stanoveny hodnoty koncentrací ergosterolu v rozmezí  $0,54\text{--}5,21 \mu\text{g g}^{-1}$ , resp.  $0,8\text{--}3,8 \mu\text{g g}^{-1}$  půdy.

Z uvedených dat je viditelné, že experimentální zimoviště skotu je zvláštním typem ekosystému odlišným od běžných pastevních stanovišť, a to vzhledem k intenzivnímu působení skotu na půdu, což indikují změny struktury půdy, vegetace<sup>20</sup> i chemických parametrů půdy (tab. I). Předpokládali jsme, že půdní houby mohou být potlačeny vyšším pH nebo mechanickým poškozením mycelií v půdě na místech s vyšší zátěží skotem (S a M) oproti kontrolní půdě C (tab. I). Biomasa půdních hub byla ale naopak na místech ovlivněných skotem a jejich exkrementy vyšší.

Stimulační vliv skotu na biomasu hub je pravděpodobně spojen se značnými vstupy organického uhlíku ve formě exkrementů, které podstatně zvyšují obsah stabilní organické hmoty v těchto půdách<sup>17</sup>. Významnou roli zde hraje fakt, že k vysokým vstupům exkrementů do půdy dochází mimo vegetační období a exkrementy jsou během

Tabulka I

Chemické parametry a obsah ergosterolu v půdách zimoviště skotu, Borová u Chvalšín, jižní Čechy (průměr ± směrodatná odchylka;  $n = 3$ ). Statisticky průkazné rozdíly mezi stanovišti C, M a S jsou vyznačeny odlišnými písmeny abecedy

Půda	Popis	<sup>a</sup> pH	<sup>b</sup> C <sub>ox</sub> [g kg <sup>-1</sup> ]	<sup>c</sup> N <sub>tot</sub> [g kg <sup>-1</sup> ]	C:N	<sup>d</sup> P <sub>av</sub> [mg kg <sup>-1</sup> ]	<sup>e</sup> Ergosterol [μg g <sup>-1</sup> ]
C	pastvina, bez vlivu skotu	4,8 ± 0,0a	50,8 ± 3,6a	1,7 ± 0,0a	29,4	5,0 ± 0,0a	0,9 ± 0,3a
M	zimoviště, střední zátěž	6,6 ± 0,0b	101,1 ± 2,6b	3,9 ± 0,0b	25,9	217,3 ± 1,2b	14,0 ± 0,8b
S	zimoviště, silná zátěž	7,7 ± 0,3c	174,0 ± 8,9c	6,5 ± 0,1c	26,8	636,0 ± 38,9c	29,3 ± 3,1c

<sup>a</sup>pH v CaCl<sub>2</sub>, <sup>b</sup>C<sub>ox</sub> – organický uhlík, <sup>c</sup>N<sub>tot</sub> – celkový dusík, <sup>d</sup>P<sub>av</sub> – dostupný fosfor, <sup>e</sup>ergosterol stanovený metodou GC-MS-MS

tohoto období důkladně zapracovány přezimujícím skotem do půdy<sup>17,18</sup>. Námí zjištěná poměrně vysoká koncentrace ergosterolu v půdách zimoviště ovlivněných skotem odpovídá předchozím výsledkům ze stejných pokusných ploch na zimovišti skotu<sup>19</sup>, kdy bylo zjištěno, že vlivem skotu se celková biomasa půdních mikroorganismů zvyšuje.

Vysvětlením může být také nepřímý vliv vstupů dusíku do půdy – ovlivnění společenstev rostlin a následně i kvality a kvantity rostlinného opadu, změny ve složení kořenových exsudátů a tím i rhizosférických společenstev mikroorganismů<sup>32</sup>.

## Závěry

Pro detekci a stanovení ergosterolu ve složitých přírodních vzorcích (např. v půdě) byla vyhodnocena jako nejvýhodnější metoda GC-MS-MS. Režim MS-MS umožňuje selektovat během analýzy pouze určité molekuly, zatímco v režimu „full scan“ lze využít zejména možnost sledovat složení celkových sterolů v půdě a následně identifikovat nalezené látky na základě hmotnostních spekter. Metoda HPLC sice vykazovala podobný detekční limit jako GC-MS-MS, nicméně při stanovení ergosterolu byla více variabilní a nemusí být vždy dostatečně selektivní pro analýzu přírodních vzorků. Pro optimální stanovení ergosterolu metodou GC-FID by měla být navážka vzorků cca o 2 řády vyšší než pro metodu MAE a použitím většího množství rozpouštědel se ztrácí jak ekonomická, tak ekologická výhodnost této metody. Na základě měření koncentrace ergosterolu v půdě ovlivněné přezimujícím skotem byl zjištěn stimulační vliv pobytu skotu na biomasu saprotrofních hub. Biomasa hub v půdě zimoviště skotu byla v porovnání s nezatíženou půdou podhorské pastviny několikanásobně vyšší. Analýza celkových sterolů v námi studovaných půdách ukázala také významné obohacení rostlinnými steroly a jejich deriváty (stanoly) v důsledku aktivity přezimujícího skotu.

*Práce byla podpořena z Výzkumného záměru Ústavu půdní biologie BC AV ČR, v. v. i., (č. AV0Z60660521), Výzkumného záměru Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR, v. v. i. (č. AV0Z60870520), grantu MŠMT (LC 06066 Centrum environmentální mikrobiologie) a grantu GA AV ČR (IAA600660605).*

## LITERATURA

- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H.: *Microbiol. Rev.* 59, 143 (1995).
- Whipps J. M., Haselwandter K., McGee E. E. M., Lewis D. H.: *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 79, 385 (1982).
- Young I. M., Illian J., Harris J. A., Ritz K.: *Soil Biol. Biochem.* 38, 1500 (2006).
- Lees N. D., Skaggs B., Kirsch D. R., Brad M.: *Lipids* 30, 221 (1995).
- Grant W. D., West A. W.: *J. Microbiol. Methods* 6, 47 (1986).
- Martin F., Delaruelle C., Hilbert J. L.: *Mycol. Res.* 94, 1059 (1990).
- Weete A. D.: *Adv. Lipid Res.* 23, 115 (1989).
- Seitz L. M., Mohr H. E., Burroughs R., Sauer D. B.: *Cereal Chem.* 54, 1207 (1977).
- Zhao X. R., Lin Q., Brookes P. C.: *Soil Biol. Biochem.* 37, 311 (2005).
- Montgomery H. J., Monreal C. M., Young J. C., Seifert K. A.: *Soil Biol. Biochem.* 32, 1207 (2000).
- Ruzicka S., Edgerton D., Norman M., Hill T.: *Soil Biol. Biochem.* 32, 989 (2000).
- Newell S. Y., Miller J. D., Fallon R. D.: *Mycologia* 79, 688 (1987).
- Klamer M., Bååth E.: *Soil Biol. Biochem.* 36, 57 (2004).
- Axelsson B. O., Saraf A., Larsson L.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 666, 77 (1995).
- Verma B., Roberts R. D., Headley J. V., Peru K. M., Christofi N.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 33, 3261 (2002).

16. Abramson D., Smith D. M.: *J. Stored Prod. Res.* 39, 185 (2003).
17. Šimek M., Elhottová D., Klimeš F., Hopkins D. W.: *Soil Biol. Biochem.* 36, 9 (2004).
18. Hynšt J., Šimek M., Brůček P., Petersen S. O.: *Agric. Ecosys. Environ.* 120, 269 (2007).
19. Radl V., Gättinger A., Chroňáková A., Němcová A., Čuhel J., Šimek M., Munch J. C., Schloter M., Elhottová D.: *ISME J.* 1, 443 (2007).
20. Jirout J., Tříška J., Růžičková K., Elhottová D.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 40, 736 (2009).
21. Kirk P. L.: *Anal. Chem.* 22, 354 (1950).
22. McGeehan S. L., Naylor D. V.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19, 493 (1988).
23. Mehlich A.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 15, 1409 (1984).
24. Puglisi E., Nicelli M., Capri E., Trevisan M., Del Re A. A. M.: *J. Environ. Qual.* 32, 466 (2003).
25. Rogge W. F., Medeiros P. M., Simoneit B. R. T.: *Atmos. Environ.* 40, 27 (2006).
26. Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. A., Toivo J., Lampi A.-M.: *J. Sci. Food Agric.* 80, 939 (2000).
27. Headley J. V., Peru K. M., Verma B., Robarts R. D.: *J. Chromatogr., A* 958, 149 (2002).
28. Zhang H., Wolf-Hall Ch., Hall C.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 11077 (2008).
29. Acros Organics, Biochemicals and Reagents, Biochemicals Found in Plants, Sterols, Ergosterol 98%, product information, www.acros.com, staženo 14. ledna 2010.
30. Barros T. F., de Resende M. A.: *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 41, 343 (1999).
31. de Vries F. T., Bloem J., van Eekeren N., Brusaard L., Hoffland E.: *Soil Biol. Biochem.* 39, 1620 (2007).
32. Bardgett R. D., McAlister E.: *Biol. Fertil. Soils* 29, 282 (1999).

**J. Jirout<sup>a,b</sup>, J. Tříška<sup>c</sup>, K. Růžičková<sup>c</sup>, N. Vrchotová<sup>c</sup>, M. Šimek<sup>a</sup>, and D. Elhottová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Institute of Soil Biology, Biology Centre, Academy of Sciences of Czech Republic, České Budějovice*, <sup>b</sup> *Department of Ecosystem Biology, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice*, <sup>c</sup> *Institute of System Biology and Ecology, Academy of Sciences of Czech Republic, České Budějovice*): **The Comparison of Chromatographic Methods for Ergosterol Determination and Their Application in Analysis of Upland Pasture Soil**

Ergosterol, a biomarker of living saprotrophic fungi, was obtained from soil by microwave-assisted extraction and determined by GC-MS-MS, HPLC, and GC-FID. The GC-MS-MS technique was used to monitor fungal biomass in the soils differently impacted by overwintering cattle. The amount of ergosterol in soil increased from  $0.93 \pm 0.34$  to  $29.28 \pm 3.07 \mu\text{g g}^{-1}$  of soil. The detection limits in GC-MS-MS and HPLC methods were ca. ten times lower than in GC-FID. Whereas GC-MS-MS is the best method for monitoring the complex sterol profile in the environment, the selective MS-MS mode allowed the determination of ergosterol in complex matrices by elimination of coeluting peaks. The enrichment of cattle-impacted soils in non-fungal sterols (campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol) and stanols (ergostanol, sitostanol) was due to digested plant materials and rumen microflora, suggesting significant biochemical changes in the pasture soils under study.

## MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE RESPIRAČNÍCH OKRUHŮ

KAREL LEHMERT

*Státní úřad pro jadernou bezpečnost, Senovážné nám. 9,  
110 00 Praha 1  
karel.lehmert@sujb.cz*

Došlo 23.12.08, přepracováno 28.4.09, přijato 15.10.09.

---

Klíčová slova: dýchací přístroje, bezpečnost práce

---

### Úvod

Důležitou součástí ochrany před účinky škodlivých látek jsou osobní ochranné prostředky. Mikrobiální kontaminací respiračních okruhů se odborné práce zabývají jen okrajově, nejčastěji z pohledu humánní medicíny v souvislosti s podpůrnou plicní ventilací. Úkolem této práce bylo navrhnout filtrační metodu účinnou v různých technických typech respiračních okruhů s minimálními náklady a bez velkých konstrukčních zásahů do funkčního celku. Zpracováním literatury bylo zjištěno, že nebyly publikovány odborné práce řešící podobnou tematiku jako celek.

Osobní ochrana pracovníků před účinky chemických látek či biologických agens a toxinů je v principu bariérová. Pomocí ochranného přetlakového oděvu je pracovník chráněn před vniknutím kontaminantů na kůži, sliznice i do dýchacích cest. Přetlak zároveň zabraňuje kontaminaci technologickými netěsnostmi či drobnými defekty materiálu. Tlakový plyn se zároveň používá i jako dýchací médium.

### Používané respirační systémy

Zdrojů přetlaku může být několik – používají se individuální filtroventilační jednotky s bateriovým napájením, hadicové připojení ke vzdálenému zásobníku (obdoba systému „nargilé“) či nesená zásoba média v tlakové láhvi (SCBA – self contained breathing apparatus). Všechny systémy mají společnou jednu slabinu – různě dlouhé a členité vedení tlakového dýchacího média. Bateriové filtroventilační jednotky mají rozvody relativně nejméně komplikované.

### Systém „nargilé“

Laboratorní podoba systému „nargilé“ se skládá z kompresoru tlakujícího dýchací médium do stacionárního zásobníku, odkud je středotlakou soustavou rozvedeno do koncových přípojek, na které se přes tlakové hadice připojuje ochranný oblek nebo maska. Kontaminaci vnitřního prostředí přes středotlakou spojku zabraňuje integrovaný HEPA filtr. Ten však řeší pouze bariérovou ochranu před průnikem kontaminovaného dýchacího média do vnitřního prostoru.

### Nezávislý dýchací přístroj (SCBA)

Systém je předchozímu systému velice podobný. Při použití otevřeného okruhu (open circuit – OC) stacionární vysokotlaký kompresor naplní nezávislou tlakovou láhev dýchacím médiem a ta je na místo určení nesená uživatelem. Zásoba plynu je konečná, rovnající se objemu tlakové láhve. Po připojení I. redukčního stupně je dýchací médium dále vedeno středotlakým rozvodem do II. stupně. Zde se středotlak redukuje na tlak okolního prostředí a je již přímo veden do celobličejové masky, náustku nebo jiného zařízení umožňujícího přímé dýchání. Vydechutý plyn je odveden do okolní atmosféry soustavou jednosměrných výdechových ventilů. Oproti předchozímu systému SCBA umožňuje větší mobilitu pracovníka za cenu omezení nesenou zásobou dýchacího média

### Polouzavřený systém nebo uzavřený systém

Oběma je společné větší využití dýchacího média díky částečné (semi-closed circuit – SCC) nebo úplné (closed circuit – CC) recyklaci plynu přes pohlcovače CO<sub>2</sub> s obohacením o kyslík nebo směs nitroox (enriched air nitrox – EANx). Tyto systémy umožňují výrazně snížit kapacitu nesených tlakových láhví při mnohonásobně vyšším operačním čase díky lepšímu využití dýchacího média.

### Dýchací média

Nejstarším a stále nejobvyklejším používaným dýchacím médiem je vzduch. V posledních 20 letech se však stále častěji uplatňuje obohacený vzduch, obohacený o kyslík – směs dusíku a kyslíku. Procento kyslíku ve směsi udává číslo v názvu směsi, tedy EAN 21 je vzduch. Nejčastěji používanější jsou tzv. „nitroxy“ do 40 % kyslíku ve směsi nevyžadující speciální technické úpravy a přitom výrazně snižující únavu pracovníků při pobytu v kontrolovaném prostředí.

### Experimentální část

#### Cíl výzkumu

Cílem výzkumu bylo hodnocení bakteriální kontaminace celého systému zásobování tlakovým dýchacím médiem. Podnětem byla řada onemocnění dlouhodobých



uživatelů systémů a snaha zabránit dalším škodám na zdraví. V návaznosti na výsledky tohoto výzkumu je řešen i technický postup zaručující nižší pravděpodobnost onemocnění uživatelů dýchacích systémů.

### Metoda výzkumu

Základní metodou vzorkování se staly stěry z exponovaných povrchů ochranných oděvů. K zajištění různorodosti vzorků byly použity stěry z různých částí dýchacího okruhu, aby bylo možné určit nejkritičtější bod celého systému. Výzkum byl v první fázi zaměřen na zjištění bakteriální kolonizace základních součástí dýchacích okruhů. Vzhledem k tomu, že pracovníci se v laboratorních oblecích střídají, je důležité znát míru interpersonálního přenosu patogenních mikroorganismů mezi jednotlivými uživateli. Na základě tohoto zjištění byla doporučena opatření k pravidelné čistě klíčových prvků systému. V dalších fázích budou tato doporučení vyhodnocena a experimentálně ověřeny způsoby omezení kontaminace dýchacích cest uživatelů.

### Zdroje vzorků

#### *Výstroj pro potápěče*

Jednou z velkých skupin uživatelů dýchacích přístrojů jsou potápěči. Proto byla vybrána pro testování skupina náhodných kusů výstroje z veřejné půjčovny, kde se údržba sestává z opláchnutí proudící vodou, a jako kontrolní skupiny shodné osobní výstroje kvalifikovaných technických potápěčů, u nichž je kladen důraz na perfektní údržbu, často doplněnou i nějakou formou běžně dostupné dezinfekce.

#### *Laboratorní prostředky osobní ochrany*

Zde se vzorkovaly jednotlivé zásobníky stlačeného dýchacího média, koncovky středotlakých rozvodů, vstup dýchacího média do ochranných přetlakových oděvů, vyústění vývodů dýchacího média v hlavové části ochranných oděvů a licnice ochranných polomasek.

### Metodika odběru stěrů

Nejdůležitějším hlediskem při volbě vzorkovaných povrchů u potápěčské výstroje byla podobnost s laboratorními prostředky osobní ochrany. Proto bylo nejvíce stěrů (19) odebráno z vnitřních stěn tlakových láhví a ventilů. Stěry byly odebrány z obou druhů materiálů používaných na tlakové láhve (slitiny oceli a hliníku) i z uzavíracích ventilů. Byly testovány jak dlouhodobě používaná zařízení, tak čerstvě vyčištěné aparáty při pravidelném tlakovém testu, lišil se i obsah kyslíku (21–100 %) u skladovaného média.

#### *Odběr vzorků*

Technickým problémem se stalo provedení stěrů ze dna tlakové láhve, neboť standardní odběrová sada neměla dostatečnou délku. Proto byly použity vatové tampóny na

nosiči příslušné délky, separátně sterilizované v autoklávu a sterilně zabalené. Po provedení stěrů byl tampón sterilně oddělen a uložen do odběrové transportní soupravy.

Další sledovanou částí dýchacích okruhů byly samotné rozvody dýchacího média – redukční ventily používané v atmosféře o stejném rozsahu kyslíkové frakce jako tlakové láhve. U II. stupňů redukčních ventilů byly pořízeny stěry z vnitřního prostoru ústenky sloužící k přímému dýchání (3 vzorky).

Kromě dýchaného plynu je pro organismus významné i vnitřní prostředí ochranného obleku, kterým je neprodyšně izolován od okolí.

Důležitým sledovaným prvkem se stala kolonizace uzavřených přetlakových prostor se stálým pohybem atmosféry během používání, spojená s předpokládanou kontaminací ze zásobníku tlakového média s občasnou inspirací vydechovaného vzduchu přímo z plic uživatele. Tyto kompenzační vztakové vaky (kompenzátory) měly simulovat podmínky v přetlakovém obleku, který je mimo použití skladován uzavřený. Kompenzátory jsou, podobně jako obleky, vyrobeny z omyvatelných pružných materiálů. Pro odběr 16 vzorků byl zvolen povrch vaků v různých místech tvarového tělesa (část kondenzační i trvale oplachované kondenzátem) a ploché těsnění přetlakového ventilu.

Pouze jako doplňkové měření byly sejmuty i dva vzorky z přetlakového obleku (vnitřek integrovaných botiček a plocha přetlakového výpustního ventilu). K plnění obleku byla používána směs argonu a oxidu uhličitého v poměru 3 : 1 pro zvýšení tepelného komfortu.

#### *Stěry z dýchacích přístrojů*

Poslední důležitou skupinou vzorků (7) byly stěry z přístrojů s uzavřeným okruhem (CC) či polouzavřeným okruhem (SC). V těchto přístrojích koluje neustále jedna náplň plynu, ředěná pouze kyslíkem, popř. i diluentem – v našem případě heliem. Při recyklaci dýchacího média přes pohlčovač (hydroxid sodný) se plyn v dýchací smyčce chemickou reakcí ohřívá a zvlhčuje. To opět simuluje podmínky uzavřeného ochranného oděvu. Tyto dýchací přístroje jsou zároveň svými uživateli z bezpečnostních důvodů po každém použití dezinfikovány podle doporučení výrobce. Vzhledem k ceně přístroje se podařilo vzorkovat tři zařízení – jedno používané na čistý kyslík, dvě na heliair – směs vzduchu a hélia. Ke vzorkování byly určeny dýchací vaky (kyslíkový a heliový), vrapové dýchací hadice a nádechový/výdechový ventil.

### Kultivace

K odběru vzorků byly použity odběrové transportní soupravy pro bakteriologické vyšetření dle Amiens (Dispolab, ČR). Tato univerzální transportní půda zaručuje přežití odebraných mikroorganismů po dobu nejméně 48 h. Součástí je i aktivní uhlí k odstranění nespecifických inhibičních látek. Po dobu dopravy do laboratoře byly transportní soupravy uchovávány v termoboxech při teplotě 8 °C. Odebrané vzorky byly kultivovány na Columbia

Agar (Oxoid, UK) s 5 % beraní krve a McConkey Agar (Oxoid, UK). Inkubace probíhala v termostatu v aerobním a mikroaerofilním prostředí při teplotách 20 °C a 36 °C pro rozlišení mesofilních a psychofilních bakterií. Rozdílné teploty byly použity pro rozlišení kontaminace dýchacího média a vzorkovaných povrchů bakteriemi pocházejícími od pracovníků nebo z prostředí.

Po uplynutí inkubační doby (24–48 h) byly kultury posouzeny a v případě nárůstu byla provedena subkultivace na půdě Columbia Agar s 5 % ovčí krve. Jednotlivé kolonie byly posouzeny z hlediska morfologie, biochemické aktivity (katalasa, oxidasa) a následovalo barvení podle Gramma. Na základě těchto dílčích výsledků byly provedeny další biochemické testy pro identifikaci kmenů (Staphytest, Nefermtest, Enterotest – Pliva-Lachema, ČR).

## Výsledky experimentu

Bylo zjištěno, že rezervní laboratorní zásobníky stlačeného plynu spolu se středotlakými rozvody vykazují nízkou bakteriální kontaminaci, oproti běžné provozní tlakové láhvi. V ní se objevily bakterie *Flavobacterium* sp. i *Bacillus* sp. Izolace *Bacillus* sp. ukazuje na možnou kontaminaci zeminou. V závislosti na vzdálenosti od obličeje vykazovaly vnitřní části laboratorního přetlakového oděvu a ochranných masek rozdílnou úroveň kontaminace mesofilními bakteriemi. V místech kontaktu s lidskou kůží se objevuje *Micrococcus* sp. Závažný je nález *Staphylococcus* sp. a *Pseudomonas* sp. v obličejových partiích, což může potenciálně způsobit závažné zdravotní potíže.

Diferenciace výsledků je jednoznačně dána různou úrovní intenzity užívání, což také bylo jedním z účelů experimentu. Zjištění, že i dosud nepoužívaný laboratorní systém je kolonizován patogenními mikroorganismy, je varující. Kromě určení typických kontaminantů byla prokázána i lokalizace patogenních zón v používané sestavě. Další práce se proto zaměřila již jen na dekontaminaci dýchacího plynu, neboť mikroorganismy vyskytující se v obleku nejsou z hlediska patogenity tak významné.

## Diskuse

### Umístění filtrů

Zásadní problém tkví v kontaminaci vnitřních prostor přetlakových dýchacích rozvodů, částečně způsobenou neopatrnou manipulací při montáži (viz případ *Bacillus* sp.), hlavně však špatnou technologickou úpravou dýchacího média. Je zřejmé, že běžné filtry (aktivní uhlí, případně molekulární síto) instalované na výstupu kompresoru problém bakteriální kontaminace nevyřeší.

Jako velmi těžko řešitelné se jeví udržení nádrže na tlakové dýchací médium ve stavu dostatečné vnitřní čistoty. Ideálním řešením by tedy byl filtr umístěný na vstupu dýchacího média do rozvodu, neboť udržet jej v čistotě je

technicky proveditelnější. Vhodným místem je I. redukční stupeň z vysokého tlaku na tlak střední, poskytující dostatek konstrukčního prostoru pro podobné řešení. V již používaných redukčních ventilech je před vstup do pracovního prostoru ventilu předsazen sintrový filtr, jehož úpravou by bylo možné řešit podstatu problému.

### Nanotextilní filtry

V současnosti zkoušené nanotextilní filtry jsou založené na pouhé mechanické filtraci. Již samotný princip nanotextilie brání průchodu větším kontaminantům, jako jsou bakterie nebo plísně. Dosud však není řešen problém zanesení filtrační vložky, neboť se zatím předpokládá jen krátkodobé nárazové použití ukončené likvidací filtru. Při použití v laboratořích je však zatížení filtru mnohem větší, navíc je nutné zabránit přežití zachycených patogenů ve struktuře filtru. Tyto požadavky je možné řešit přidáváním kovových iontů zaručujících abiotické vlastnosti celé textilie.

### Dezinfekce kovovými ionty

Tato metoda je známou praxí, stříbrné stolní náčiní se používalo již od starověku k základnímu udržení bezinfekčnosti. Měďnaté ionty ( $\text{Cu}^{2+}$ ) jsou elektrostaticky přitahovány k negativně nabitým povrchovým strukturám bakterií, hub a virů. Kromě vlastního toxického působení umožní vstup iontům stříbra ( $\text{Ag}^+$ ) způsobujícím u buněk, hub či virů různá organická selhání omezující schopnost rozmnožování, dýchání atd.

Účinné filtrace je tedy dosaženo spojením abiotických vlastností kovových iontů a mechanické filtrace při výrobě nanovlákná s příměsí kovů a následným vytvarováním. Při použití nanotextilie vhodné velikosti se směsí aktivní stříbrné a měďné složky dojde i k filtraci virů.

## Závěr

Při používání osobních ochranných pomůcek by měla být zvýšená hygiena samozřejmostí. V případě střídání mezi více pracovníky je nutností operativní přečištění během střídání a generální dezinfekci po ukončení práce. Není možné stanovit přesné dezinfekční prostředky, neboť vždy záleží na materiálu dezinfikovaného výrobku. Ale obecně lze doporučit některé povrch nedegradující přípravky určené pro dezinfekci medicínálního inventáře.

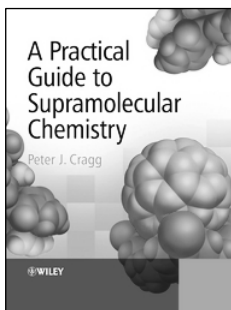
Pro zamezení kontaminace dýchací soustavy s potenciálním vznikem následné infekce se jeví jako nejvhodnější použití filtračního mezistupně vsazeného před I. redukční stupeň. Z konstrukčního hlediska je ideální zakomponování mikrobiálního filtru do prostoru běžného sintrového filtru. Při použití nanotextilie s obsahem aktivních složek mědi a stříbra je možné dosáhnout vysoké účinnosti proti mechanické kontaminaci (voda, olej, prachové částice) i biologickým kontaminantům (bakterie, plísně a částečně i viry). I z ekonomického hlediska je navržené řešení

schůdné, protože nevyžaduje zásadní změny systému, ale pouze výměnu jistých součástí. Výměnu pak zvládne technik certifikovaný výrobcem příslušného zařízení.

**K. Lehmert** (*State Office for Nuclear Safety, Prague*): **Reduction of Microbial Contamination of Respiration Circuits under Hazardous Working Conditions**

Laboratory respirators are equipped with a set of filters for cleaning the breathing gas. Current filters are mechanical, which are based on the particle/pore size ratio. No abiotic substance avoiding pore obstruction with microbes when the particles are retained in filter is present. A multilayer nanofabric with Ag and Cu ions guarantees fast elimination of microbes trapped in filter thus allowing perfect and reliable filtration. The nanofabric can be tailor-made to fit in most filters independently of the breathing gas used.

## RECENZE



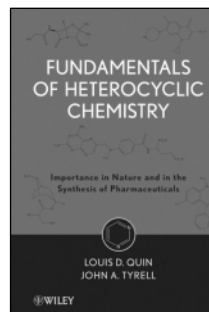
Peter Cragg  
**A Practical Guide  
 to Supramolecular  
 Chemistry**

John Wiley & Sons Inc,  
 (zřejmě) 2. vydání, 2010,  
 brožováno, 203 stran, cena €126.  
 ISBN 13: 9780470866542

Praktická příručka supramolekulární chemie a úvodní manuál praktických experimentů pro chemiky s malou nebo žádnou zkušeností z této oblasti chemie. Syntézy acyklických a makrocyclických sloučenin jsou jasně popsány tak, že je zkušený chemik může snadno provádět. Řada sloučenin může být použita k demonstrování supramolekulární jevy k čemuž je podán jasný návod tak, aby čtenář mohl začít i vlastní bádání v oblasti. Kniha popisuje i experimentální techniky používané k analýze chování supramolekulárních útvarů a zabývá se i výpočty (v knize uvedené jsou provedeny programem Wavefunction Spartan 03). Kromě popisu metod přináší řadu ilustračních příkladů.

Sílu knížky je, že každá kapitola je opatřena kvalitním citačním aparátem. Doplnková webová stránka [www.brighton.ac.uk/pharmacy/Cragg\\_textbook.htm](http://www.brighton.ac.uk/pharmacy/Cragg_textbook.htm), která má obsahovat 3D modely a další materiál, nebyla v době recenze přístupna. Kniha je, nicméně, na Wiley Online Library v plném znění. Jak napsal časopis Synthesis: Pro studenty pregraduálního studia, kteří se zabývají syntetickou supramolekulární chemií je tato kniha povinnou školní četbou, nicméně svoje místo najde i v každé dobré chemické knihovně.

*Pavel Drašar*



Louis D. Quin, John Tyrell:  
**Fundamentals of Heterocyclic  
 Chemistry: Importance in Na-  
 ture and in the Synthesis  
 of Pharmaceuticals**

Vydal Wiley, 2010, pevná vazba, 327  
 stran, cena (Amazon) USD 63,96.  
 ISBN-13: 978-0470566695

Rozsahem nevelká knížka, založená na učitelských zkušenostech autorů, přináší kondenzovanou informaci o důležitosti heterocyclických sloučenin, a to zejména v přírodě a v syntéze biologicky aktivních látek. Tato oblast chemie je důležitou součástí organické chemie, která dnes zná již několik milionů sloučenin z této skupiny. Kniha uvede studenty do chemie heterocyclických sloučenin a jejich syntézy včetně praktických příkladů aplikované metodologie a řady řešených problémů. Pro studenty vyšších cyklů a výzkumníky v jiných oblastech chemie přináší základní informaci o této oblasti chemie.

Po úvodu a nahlédnutí do názvosloví těchto sloučenin bude knížka Fundamentals of Heterocyclic Chemistry průvodcem po základech chemie heterocyklů v přírodě i v laboratoři. Pro laboratorní chemiky přináší úvod do detailních popisů specifických reakcí směřujících ke konstrukci heterocyklů. Jako dobří učitelé, autoři každou kapitolu doplnili shrnutím a literárními odkazy.

Učebnice se jeví jako ideální pro studenty bakalářského magisterského i doktorského studia v nejrůznějších oblastech chemie, ale poslouží i jako základní příručka pro všechny chemiky.

*Pavel Drašar*

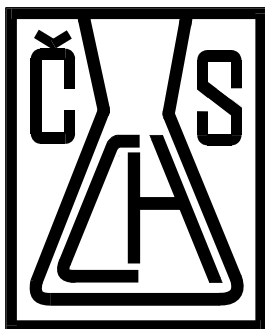
**Proděkan chemické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze upozorňuje  
 na přijímací řízení do  
 bakalářských studijních programů  
 Chemie, Biochemie a KATA  
 pro akademický rok 2011/2012.**

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 2011.

**Další informace naleznete na webových stránkách PŘF UK – [www.natur.cuni.cz](http://www.natur.cuni.cz)**

Odborná skupina organické, bioorganické a farmaceutické chemie ČSCH



# Sborník abstraktů

## Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii

*45. Konference*

*20. - 22. listopadu 2010*

redakce sborníku

Radmila Řápková, Irena Valterová, Vladimír Pouzar a Pavel Drašar

Organizátoři konference si dovolují 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.

∞

**časopis Chemické listy**  
**Merck, spol. s r.o., Praha**  
**SciTech, spol. s r.o., Praha**  
**Sigma-Aldrich, spol. s r.o., Praha**  
**Teva Czech Industries, spol. s r.o., Opava**  
**Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., Praha**  
**Vysoká škola chemicko-technologická, Praha**  
**Zentiva, k.s., Praha**

∞

## Slovo úvodem

*Začalo to skromně, v Liblicích, poté na Zvíkově, scházelo se někdy i skromných 30–40 chemiků, někdy i více. Po jistých peripetiích kolem společenských změn v této zemi dokonce leckterý bard pochyboval o potřebnosti takového setkání. Nicméně, doba převedla, že „Liblice“ jsou akce užitečná a zájem, který rok roku roste a svědčí i o tom, že akce si udržela Česko-Slovenský charakter a že chemici z dotčených oborů souhlasí s tím, že pokud má v těchto zemích někdo něco k předvedení, je třeba ukázat to v „Liblicích“. Je to vidět i na číslech, letos máme na konferenci rekordních 168 účastníků, 8 plenárek, 23 krátkých sdělení a 104 posterů.*

*Ojedinelé diskuse se vedly i o tom, zda přednášky a sdělení mají být v angličtině či nikoliv. Stanovisko organizátorů je jednoduché a souhlasné s politikou redakce Chemických listů, je třeba, aby odborná čeština a slovenština byly vzdělávány mimo jiné i proto, aby v těchto jazycích bylo možno obor vyučovat. Proto i nadále budou „Liblice“ nejlepší národní konferencí v oboru a nikoli jednou z mnoha (lokálních a nedůležitých) konferencí mezinárodních.*

*S tím jazykem národním souvisí i emocionální trápení nad jevem, který snad začíná být módní. Autoři, jejichž jména a příjmení obsahují znaky s diakritickými znaménky, snad podněcováni snahou o světovost, píší svá jména tak, jakoby dnešní počítače již diakritická znaménka nedovedly. Výmluva, že databáze znaménka nepoužívají je lichá, podívejte se na Scopus. Karel Havlíček a další národovci by jistě nad tímto jevem zalomili rukama, roztrhli si roucho ve dvě, ba i propadli v hluboký pláč.*

*Máme naše jazyky národní a vzdělávejme je v našich oborech a pečujme o ně tak, aby z nich nevznikaly anglo-počítačovo-nediakritické hatlamatilký a aby byly i do budoucna ozdobou člověka kulturního, vzdělaného a osvíceného.*

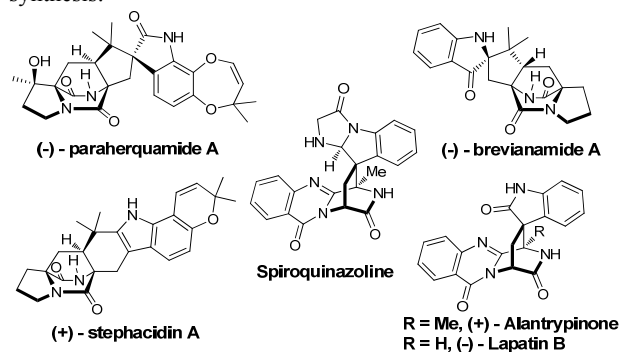
Pavel Drašar

## SYNTHETIC STUDIES TOWARDS COMPLEX BRIDGED ALKALOIDS CONTAINING THE BICYCLO[2.2.2]DIAZAOCTANE CORE STRUCTURE

**TYNCHTYK AMATOV, ULLRICH JAHN\***

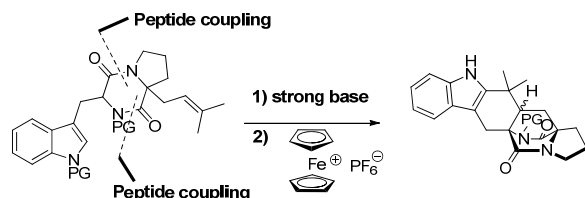
*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Flemingovo nam. 2, 166 10 Prague 6  
amatov@uochb.cas.cz*

The bicyclo[2.2.2]diazaoctane motif is common to families of prenylated indole alkaloids<sup>1</sup> such as breviranamides, paraherquamides, stephacidins and as well as quinazolinone alkaloids<sup>2</sup> like alantrypinone, lapatine B and spiroquinazoline. A wide range of useful bioactivities and their complex structures made these alkaloids appealing targets for total synthesis:<sup>1,2</sup>



Scheme 1. Alkaloids containing the bicyclo[2.2.2]diazaoctane motif

In our proposed approach we aim to apply radical cascade cyclizations to generate the complex core skeleton of these alkaloids rapidly from simple starting materials to develop new and efficient approaches to these natural products:



Scheme 2. Proposed approach toward the Stephacidin A core structure

Herein we present initial results of model studies towards the synthesis of the bicyclo[2.2.2]diazaoctane core structure by tandem radical processes.

### REFERENCES

1. Miller K.A., Williams R.M.: *Chem. Soc. Rev.* 38, 3160 (2009).
2. Chen Z., Fan J., Kende A. S.: *J. Org. Chem.* 69, 79 (2004).

## ŠTÚDIUM SUPRAMOLEKULÁRNYCH KOMPLEXOV CUCURBIT[6]JURILU POMOCOU NMR SPEKTROSKOPIE A VÝPOČTOVEJ CHÉMIE

**MARTIN BABINSKÝ<sup>a</sup>, PETR KULHÁNEK<sup>a</sup>,  
VIKTOR KOLMAN<sup>b</sup>, VLADIMÍR ŠINDELÁŘ<sup>b</sup>,  
RADEK MAREK<sup>a,b</sup>**

*<sup>a</sup> Národní centrum pro výzkum biomolekul, Kamenice 5/A4, 625 00, Brno; <sup>b</sup> Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kamenice 5/A8, 625 00 Brno  
230018@mail.muni.cz*

Komplexy cucurbiturilov s různými organickými molekulami patria v súčasnosti medzi najintenzívnejšie študované supramolekulárne útvary<sup>1</sup>. Schopnosť cucurbiturilov tvoriť mimoriadne stabilné komplexy s rozličnými kladne nabitými zlúčeninami ich predurčuje k využitiu ako farmakofory, katalyzátory a modelové systémy v bioorganickej chémii.

Táto štúdia sa zamerala na preskúmanie interakcie 1-pentylpyrazínia (**I**) a 1-pentyl-4-fenylpyridínia (**II**) s cucurbit[6]jurilom. Cieľom bolo vysvetliť zmeny NMR chemických posunov jadier <sup>1</sup>H a <sup>15</sup>N v hosťovských molekulách pri komplexácii pomocou metód molekulovej dynamiky a kvantovo-chemických výpočtov.

Teoretické štruktúrne modely týchto komplexov boli získané pomocou molekulovo-dynamickej metódy ABF<sup>2</sup> (adaptive biasing force). Takto získané štruktúry sa využili pri výpočtoch chemických posunov a elektrónových hustôt pomocou metód kvantovej chémie. Získané dáta sú porovnané s experimentom a na ich základe sa diskutuje možný vplyv prítomnosti cucurbit[6]jurilu na rozloženie elektrónovej hustoty v ligandoch a na jadrové magnetické tienenie.

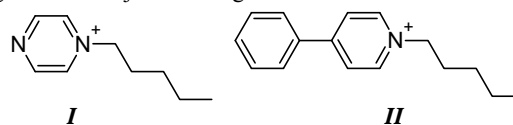


Schéma 1

### LITERATÚRA

1. Lagona J., Mudhopadhyay P., Chakrabarti S., Isaacs L.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 4844 (2005).
2. Darve E., Pohorille A.: *J. Chem. Phys.* 115, 9169 (2001).

### NHC LIGANDY: PREKURZORY A APLIKACE VE FLUOROVÝCH KOMPLEXECH PŘECHODNÝCH KOVŮ

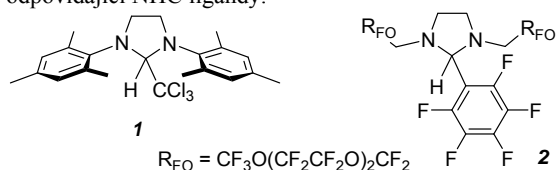
**MARIO BABUNĚK, VERONIKA SKALICKÁ, JANA PATEROVÁ, EVA VRBKOVÁ, JAROSLAV KVÍČALA**

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
babunekm@vscht.cz*

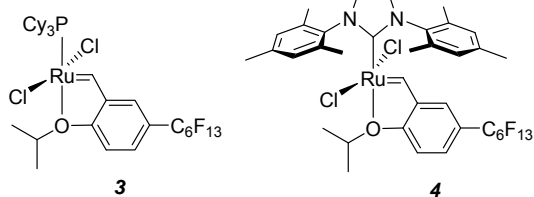


V současné době se zabýváme přípravou fluorových variant Hoveyda-Grubbsova katalyzátoru a jejich aplikacemi v homogenní katalýze.

S cílem získat vhodné katalyzátory 2. generace jsme studovali metody přípravy polyfluorovaných NHC ligandů a jejich komplexace. Klíčový krok pro přípravu NHC ligandů je založen na reakci fluorovaného aminu s glyoxalem. Vzniklý diimin je redukován na diamin a následně transformován na imidazolidiny, které slouží jako prekurzory pro vznik karbenů. Reakce s triethyl-orthoformiátem v kyselém prostředí tak poskytla dihydroimidazolium-chlorid, ze kterého jsme reakcí s  $\text{CHCl}_3$  a KOH připravili klíčový intermediát **1**. Alternativní cesta spočívající v reakci diaminu připraveného z triflátu fluorovaného polyetheru s pentafluorobenzaldehydem vedla ke vzniku pentafluorfenylovaného imidazolidinu **2**. Pomocí NMR spektroskopie jsme studovali transformaci těchto intermediátů na odpovídající NHC ligandy.



Dále jsme se zaměřili na modifikaci spodní části Hoveyda-Grubbsova katalyzátoru zavedením jednoho nebo více fluorovaných řetězců na aromatické jádro isopropoxybenzylidenného ligandu a syntetizovali komplexy **3** a **4**.



Pro katalyzátor **3** jsme pomocí NMR spektroskopie studovali metateze modelových substrátů, a to diethyl diallyl-, allylmethyl-, a dimethylmalonátu při 30 °C v  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  nebo při 70 °C v toluenu- $d_8$ . Zatímco v případě diethyl diallylmalonátu probíhala reakce rychle s 99% konverzí, pro allylmethyl- a dimethylmalonát stabilita fluorovaného katalyzátoru **3** nebyla dostatečná a metateze neproběhla.

Děkujeme GA ČR (grant č. 207/10/1533) a MŠMT (výzkumné centrum LC 06070, výzkumný záměr č. 6046137301) za finanční podporu.

## SYNTEZA 2'-DEOXYRIBO-C-NUKLEOSIDŮ ODVOZENÝCH OD THIOFENU A FURANU

JAN BÁRTA<sup>a</sup>, MICHAL HOCEK<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Ústav organické chemie a biochemie, AVČR, v.v.i., Gilead Sciences & IOCB Research Center, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6  
barta@uochb.cas.cz, hocek@uochb.cas.cz

C-Nukleosidy jsou charakteristické náhradou labilní glykosidické C-N vazby za stabilní a hůře odbourávanou C-C vazbu. Z tohoto plyne jejich využití v rozšíření genetické abecedy<sup>1</sup>. Postupy pro syntézu C-nukleosidů<sup>2</sup> jsou charakteristické nízkým výtěžkem a nízkou anomerní selektivitou. Budou prezentovány nejnovější pokroky ve vývoji modulární metodiky<sup>3</sup> syntézy 2'-deoxyribo-C-nukleosidů odvozených od thiofenu a furanu založené na přípravě bromovaných intermediátů a následných transformačních funkčních skupin vedoucích k sériím derivátů, které byly využity k syntéze nových typů trifosfátů C-nukleosidů.

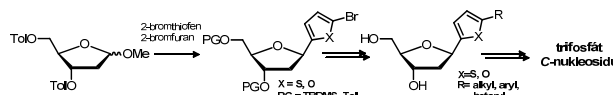


Schéma 1. Obecné schéma přípravy 2'-deoxy-C-nukleosidů a následná transformace na trifosfáty C-nukleosidů.

Tato práce je součástí výzkumného projektu Z4 055 905 a byla podpořena Centrem Biomolekul a komplexních molekulárních systémů (LC512), GA AVČR (IAA400550902) a Gilead Sciences, Inc.

## LITERATURA

- (a) Wang L., Schultz P. G.: Chem. Commun. 2002, 1; (b) Henry A. A., Romesberg F. E.: Curr. Opin. Chem. Biol. 7, 727 (2003); (c) Kool E. T., Morales J. C., Guckian K. M.: Angew. Chem. Int. Ed. 39, 990 (2000); (d) Kool E. T.: Acc. Chem. Res. 35, 936 (2002).
- Wu Q. P., Simons C.: Synthesis 2004, 1533.
- (a) Hocek M., Pohl R., Klepetářová B.: Eur. J. Org. Chem. 2005, 4525; (b) Urban M., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: J. Org. Chem. 71, 7322 (2006); (c) Joubert N., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: J. Org. Chem. 72, 6797 (2007); (d) Bárta J., Pohl R., Klepetářová B., Ernsting N. P., Hocek M.: J. Org. Chem. 73, 3798 (2008); (e) Bárta J., Slavětinská L., Klepetářová B., Hocek M.: Eur. J. Org. Chem. DOI: 10.1002/ejoc.201000726 (v tisku).

## PŘÍPRAVA RŮZNĚ VELKÝCH NANOČÁSTIC OXIDU CERITĚHO PRO BIOMEDICINÁLNÍ POUŽITÍ

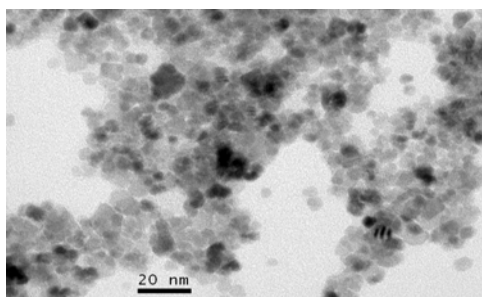
VILÉM BARTUŇEK\*, OLGA SMRČKOVÁ

VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6  
vilem.bartunek@vscht.cz

Redoxní vlastnosti oxidu ceritěho, stejně jako jeho velmi nízká toxicita předurčují tento materiál k použití v biomedicinních aplikacích, zejména kvůli jeho schopnosti interagovat s celou řadou reaktivních radikálů. Tento fakt byl ověřen již přímo *in-vivo* experimenty, například při ochraně očí krys proti degenerativním onemocněním způsobených kumulací různých reaktivních molekul<sup>1</sup>. Léčba založená na tomto poznatku by v budoucnu mohla pomoci zabránit slepotě u miliónů lidí po celém světě. Nebezpečím velmi malých

oxidových nanočástic je možnost jejich proniknutí do buňky, kde mohou agregovat a následná reakce buněčných mechanismů může přivodit smrt buňky<sup>2</sup>. Toto záleží zejména na velikosti nanočástic, zejména proto, že menší nanočástice lépe proniknou buněčnou stěnou a také proto, že jsou supraferomagnetické (jednodomérové), což poté způsobí jejich agregaci. Příliš velké nanočástice zase nemají takový léčebný efekt, který je závislý na ploše nanočástic.

V této práci byly vytvořeny nanočástice kubického oxidu ceriitého o velikosti 1,8 nm, 2,2 nm, 5 nm a 8,9 nm. Velmi jemné agregované krystaly oxidu ceriitého byly šlechtěny za varu ve vodě, DMF a DMSO po dobu 5 hodin. Výsledná velikost odpovídá teplotě varu rozpouštědla. Růst nanočástic je vysvětlován kinetickou teorií. Nanočástice byly charakterizovány pomocí: RTG (Scherrerova formule), HRTEM, IČ, RFA. V současné době se na nich provádějí toxikologické testy a jsou připraveny k biomedicínálním experimentům.



Obr. 1. Vyrobené nanočástic pohledem HRTEM

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 6046137302.

#### LITERATURA

1. Silva G. A.: *Nature Nanotechnol.* 1, 92 (2006).
2. Parka E.-J., Choib J., Parkb Y.-K., Parka K.: *Toxicology* 245, 90 (2008).

#### SYNTÉZA STAVEBNÍCH JEDNOTEK PRO TVORBU SAMOSKLADNÝCH STRUKTUR

##### TEREZA BEDNAŘÍKOVÁ, JINDŘICH JINDŘICH

*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 2030/8, 128 40 Praha 2  
bednarik@natur.cuni.cz, jindrich@natur.cuni.cz*

V poslední době se supramolekulární chemie rozšířila o chemii supramolekulárních polymerů. Zatímco tradiční polymery jsou tvořeny kovalentními vazbami, supramolekulární polymery jsou tvořeny vazbami nekovalentními<sup>1</sup>. V případě supramolekulárních struktur tvořených deriváty cyklodextrinů (CD) je očekávána interakce hostitel – host.

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy skládající se z  $\alpha(1\rightarrow4)$  spojených D-glukopyranosových jednotek.

Významná je především jejich schopnost tvořit inkluzní supramolekulární komplexy s dalšími sloučeninami<sup>2</sup>.

Naše práce je zaměřena na přípravu sady multimerů CD a hostů, obsahujících rigidní jádro s  $C_3$ -symetrií (Schéma). U těchto látek bude studována jejich schopnost tvořit samoskladné struktury.

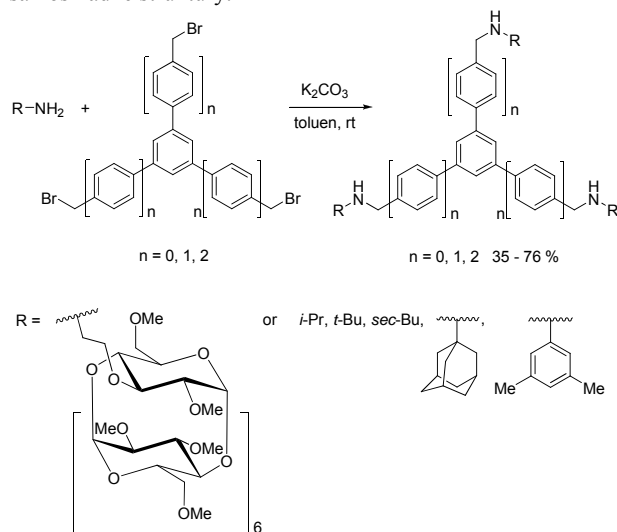


Schéma. Syntéza multimerů CD a hostů

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 62808.

#### LITERATURA

1. Brunsveld L., Folmer B. J. B., Meijer E. W., Sijbesma R. P.: *Chem. Rev.* 101, 4071 (2001).
2. Szejtli J.: *Chem. Rev.* 98, 1743 (1998).

#### TOTÁLNÍ SYNTÉZA (-)-METHOXYESTRONU

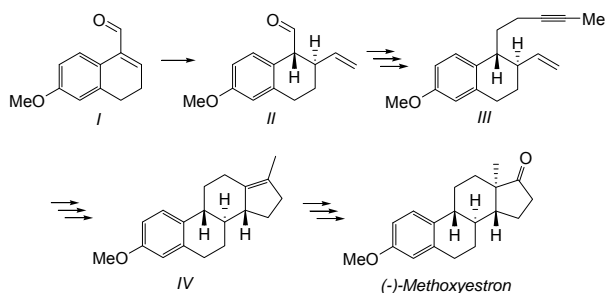
##### ROBERT BETÍK<sup>a</sup>, MARTIN KOTORA<sup>a,b,\*</sup>

*<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
rbetik@seznam.c, kotora@natur.cuni.cz.*

Totální syntézy přírodních látek patří mezi nejzajímavější oblasti organické chemie. V naší skupině se dlouhodobě věnujeme syntéze látek se steroidním skeletem. Nedávno jsme publikovali nové postupy přípravy derivátů 16-ketoestronu založené na cyklizačních reakcích zprostředkovaných  $Cp_2ZrBu_2$  a  $Co(CO)_8$  (cit. <sup>1,2,4</sup>). Tato metodika umožnila rovněž diastereo selektivní formální totální syntézu methoxyestronu<sup>3,4</sup>. Naším dalším cílem bylo vyvinout enantioselektivní syntézu této přírodní látky.

Klíčovou reakcí nového enantioselektivního přístupu byla asymetrická konjugovaná adice vinylmagnesium bromidu na chirální aldímín vzniklý reakcí aldehydu *I* s *tert*-butyl esterem *L-tert*-leucínu, která poskytla opticky čistý vinylaldehyd *II* (ee > 98 %) <sup>3</sup>. Ten byl dále převeden na enyn *III* bez ztráty optické čistoty. Pausonova-Khandova reakce následovaná

chemoselektivní redukcí ketoskupiny poskytla<sup>4</sup> známý tetracyklický derivát *IV*. Epoxidace dvojné vazby a následný přesmyk vzniklého epoxidu v přítomnosti Lewisovy kyseliny poskytl kýžený (-)-methoxyestron. Celkově byla tato látka připravena v 10 krocích z komerčně dostupných látek s celkovým výtěžkem 4 %.



Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 1M0508.

#### LITERATURA

- Herrmann P., Kotora M., Buděšinský M., Šaman D., Císařová I.: *Org. Lett.* 8, 1315 (2006).
- Herrmann P., Buděšinský M., Kotora M.: *Chem. Lett.* 36, 1268 (2007).
- Herrmann P., Buděšinský M., Kotora M.: *J. Org. Chem.* 73, 6202 (2008).
- Betik R., Herrmann P., Kotora M.: *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 646.
- Kogen H., Tomioka K., Hashimoto S., Koga K.: *Tetrahedron Lett.* 21, 4005 (1980).
- Barlett P. A., Johnson W. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 7501 (1973).

#### SYNTEZA ELEKTRONOVĚ BOHATÝCH THIAMAKROCYKLŮ

**MICHAL BUCHTA<sup>a,b</sup>, JANA HODAČOVÁ<sup>a,b</sup>, JIŘÍ RYBÁČEK<sup>b</sup>, IVANA CÍSAŘOVÁ<sup>c</sup>, PETR HOLÝ<sup>a,b</sup>**

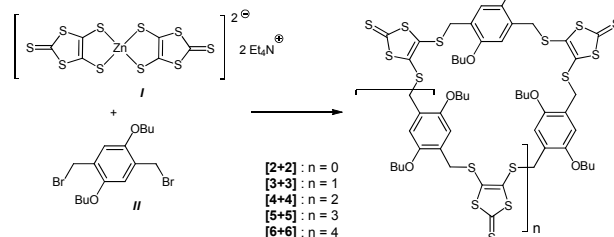
<sup>a</sup>Ústav organické chemie VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6;

<sup>b</sup>ÚOCHB AV ČR vv., 166 10 Praha 6; <sup>c</sup>Ústav anorganické chemie, Univerzita Karlova v Praze, 128 43 Praha 2

\*petrholy@uochb.cas.cz

Postupnou výstavbou ze dvou typů stavebních bloků, a to z 1,4-bis(brommethyl)benzenu nebo jeho dibutoxylovaného analogu a z 4,5-bis(2-kyanoethylsulfanyl)-1,3-dithiol-2-thionu byly připraveny sírné makrocykly ze [4+4] stavebních jednotek. Elektron-donorové vlastnosti těchto makrocyklů a jejich schopnost formovat vnitřní dutinu o velikosti 10 Å vytvářely vhodné podmínky pro komplexaci rozměrných elektronově deficitních systémů jako například fullerenu C<sub>60</sub>. Vícetupňová syntéza, založená na postupném odchránění thiolových skupin<sup>1</sup> a jejich následné alkylaci, vedla sice jednoznačně k cílové struktuře makrocyklu, ale byla velmi pracná a málo produktivní.

Proto jsme hledali jednodušší přístup k těmto cyklickým strukturám. Zvolili jsme přímou reakci komplexní zinečnaté soli<sup>2</sup> *I* s 1,4-bis(brommethyl)-2,5-dibutoxybenzenem *II*. Ze vzniklé směsi se pečlivou chromatografií podařilo oddělit oligomerní acyklické produkty a izolovat členy série makrocyklů s velikostí od [2+2] až po [6+6] stavebních jednotek. Jednotlivé makrocykly byly tímto způsobem získány v čistém stavu a vzhledem k jednoduchosti syntetického přístupu i v uspokojivých výtěžcích.



Tato práce vznikla v rámci výzkumného záměru ZA 055 0506 a za finanční podpory GA AV ČR (grant IAA400550704).

#### LITERATURA

- Simonsen K. B., Svenstrup N., Lau J., Simonsen O., Mørk P., Kristensen G. J., Becher J.: *Synthesis* 1996, 407.
- Wang C., Batsanov S. A., Bryce M. R., Howard K. A. J.: *Synthesis* 1998, 1615.

#### NOVÉ CHIRÁLNÍ HYBRIDNÍ ORGANICKO-ANORGANICKÉ MATERIÁLY

**KRISTÝNA BÜRGLOVÁ<sup>a,b</sup>, JANA HODAČOVÁ<sup>a</sup>, MICHEL WONG CHI MAN<sup>b</sup>, XAVIER CATTOEN<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28

Praha, <sup>b</sup>Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, 8 rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier Cedex 5

Kristyna.burglova@vscht.cz

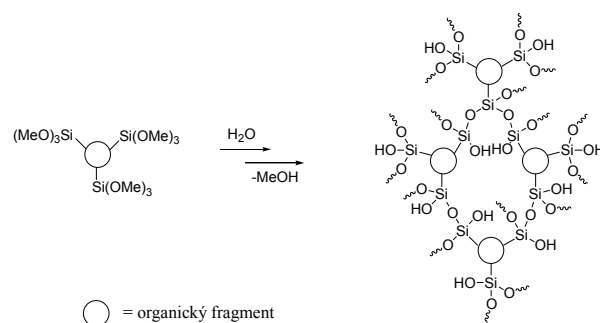


Schéma 1. Vznik hybridních polysilicovoxanů

Hybridní organicko-anorganické materiály jsou látky obsahující organickou a anorganickou složku nesoucí vlastnosti odvozené od obou komponent. V poslední době značnou pozornost přitahují silicovoxanové hybridní materiály, které

se vyznačují specifickými vlastnostmi (optické, elektrické, elektrochemické atd). Velmi zajímavou cestou k získání silseskvioxanových sítí je hydrolytická kondenzace sol-gel organických molekul nesoucích trialkoxysilyl substituenty připojené nehydrolyzovatelnou Si-C vazbou (Schéma 1)<sup>1,2</sup>. Struktura je kontrolována organickým fragmentem, který řídí samoorganizaci anorganické fáze.

Současným zájmem chemiků je připravit chirální hybridní materiály využitelné v heterogenní enantioselektivní katalýze. Bude prezentována příprava takovýchto nových chirálních materiálů na bázi derivátů 1,1'-binaftalen-2,2'-diolu a kyseliny vinné a studium jejich vlastností.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21/2010) a Francouzskou ambasádou v České republice.

#### LITERATURA

1. Moreau J. J., Wong Chi Man M.: *Coord. Chem. Rev.* 1998, 1073.
2. Moreau J. J., Vellutini L., Wong Chi Man M., Bied C.: *J. Am. Chem. Soc.* 123, 1509 (2001).

#### ANTIOXIDANTS OF STRAWBERRY, RASPBERRY AND BLACKBERRY LEAVES

**LUCIE BUŘIČOVÁ<sup>a,b</sup>, ZUZANA RÉBLOVÁ<sup>a</sup>, ONDŘEJ JURČEK<sup>b,c,d</sup>, ERKKI KOLEHMAINEN<sup>c</sup>, FRANTIŠEK KVASNÍČKA<sup>e</sup>**

<sup>a</sup>Dept Food Chem. Anal., ICT Prague, 166 28 Prague; <sup>b</sup>Inst. Exper. Botany, AS CR, 14220 Prague 4; <sup>c</sup>Dept Chem., University of Jyväskylä, P.O.Box 35, FI-40014, Finland; <sup>d</sup>Dept Chem. Nat. Comp., ICT Prague, 16028 Prague 6; <sup>e</sup>Dept Food Preserv. Meat Technol., ICT Prague, 166 28 Prague lucie.buricova@vscht.cz

In the previous study comparing the antioxidant capacities of Czech medicinal plants, leaves of strawberry (*Fragaria vesca* L.), blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) belong to the most efficient tested plants<sup>1</sup>. Therefore, for the evaluation of the possible effect of these plants *in vivo*, the compounds responsible for the antioxidant capacity of their water extracts were studied using HPLC-RP with amperometric detection and other methods in the present study.

For the first time (-)-epicatechin, (+)-catechin, and procyanidin B1 were detected in raspberry leaves and all these compounds together with epicatechingallate in blackberry leaves. The identity of (+)-catechin in strawberry leaves, identified previously in this plant by HPLC-DAD only<sup>2</sup>, was confirmed using MS and NMR analyses after isolation and by chiral electrophoresis.

From the studied compounds (i.e. gallic acid, rutin, ellagic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, quercetin, kaempferol, myricetin, quercetin-3-D-glucoside, ascorbic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, epicatechingallate, epigallocatechin and procyanidin B1) (+)-catechin, ellagic acid and

(-)-epicatechin significantly participated on the antioxidant capacity of leaves water extracts of all studied plants.

The presence of these biologically active molecules suggests that the water extracts of the studied plants may be promising even *in vivo* from the antioxidant point of view. Therefore, the leaves of strawberry, blackberry and raspberry can be considered to be good sources of antioxidants with a potential direct consumption as various kinds of beverages or as extracts of antioxidants to increase the nutritional value of different foods and diets.

Supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Projects No. MSM 6046137305 and 2B06024) and by specific university research (MSMT no. 21/2010).

#### REFERENCES

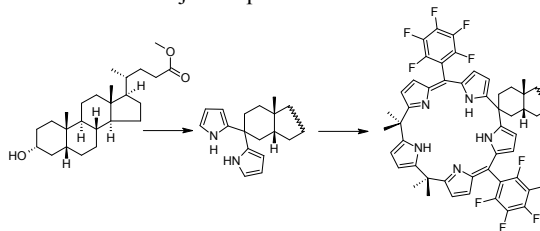
1. Buřičová L., Réblová Z.: *Czech J. Food Sci.* 26, 132 (2008).
2. Mudnic I., Modun D., Brizic I., Vukovic J., Generalic I., Katalinic V., Bilusic T., Ljubenkovic I., Boban M.: *Phytomedicine* 16, 462 (2009).

#### PYRROLOVÉ MAKROCYKLY SE STERODNÍMI SUBSTITUENTY

**LENKA CARDOVÁ, PAVEL DRAŠAR**

VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Cardova.lenka@gmail.com

Připravené látky se skládají ze dvou stavebních kamenů, z nichž každý má své charakteristické vlastnosti a využití. Steroidní složky se stále více uplatňují ve farmakologii, supramolekulární chemii a dokonce i v nanotechnologiích<sup>1</sup>. V případě pyrrolových makrocyklů se jejich využití odvíjí od toho, zda se jedná o kalixpyrroly, aromatické porfyriny nebo o jejich „křížence“ tzv. kalixfyriny. Aniontové rozpoznávání<sup>2</sup>, fotodynamická terapie<sup>3</sup> nebo signalizační část senzorů<sup>4</sup> jsou jen některé z aplikací. U připravených látek se očekává, že se obě části budou navzájem doplňovat.



Látky byly připraveny reakcí pyrrolu a odpovídajícího aldehydu či ketonu za kyselých katalýz (s výjimkou reakce tripyromethanu s benzaldehydem, protože se v kyselém prostředí rozkládá na dipyromethan). Výsledné látky byly charakterizovány <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H NMR a MS.

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT MSM6046137305, 2B06024 (SUPRAFYT) a IGA VŠCHT A1\_FPBT\_2010\_005.

## LITERATURA

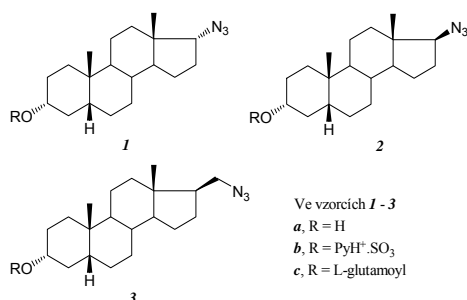
1. Virtanen E., Kolehmainen E.: *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 3385.
2. Sessler J.L., Camiolo S., Gale P.A.: *Coord. Chem. Rev.* 240, 17 (2003).
3. Swamy N., James D. A., Scott M. C., Hanson R. N., Ray R.: *Bioorg. Med. Chem.* 10, 3237 (2002).
4. Dukh M., Šaman D., Lang K., Pouzar V., Černý I., Drašar P., Král V.: *Org. Biomol. Chem.* 1, 3458 (2003).

## SYNTEZA AZIDOANALOG NEUROAKTIVNÍCH STEROIDŮ

**IVAN ČERNÝ, MILOŠ BUDEŠÍNSKÝ, VLADIMÍR POUZAR, HANA CHODOUNSKÁ**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,  
Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6  
cerny@uochb.cas.cz

V souvislosti s návaznými syntetickými a fotoafinitními studii bylo třeba vypracovat přípravy steroidních azido-derivátů, u nichž azidoskupina nahrazuje methylketonový pobočný řetězec charakteristický pro neurosteroidy pregnanolonového typu. Volba padla na 5 $\beta$ -androstanové **1**–**2** a 21-nor-5 $\beta$ -pregnanové deriváty **3** s azidoskupinou v poloze 17, resp. 20. Byly porovnány přístupy využívající nukleofilní substituce příslušných tosylátů<sup>1,2</sup> a přístupy využívající Mitsunobuovy reakce<sup>3</sup>. Z cílových azidů **1a**–**3a** byly připraveny konjugáty pro studie na NMDA receptorech, jako nejvhodnější se ukázaly sulfáty **1b**–**3b** nebo L-glutamát **1c**.



Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR projekt LC 06077 a v rámci výzkumného projektu AV ČR Z4 055 0506.

## LITERATURA

1. Glaser R., Gabbay E. J.: *J. Org. Chem.* 35, 2907 (1970).
2. Merlani M. I., Amiranashvili L. S., Mulkidzhanyan K. G., Shelar A. R., Manvi F. V.: *Chem. Nat. Comp.* 44, 618 (2008).
3. Loibner H., Zbiral E.: *Helv. Chim. Acta* 60, 417 (1977).

VYUŽITÍ [2+2] CYKLOADICE PRO PŘÍPRAVU DIKATIONICKÝCH OLIGO-*p*-FENYLENŮ

**MARTINA ČÍŽKOVÁ<sup>a,b</sup>, IVANA CÍSAŘOVÁ<sup>b</sup>, DAVID ŠAMAN<sup>a</sup>, FILIP TEPLÝ<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>UOCHB AVČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6;  
<sup>b</sup>PřF UK, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2  
 cizkova@uochb.cas.cz

Oligo- a poly-*p*-fenyleny jsou zajímavou skupinou látek, která v posledních letech přitahuje pozornost. Například kombinací s vhodnými příměsmi lze připravit materiály jejichž hodnoty vodivosti jsou srovnatelné s kovy<sup>1</sup>. Byly využity také jako aktivní složka v LED diodách<sup>2</sup>.

Zajímavým syntetickým přístupem k těmto látkám je [2+2] cykloadice, která byla použita pro přípravu neutrálních oligo-*p*-fenylenů<sup>3</sup>.

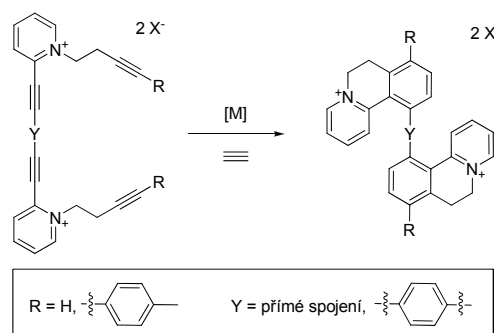


Schéma 1. [2+2] Cykloadice tetraynů s plynným acetylenem

Vyvinuli jsme modulární tříkrokovou syntézu kladně nabitých oligo-*p*-fenylenů pomocí dvojnásobné [2+2] cykloadice s plynným acetylenem (schéma 1).

Tato studie otevírá cestu i k vyšším kladně nabitým oligo-*p*-fenylenům při použití jiných, komerčně dostupných stavebních bloků. Navržená strategie dále umožní ladit optické i elektronové vlastnosti těchto látek.

Tato práce vznikla za podpory grantu UOCHB Z4 055 0506 a GAČR 203/09/1614.

## LITERATURA

1. (a) Tour J. M.: *Adv. Mater* 6, 190 (1994); (b) Kovacic P., Jones M. B.: *Chem. Rev.* 87, 357 (1987).
2. Hide F., Diaz-García M. A., Schwartz B. J., Heeger A. J.: *Acc. Chem. Res.* 30, 430 (1997).
3. (a) McDonald F. E., Smolentsev V.: *Org. Lett.* 4, 745 (2002); (b) Tanaka K., Suda T., Noguchi K., Hirano M.: *J. Org. Chem.* 72, 2243 (2007); (c) Shibata T., Tsuchikama K.: *Org. Biomol. Chem.* 6, 1317 (2008).

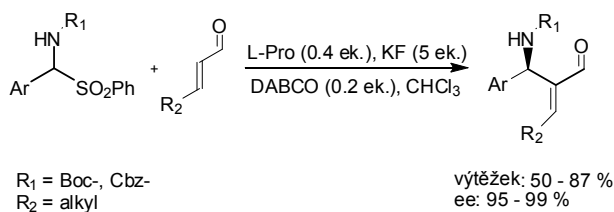
## VYSOCE ENANTIOSELEKTIVNÍ ORGANOKATALYTICKÁ SYNTÉZA β-AMINOKARBONYLOVÝCH SLOUČENIN

**SYLVA ČÍHALOVÁ, JAN VESELÝ**

*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta  
Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2  
scihalova@centrum.cz, jxvesely@post.cz*

Cílem moderní organické syntézy je efektivní příprava komplikovaných struktur, případně stavebních bloků komplexních molekul z jednoduchých a snadno dostupných výchozích látek. Zájem přitahuje obzvláště syntéza enantiomerně čistých substancí a postupy vedoucí k jejich získání.

Naše práce<sup>1</sup> je zaměřena na přípravu vysoce enantiomerně obohacených β-aminosloúčenin obsahujících α-alkylidenovou skupinu pomocí aza-Baylisovy-Hillmanovy reakce<sup>2</sup>. Pro tuto transformaci byly použity *N*-Boc- a *N*-Cbz sulfony jako stabilní prekurzory vysoce reaktivních iminů, které byly v reakci s α,β-nenasycenými aldehydy generovány *in situ* pomocí KF. Za využití katalýzy sekundárním aminem (*L*-prolin) se podařilo připravit řadu enantiomerně čistých β-aminokarbonylových sloučenin obsahujících α-alkylidenovou skupinu potenciálně využitelných pro přípravu biologicky aktivních látek, což bude též blíže diskutováno v tomto příspěvku.



*Tato práce vznikla za podpory grantů MSM002160857, GAČR (203/09/P193), GAUK 2009/93109.*

### LITERATURA

1. Čihalova S., Remes M., Cisarova I., Vesely J.: Eur. J. Org. Chem. 2009, 6277.
2. Shi M., Xu Y.-M.: Angew. Chem. Int. Ed. 41, 4507 (2002); (b) Basaviah D., Rao A. J., Satyanarayana T.: Chem. Rev. 103, 811 (2003).

## SYNTÉZA FLUOROSENZORU NA BÁZI KŘEMENNÝCH NANOČÁSTIC MODIFIKOVANÝCH CYKLODEXTRINEM

**MARTIN DIVÍŠ<sup>a\*</sup>, IVAN JELÍNEK<sup>a</sup>, JURAJ DIAN<sup>b</sup>,  
JINDŘICH JINDŘICH<sup>c</sup>, OTTO S. WOLFBEIS<sup>d</sup>**

<sup>a</sup>Katedra analytické chemie, PŘF UK, 128 40 Praha 2;

<sup>b</sup>Katedra chemické fyziky a optoelektroniky, MFF UK; 121 16 Praha 2; <sup>c</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PŘF UK,

128 40, Praha 2; <sup>d</sup>Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg  
bitik@centrum.cz

Křemenné nanočástice<sup>1</sup> jsou jedním z mnoha materiálů používaných při konstrukci chemosenzorů. Jejich výhodou je nízká cena a dobrá dostupnost v širokém spektru velikostí. Jsou biokompatibilní a jejich povrch je chemicky velice dobře modifikovatelný.

Cykloextriny<sup>2</sup> jsou cyklické oligosacharidy ve tvaru komolého kužele skavitou uvnitř. Díky hydrofobním vlastnostem kavity jsou schopné tvořit ve vodných roztocích stabilní inkluzní komplexy s různými organickými látkami.

Barvivo BODIPY<sup>3</sup> (boradiazaindacene) se velmi často používá pro biologické značkování (náhrada za fluorescein). Je velice dobře modifikovatelné, má výbornou tepelnou a fotochemickou stabilitu a vysoký kvantový výtěžek.

Cílem projektu je příprava strukturně selektivního optického senzoru pro detekci aromatických sloučenin v plynné a kapalně fázi.

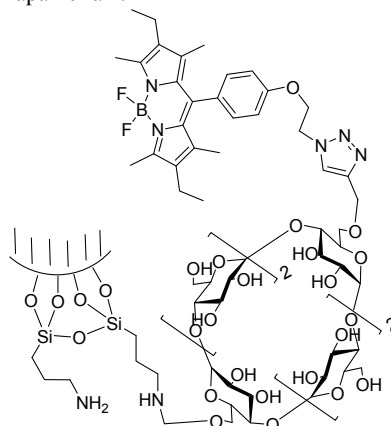


Schéma 1. Návrh struktury molekulárního selektoru ukotveného na křemennou nanočástici

*Tento projekt je podporován výzkumným záměrem MSM0021620857.*

### LITERATURA

1. Slowing I. I., Vivero-Escoto J. L., Trewyn B. G., Lin V. S.-Y.: J. Mater. Chem. 20, 7924 (2010).
2. Szejtli J.: Chem. Rev. 98, 1743 (1998).
3. Ulrich G., Ziessel R., Harriman A.: Angew. Chem. Int. Ed. 47, 1184 (2008).

## DETECTION OF VOLATILE CHLORINATED HYDROCARBONS BY CRYFOCUSING GC-ECD SYSTEM

**SÁNDOR T. FORCZEK<sup>a\*</sup>, JANA DOLEŽALOVÁ<sup>a,b</sup>,  
ZDENĚK WIMMER<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Institute of Experimental Botany, AS CR, Videňská 1083, 142 20 Prague; <sup>b</sup>Institute of Chemical Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague

alex067@biomed.cas.cz

Chlorine is one of the most abundant elements in nature, which undergoes a complex biogeochemical cycle. Chlorine bound in some substances is partly responsible for atmospheric ozone depletion. As due to international regulations anthropogenic burden of volatile chlorinated hydrocarbons (VCH) in atmosphere decreases, natural sources became significant. VCH are emitted into the atmosphere due to various natural sources. Known abiotic sources are coastal salt marshes emitting methyl chloroform, chloroform, methyl bromide and tetrachloromethane<sup>1</sup>; volcanoes, hydro-thermal sources, and salt mines are found to emit chloroform<sup>2</sup>. Temperate forest soils with a humic top layer are emitting chloroform, 1,1,1-trichloroethane, tetrachloromethane, tetrachloroethene, bromoform and bromodichloromethane<sup>2</sup>.

The known biotic sources are soil organisms and plants. VCH from the atmosphere are taken up and further metabolized, as an example see the formation of trichloroacetic acid from tetrachloroethene in spruce chloroplasts<sup>3</sup>. Many volatile and stable chlorinated compounds are produced as secondary plant metabolites and eventually emitted into the atmosphere. Methyl chloride and bromide are emitted from (sub)tropical ferns<sup>4</sup>, chloroform, tetrachloromethane and 1,1,1-trichloroethane emissions are determined from temperate forest fern and moss<sup>5</sup>.

The aim of this work was to confirm the formation and identify the formed VCH by forest soil or common forest plant species. VCH are measured by cryofocusing from headspace followed by GC-ECD detection.

*The financial support of the Grant Agency of the Czech Republic (522/09/P394) and the MŠMT (2B06024) is gratefully acknowledged.*

## REFERENCES

1. Rhew R.C., Miller B.R., Weiss R. F.: *Nature* 403, 292 (2000).
2. Hoekstra E.J., de Leer E.W.B., Brinkman U.A.T.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 3724 (1998).
3. Forczek S.T., Schröder P., Weissflog L., Krueger G., Rohlenová J., Matucha M.: *Biol. Plantarum* 52, 177 (2008).
4. Saito T., Yokouchi Y.: *Atmos. Environ.* 40, 2806 (2006).
5. Laturmus F., Matucha M.: *J. Environ. Radioactiv.* 99, 119 (2008).

## POLYKATIONICKÉ TRANSPORTNÍ SYSTÉMY PRO NEGATIVNĚ NABITÉ MOLEKULY

**LUKÁŠ DRAŠAR, MIROSLAV LEDVINA,  
ZINA KORVASOVÁ, JAROSLAV TURÁNEK**

*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
drasar@gmail.com*

Současný pokrok v genové terapii a vakcinaci patrně zásadně změnil v nastávajícím desetiletí charakter terapeutických postupů. Jedním z limitujících faktorů pro úspěšnou aplikaci těchto nových léčebných postupů v klinické praxi je účinnost zavedení negativně nabitých fragmentů nukleových kyselin do cílové buňky a k jejímu jádru, tj. tzv. transfekce. Stejný problém nastává i případě antivirotik a antineoplastik odvozených od nukleotidů a oligonukleotidů (analogy nukleotidů a siRNA). Proto je v současnosti věnována značná pozornost hledání vhodných nosičů, tzv. vektorů<sup>1,2</sup>. Dosud užívané virální vektory jsou sice velice efektivní<sup>3</sup>, ale jejich terapeutické využití je limitováno vzhledem k těžko předvídatelné imunitní reakci a vysokému riziku<sup>4,5</sup> pro pacienty. Proto se v současné době vyvíjejí nevirální vektory, které jsou založeny na polykationických samoskladných lipidních strukturách.

Cílem práce je příprava polykationických lipopolyaminů glykolipidů D-hexaosaminového typu jako kompozit pro konstrukci výše uvedených samoskladných lipidních struktur. Jedná se o skupinu lipopolyaminů sperminového typu, glykolipidů hexosaminového typu s řízenou hydrofobicitou lipidového zbytku a odstupňovanou hydrofobicitou resp. hydrofilitou raménka nesoucího polykationickou část molekuly. Pro výstavbu oligosacharidového řetězce byla zvolena takzvaná troc-glykosylační metoda. Aminoskupina je chráněna 2,2,2-trichloroethoxykarbonylovou skupinou, která umožňuje provést glykosylační proces s vysokou stereoselektivitou jako 1,2-trans glykosylaci a je ve srovnání s běžně užívanou ftalimidovou skupinou snadno odstranitelná.

*Tento výzkum je podporován dvěma komplexními grantovými "Nanotechnologie pro společnost" (KAN200520703 a KAN200100801) a výzkumným záměrem Z4 055 0506.*

## LITERATURA

1. Kirby A.J., Camilleri P., Engberts J.B.F.N., Feiters M.C., Nolte R.J.M., Soderman O., Bergsma M., Bell P.C., Fielden M.L., Rodriguez C.L.G., Guedat P., Kremer A., McGregor C., Perrin C., Ronsin G., van Eijk M.C.P.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 42, 1448 (2003).
2. LabatMoleur F., Steffan A.M., Brisson C., Perron H., Feugeas O., Furstenberger P., Oberling F., Brambilla E., Behr J.P.: *Gene Ther.* 3, 1010 (1996).
3. Miller A.D.: *Nature* 357, 455 (1992).
4. Lehrman S.: *Nature* 401, 517 (1999).
5. Pearson H.: *Nature* 413, 9 (2001).

## VÝVOJ GENERICKÝCH API: SYNTÉZA (-)-EZETIMIBU

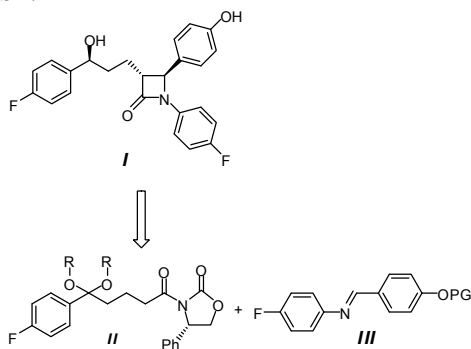
**JOSEF HÁJÍČEK**

*Zentiva, k.s., U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10  
Josef.Hajicek@zentiva.cz*

Vývoj originálních léčivých přípravků a tudíž i nových účinných látek (API) je stále nákladnější. Navíc se stává, že vývoj je v pokročilém stadiu zastaven z důvodu odhalení

ne přijatelných efektů. To samozřejmě značně prodražuje vývoj. K tomu, aby proces vývoje nových přípravků mohl fungovat, je nezbytné, aby se výrobci s jistotou vrátili vynaložené prostředky. K tomu slouží různé nástroje, z nichž nejvýznamnější je patentová ochrana. Po jejím vypršení se přípravek/účinná látka stává generikem. Vývojem generik se zabývají generické firmy v předstihu tak, aby byly schopny uvést svůj lék na trh ihned po vypršení ochrany. Z pochopitelných důvodů chemický vývoj účinných látek předchází vývoji lékových forem. Včasnost a patentová ochrana získaných výsledků je základním předpokladem úspěchu i v silně konkurenčním prostředí generického průmyslu.

Situaci v generickém vývoji látek si ukážeme na příkladu (-)-ezetimibu, chemicky (3*R*,4*S*)-1-(4-fluorfenyl)-3-[(3*S*)-3-(4-fluorfenyl)-3-hydroxypropyl]-4-(4-hydroxyfenyl)azetidín-2-on, sloučeniny se třemi chirálními centry, která je v lékové formě přítomna ve formě čistého enantiomeru vzorce **I**. Originální přípravek je významným hypolipidemikem s novým mechanismem působení. Je prodáván firmami Schering-Plough a Merck jednak samotný (Zetia<sup>TM</sup>) jednak v kombinaci se simvastatinem (Vytorin<sup>TM</sup>). Jejich prodeje v r. 2007 dosáhly 2,4 respektive 2,8 mld. USD a klesly v r. 2009 na 1,13 a 1,0 mld. USD.



Naše syntéza (-)-ezetimibu vychází z komerčně dostupných výchozích látek. V reakci na patentovou situaci jsme postupně vyvinuli<sup>1-3</sup> několik variant postupu, který je založen na asymetrické adici titanového enolátu sloučeniny vzorce **II** na *O*-chráněný imin **III** (viz schéma), a zahrnuje rovněž boranovou redukci ketonu s využitím Coreyho-Bakshiho-Shibatova protokolu. Budou diskutovány detaily syntetických postupů a rovněž úspěšná validace procesu.

#### LITERATURA

1. Slavíková M., Velišek P., Obadalová I., Hájíček J.: PCT Intl. Patent Appl. Publ. WO 2008106900, 12 September 2008.
2. Štěpánková H., Hájíček J., Slavíková M., Zezula J.: PCT Intl. Patent Appl. Publ. WO 2009067960, 4 June 2009.
3. Štěpánková H., Hájíček J., Slavíková M., Zezula J.: PCT Intl. Patent Appl. Publ. WO 2009106021, 3 September 2009.

## PŘESMYKY HETEROCYKlickÝCH SLOUČENIN OBSAHUJÍCÍCH ISOTHIURONIOVOU SKUPINU

JIRÍ HANUSEK\*, JIRÍ VÁŇA, MILOŠ SEDLÁK

Univerzita Pardubice, FCHT, Ústav organické chemie a technologie, Studentská 573, 532 10 Pardubice  
Jiri.Hanusek@upce.cz

Syntézu heterocyklických sloučenin lze v zásadě provádět dvěma metodickými postupy. První, klasická metodika, spočívá v konstrukci heterocyklického skeletu buď intramolekulárními nebo cykloadičními reakcemi, kdežto druhá spočívá v přesmyku již existujícího heterocyklu na heterocyklus jiný. Přitom může, ale nemusí být zachována velikost cyklu resp. počet a druh heteroatomů. Tento nový přístup k syntéze heterocyklických sloučenin doznal v posledních několika letech velkého rozvoje. Přesmyky heterocyklů se tradičně rozdělují do čtyř základních skupin na:

1) *Klasické přesmyky* – velikost kruhu se nemění, mění se pozice, druh a eventuálně i počet jednotlivých heteroatomů.

2) *Degenerované přesmyky* – velikost kruhu, druh i pozice heteroatomů je zachována; dochází ke změně substituentu resp. jejich pozice a to mechanismem, při němž dochází k dočasnému otevření kruhu a jeho následnému uzavření.

3) *Expanze a kontrakce kruhu* – velikost kruhu se zvětšuje resp. zmenšuje, přičemž počet, druh a pozice heteroatomů se rovněž může měnit.

4) *Pseudotransformace kruhu* (také transformace kruh-postranní řetězec) – při těchto transformacích se z postranního řetězce vytváří nový heterocyklus, kdežto původní heterocyklus se následně rozpadá. Reakce tak často probíhá přes bicyklický resp. spirocyklický intermediát nebo alespoň tranzitní stav. Podmínkou je, že v novém heterocyklu je inkorporována méně než polovina heteroatomů původně přítomných ve výchozím heterocyklu.

Přesmyky heterocyklů často poskytují nové molekuly, které jsou zajímavé jak z hlediska syntetického, tak i teoretického. Takové procesy představují neobvyklé syntetické cesty vedoucí k heterocyklickým sloučeninám, které by jinak byly připraveny jen obtížně anebo vůbec.

Na našem pracovišti jsme se v nedávné minulosti<sup>1-5</sup> zabývali studiem struktury a reaktivity *S*-(1-fenylpyrrolidin-2-on-3-yl)isothiuroniových solí **1**, které se ve slabě bazickém prostředí přesmykují na odpovídající 1,3-thiazolidin-4-ony **2** (Schéma 1).

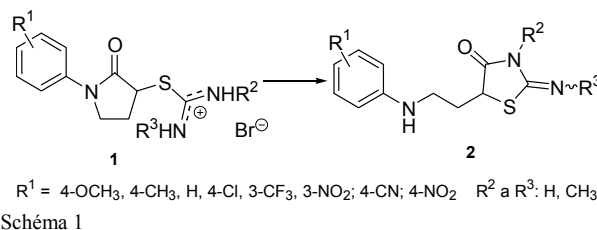


Schéma 1

Bylo zjištěno, že uvedené transformace jsou obecně acidobazicky katalyzované a probíhají za velmi mírných



podmínek – například i při fyziologických hodnotách pH. To má význam jak pro syntézu těchto látek, tak i pro jejich potenciální využití, protože thiazolidinový cyklus, který je společným strukturálním rysem vznikajících produktů, je významným farmakoforem.

V poslední době<sup>6,7</sup> jsme se začali zabývat kinetikou a mechanismem přesmyku analogických *S*-(2-oxotetrahydrofuran-3-yl)-*N*-(4-subst.fenyl)isothiuronium-bromidů **3**, u nichž je laktamový kruh nahrazen laktanovým. Vznik odpovídajících 5-(2-hydroxyethyl)-2-[(4-subst.fenyl)imino]-1,3-thiazolidin-4-onů **4** byl opět studován ve vodných roztocích pufrů, avšak zde v podstatně větším intervalu pH 2-9.

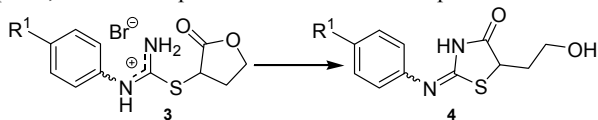


Schéma 2

Opakující se zlomy v měřeném pH profilu prokazují přítomnost tří různých kineticky detekovatelných intermediátů  $T^{\pm}$ ,  $T^0$  a  $T^-$ , jejichž rychlost tvorby a rozpadu na produkt jsou závislé na pH. Výchozí isothiuroniová sůl **3** ( $pK_a = 6,7$  pro  $R_1$   $OCH_3$ ) poskytuje reakci s bazí reaktivní isothiomočovinu, která podléhá cyklizaci za vzniku zwitterionového intermediátu  $T^{\pm}$  (rychlost určující stupeň při  $pH < 2$ ). Intermediát  $T^{\pm}$  se pak obecně kyselé katalyzovaně rozpadá spřaženým mechanismem na produkt (r.u.s. při  $pH$  2-3), anebo se za účasti molekuly vody přesmykuje na neutrální intermediát  $T^0$ , který se opět obecně kyselé katalyzovaně rozpadá na produkt (r.u.s. při  $pH$  3-6). Poslední reakční cesta zahrnuje tvorbu aniontového intermediátu  $T^-$  buď z  $T^{\pm}$  anebo z  $T^0$  (při  $pH > 6$ ). První možnost zahrnující reakci  $T^{\pm}$  přes  $T^-$  na **4** se zdá být pravděpodobnější, protože je v souladu s kinetickým chováním v bazických aminových pufrách, v nichž se nelineární nárůst pozorované rychlostní konstanty s celkovou koncentrací pufru mění na lineární (otevírá se obecně bazicky katalyzovaná cesta). Koexistence všech tří intermediátů je velice zřídka, a je možná jen díky jejich relativně zvýšené stabilitě.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 002 162 7501.

#### LITERATURA

- Sedlák M., Hejtmánková L., Hanusek J., Macháček V.: J. Heterocycl. Chem. 39, 1105 (2002).
- Sedlák M., Hanusek J., Hejtmánková L., Kašparová P.: Org. Biomol. Chem. 1, 1204 (2003).
- Hanusek J., Hejtmánková L., Štěrbá V., Sedlák M.: Org. Biomol. Chem. 2, 1756 (2004).
- Hanusek J., Sedlák M., Drabina P., Růžička A.: Acta Crystallogr., Sect. E 65, o411 (2009).
- Hanusek J., Sedlák M., Drabina P., Růžička A.: Acta Crystallogr., Sect. E 65, o413 (2009).
- Váňa J., Hanusek J., Růžička A., Sedlák M.: J. Heterocycl. Chem. 46, 635 (2009).
- Váňa J., Sedlák M., Hanusek J.: J. Org. Chem. 75, 3729 (2010).

## DERIVÁTY GLYKOLURILŮ PRO PŘÍPRAVU MAKROCYKLICKÝCH SLOUČENIN

VÁCLAV HAVEL, VLADIMÍR ŠINDELÁŘ

Ústav chemie, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno  
sindelar@chemi.muni.cz

Glykoluril je jednoduchá bicyclická sloučenina vznikající kondenzací glyoxalu a močoviny za kyselé katalýzy. Protože je tato sloučenina vhodná pro přípravu makromolekul schopných supramolekulárních interakcí<sup>1</sup>, byly možnosti syntézy jejich derivátů podrobně studovány. Tato práce se zaměřuje na selektivní přípravu 2,4-disubstituovaných glykolurilů, které by se mohly stát základními stavebními bloky zajímavých makromolekul. Jejich syntéza vychází z dihydroxyimidazolidinonu a *N,N'*-disubstituovaných močoviny<sup>2</sup> (Schéma 1). V této práci také demonstrujeme použití připravených derivátů glykolurily pro syntézu supramolekulárních hostitelských molekul, jako jsou molekulární klipsy a makrocyclické kavitandy. Významný vliv na výsledné složení reakční směsi mají podmínky reakce. Bylo zjištěno, že ačkoliv je glykolurilový skelet velmi stabilní, může u jeho derivátu docházet k eliminaci močoviny a vzniku substituovaného hydantoinu.

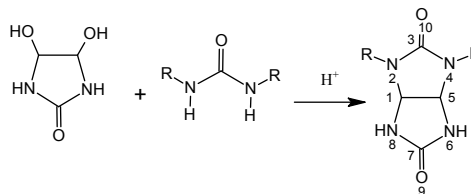


Schéma 1. Příprava 2,4-disubstituovaných glykolurilů

Tato práce vznikla za podpory GAČR (grant P207/10/0695) a Evropské unie (CETOCOEN, CZ.1.05/2.1.00/01.0001; spravovaný MŠMT ČR).

#### LITERATURA

- Lagona J., Mukhopadhyay P., Chakrabarti S., Isaacs L.: Angew. Chem. Int. Ed. 44, 4844 (2005).
- Grillon E., Gallo R., Pierr M., Boileau J., Wimmer E.: Tetrahedron Lett. 29, 1015 (1988).
- Hu Y., Zhou B., Cao L.: Acta Cryst. E 63, o4480 (2007).

## BIS-TRÖGEROVY BÁZE JAKO RECEPTORY ELEKTRON-DEFICITNÍCH LÁTEK

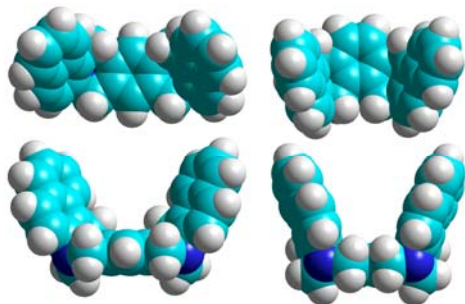
MARTIN HAVLÍK\*, VLADIMÍR KRÁL, BOHUMIL DOLENSKÝ

Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha, ČR  
havlikm@vscht.cz

Významnou skupinou látek, pro které jsou vyvíjeny receptory, jsou elektron-deficitní látky jako např. nitroaromáty

(detekce výbušnin). Jako potenciální receptory těchto látek jsou intenzivně studovány tzv. molekulární pinzety. Tyto látky připomínají svou strukturou i funkcí pinzety, které známe z běžného života. Při kontaktu takovéto látky, molekulární pinzety, s elektron-deficitní látkou dojde ke kooperaci vazebných jednotek, čímž se zvýší stabilita komplexu. To je obvykle prováděno barevnou změnou či zhasením fluorescence, čehož lze využít jako signálu k detekci.

Tato práce se zabývá přípravou, strukturální analýzou a studiem vazebných vlastností molekulárních pinzet na bázi bis-Trögerovýchází s ohledem na jejich využití jako receptorů pro konstrukci senzorů.



Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (projekt LC06077), GAČR (grant 203/08/1445).

#### LITERATURA

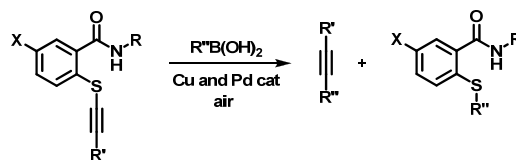
1. Havlík M., Král V., Dolenský B.: *Org. Lett.* 8, 4867 (2006).
2. Havlík M., Král V., Dolenský B.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 72, 392 (2007).
3. Havlík M., Král V., Kaplánek R., Dolenský B.: *Org. Lett.* 10, 4767 (2008).

#### AEROBIC Pd/Cu-CATALYZED CROSS-COUPLING REACTION OF THIOACETYLENES

**ADAM HENKE, JIŘÍ ŠROGL\***

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

A new methodology for the synthesis of disubstituted alkynes is introduced. The palladium/copper-catalyzed cross-coupling reaction of thioacetylene derivatives with boronic acids affords disubstituted alkynes and *S*-arylation products in very good yields. The coupling reaction occurs efficiently under aerobic, nonbasic conditions with a wide variety of thioalkynes and aromatic, heteroaromatic or vinylboronic acids. Scope and limitations of this coupling reaction as well as a proposed mechanism is presented.



Scheme 1

*This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (GAČR), No. 203/08/1318.*

#### REFERENCES

1. Henke A., Šrogl J.: *Chem. Commun.* 46, 6819 (2010).
2. Savarin C., Šrogl J., Liebeskind L. S.: *Org. Lett.* 3, 91 (2001).

#### SYNTÉZA FERROCENESTRONU

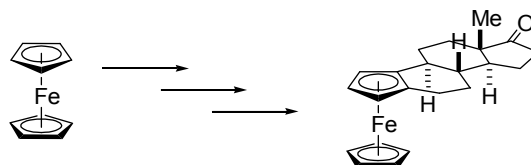
**FILIP HESSLER<sup>a</sup>, MARTIN KOTORA<sup>a,b,\*</sup>**

<sup>a</sup> *Katedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2;* <sup>b</sup> *Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6;  
fhessler@c-box.cz, kotora@natur.cuni.cz*

V posledních několika letech je věnována zvýšená pozornost novým sloučeninám ferrocenu s biologicky aktivními molekulami, a to pro své zajímavé vlastnosti<sup>1,2</sup>. Příkladem takové látky může být ferrocifen, derivát antiestrogenu tamoxifenu. Nyní jsou testovány jeho účinky proti karcinomu prsu.

I když je známo několik konjugátů ferrocenu a steroidů, zatím ještě nebyla připravena sloučenina obsahující ferrocen přímo v steroidním skeletu. Na základě předchozích zkušeností z nedávné syntézy estronu<sup>3</sup> jsme se rozhodli připravit první steroid s integrovaným ferrocenovým jádrem – ferrocenestron.

Syntéza vycházela z vhodně substituovaného chirálního ferrocenu s jeho následnými transformacemi pomocí reakcí katalyzovaných přechodnými kovy. Mezi tyto postupy patřily například oxidativní adice s navazující alkylací zprostředkovaná zirkonocenem, cross-coupling katalyzovaný komplexem palladia, enynová metathese katalyzovaná karbenovou sloučeninou ruthenia a hydrogenace dvojných vazeb za použití heterogenních (Pd/C) či homogenních katalyzátorů (komplex Ir). Nakonec byla použita selektivní oxidace pomocí palladiového katalyzátoru a následná redukce boranem pro změnu konfigurace na základním skeletu.



*Tato práce vznikla za podpory grantu MSM0021620857 a 1M0508 (Center for New Antivirals and Antineoplastics).*

## LITERATURA

1. Van Staveren D. R., Metzler-Nolte N.: Chem. Rev. 104, 5931 (2004).
2. Schatzschneider U., Metzler-Nolte N.: Angew. Chem. Int. Ed. 45, 1504 (2006).
3. Herrmann P., Buděšínský M., Kotora M.: J. Org. Chem. 73, 6202 (2008).

## SYNTÉZA SÉRIE CYKLODEXTRINOVÝCH FLUOROFORNÍCH CHEMOSENZORŮ

PETR HEZKÝ<sup>\*a</sup>, JINDŘICH JINDŘICH<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PŘF UK, Hlavova 2030/8, 128 40 Praha 2 jindrich@natur.cuni.cz

Cyklodextriny<sup>1</sup> jsou látky s širokým spektrem možností využití, zvláště pak v oblasti supramolekulární chemie. Jejich vyjimečné vlastnosti jsou dány přítomností málo polární kavity v jejich cyklické struktuře. Ta je schopna tvořit inkluzní komplexy s malými organickými molekulami komplementárních rozměrů, zejména pak v polárním prostředí (vodné roztoky). Uvedeného principu je využito i v případě chemosenzorických aplikací. Naše strategie je založena na navázání cyklodextrinu kovalentní vazbou na třífunkční spojovací linker vhodné délky, k jehož druhému konci je vázán fluorofor, který pak interaguje s kavitou cyklodextrinu. V přítomnosti analytu pak dochází ke změně této interakce, v závislosti na rozdílu afinit analytu a fluoroforu ke kaviti. Přímým důsledkem toho je změna fluorescenční odezvy, která se pak stává měřeným analytickým signálem. Spojovací linker je zároveň uzpůsoben pro možnost kotvení chemosenzoru na povrch pevné fáze prostřednictvím azidoskupiny na jeho třetím konci.

Náš přístup využívá jako prekurzor pro syntézu třífunkčního spojovacího linkeru přírodní L-serin z důvodů jeho definované stereochemie. Jako fluorofory byly použity skupiny kumarylová (Schéma 1), dansylová a 4-(dimethylamino)-benzoylová. Chemosenzor je kotven na pevnou fázi „click“ reakcí azidoskupiny s koncovým alkynelem řetězce, kterým je derivatizován povrch pevné fáze.

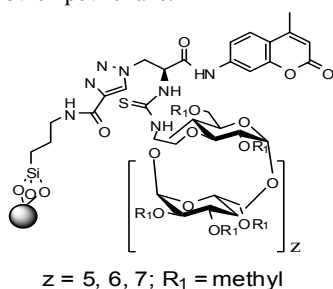


Schéma 1. Struktura chemosenzoru

Tato práce je podporována grantem č. MSM0021620857 a Výzkumným záměrem ÚOCHB-Z40550506.

## LITERATURA

1. Szejtli J.: Chem. Rev. 98, 1743 (1998).

## ORGANICKÁ SYNTÉZA V MEDICINÁLNÍ CHEMII

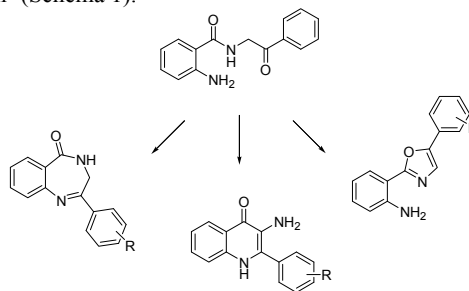
JAN HLAVÁČ<sup>\*</sup>, MIROSLAV SOURAL

Ústav molekulární a translační medicíny, Přírodovědecká fakulta UP Olomouc, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc hlavac@orgchem.upol.cz

I když se význam a rozsah medicínální chemie definuje různě, má vždy společné motto, kterým je výzkum a vývoj léčiv. Primárně je v tomto ohledu organická syntéza zapojena na samotném počátku vývoje nového léčiva, kdy se hledá tzv. chemický „hit“, tedy látka, která má slibné biologické vlastnosti. Tento hit je nejnázřejší možné najít paralelním testováním chemických knihoven, tedy kolekcí sloučenin čítajících až tisíce strukturně různých látek. Chemickou knihovnu je možné buďto získat postupným shromažďováním či koupí jednotlivých chemických substancí, nebo je možné ji naráz synteticky připravit. V tomto případě je však nutné přizpůsobit metodiku syntézy tak, aby bylo možné připravit velký počet látek v krátkém časovém úseku. Proto se postupem času dostala ve vývoji léčiv do popředí paralelní syntéza a kombinatoriální chemie, a to na různém stupni automatizace.

Tradiční pojetí syntézy v roztoku pak bylo v procesu „drug discovery“ postupně nahrazováno syntézou na pevné fázi. Od primárního objevu syntézy peptidů na pevné fázi<sup>1</sup> se postupně začala tato metodika syntézy používat i k přípravě menších organických molekul. Ve spojení s kombinatoriálními přístupy se ukázala syntéza na pevné fázi velmi efektivní pro rychlou přípravu knihoven obsahujících až miliony chemických sloučenin.

Důležitým aspektem při přípravě chemických knihoven je její diverzita, která je požadována při hledání nové účinné látky na daný molekulární cíl nebo na působení na transformovanou buňku jako takovou. Účinnou strategií v tomto ohledu je využití dostupných chemických intermediátů, které jsou jednoduše transformovatelné na různorodé sloučeniny neboli diversity-oriented synthesis (DOS)<sup>2</sup>. Příkladem takového principu může být transformace fenacylamidů anthranilových kyselin<sup>3</sup> (Schéma 1).



Schema 1. Konverze fenacylamidů anthranilových kyselin na strukturně různé sloučeniny

Kombinatoriální chemie aplikovaná na DOS má pak velký význam v „chemické genetice“. Úspěšnost v nalezení aktivní látky se zde pohybuje kolem jednoho promile, proto je moderní pojetí kombinatoriální chemie pevně spojeno s high throughput screening (HTS) a testují se knihovny látek s více než 10 000 substancemi.

Naproti tomu je pozornost věnována i strukturně stejným typům sloučenin, (target oriented library<sup>2</sup>), kde se tvorba knihoven využívá např. ke studiu vztahu struktury a aktivity. Oproti DOS se pro tyto účely využívají spíše knihovny menšího rozsahu, čítající spíše desítky, maximálně stovky látek. Po vyhodnocení SAR u primární knihovny je možné připravovat knihovny dalších generací (generic libraries) a upřesňovat tak vztah struktury a aktivity. Příkladem aplikace tohoto přístupu s využitím syntézy na pevné fázi je syntéza malých knihoven 3-hydroxychinolin-4(1H)-onů a studium jejich *in-vitro* aktivity na vybraných nádorových buněčných liniích. Pro tyto účely byla nejprve vyvinuta syntetická metoda<sup>4</sup>, která byla následně využita pro tvorbu jednotlivých knihoven<sup>5</sup> (Schéma 2).

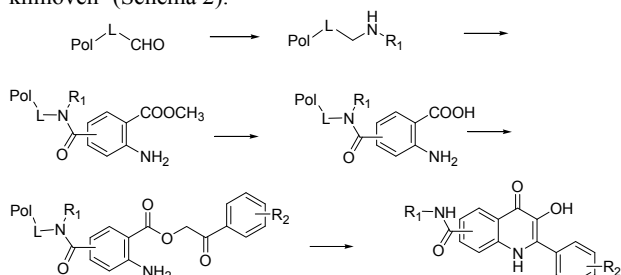


Schéma 2. Metoda solid phase syntézy pro přípravu knihoven 2-fenyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolonů

Příkladem syntézy menších knihoven v roztoku pak může být syntéza derivátů 5-substituovaných uracilů a uridinů a studium jejich účinku na buněčný cyklus<sup>6</sup>.

Vedle přímého hledání biologicky aktivní látky má organická syntéza v medicíně i mnoho dalších významů. Díky tvorbě biokonjugátů mohou být identifikovány molekulární cíle či metabolity, značeny biomolekuly, atd., čehož se pak využívá v různých studiích k popisu účinku vyvíjených léčiv. Knihovny látek primárně určené pro hledání chemického hitu pak mohou být využity i pro hledání látek s jinými parametry, jako je např. fluorescenční značka<sup>7</sup>.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT MSM6198959216, EEA/Norway grant A/CZ0046/1/0022, a Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace (projekt č. CZ.1.05/2.1.00/01.0030).*

#### LITERATURA

1. Merrifield R. B.: J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963).
2. Schreiber S. L.: Science 287, 1964 (2000).
3. Hradil P., Grepl M., Hlavac J., Soral M., Malon M., Bertolasi V.: J. Org. Chem. 71, 819 (2006).
4. Soral M., Krchnak V.: J. Comb. Chem. 9, 793 (2007).
5. Soral M., Hlaváč J., Funk P., Džubák P., Hajdúch M.: ACS Combinatorial Science – v tisku.

6. Brulikova L., Dzubak P., Hajduch M., Lachnitova L., Kollareddy M., Kolar M., Bogdanova K., Hlavac J.: Eur. J. Med. Chem. 45, 3588 (2010).
7. Motyka K., Hlavac J., Soral M., Funk P.: Tetrahedron Lett. 51, 5060 (2010).

#### OOSTATIC PEPTIDES CONTAINING D-AMINO ACIDS: SYNTHESIS, INSECT OOSTATIC ACTIVITY, DEGRADATION AND NMR-STUDY

JAN HLAVÁČEK<sup>a\*</sup>, RICHARD TYKVA<sup>a</sup>, BOHUSLAV ČERNÝ<sup>b</sup>, BLANKA BENNETTOVÁ<sup>c</sup>, JOSEF HOLÍK<sup>b</sup>, MILOŠ BUDEŠÍNSKÝ<sup>a</sup>, VĚRA VLASÁKOVÁ<sup>b</sup>, JIŘINA SLANINOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry CAS, 166 10 Prague; <sup>b</sup>Institute of Exp. Botany CAS, 142 20 Prague; <sup>c</sup>Institute of Entomology CAS, 370 05 České Budějovice  
honzah@uochb.cas.cz

An introduction of D-amino acids into the peptide chain of pentapeptide (**5P**) H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-OH<sup>1</sup> has maintained or even forced oostatic effect of corresponding analogs in comparison with the parent **5P**. The analogs caused a decrease of hatchability in the 1<sup>st</sup>, and elimination of hatchability in the 2<sup>nd</sup> gonotrophic cycle of the flesh fly *Neobellieria bullata*. Morphology changes in ovaries are linked to a large resorption of the eggs in treated insect. Contrary to the parent **5P**, the 2-D-Asp and 4-D-Ala containing analogs, labeled with 3-<sup>3</sup>H-Pro, were degraded much slowly due to a decrease of respective peptide bonds cleavage. The enhanced stability further retarded the incorporation of radioactivity<sup>2,3</sup> into ovaries. NMR study has suggested that metabolic stabilization of the molecules is linked to restricted conformations, which might perturb peptides interaction with enzyme and prolong their half-life. Pentapeptide with the 4-D-Ala adopts a most extended form that differs from **5P** mainly by orientation of the 5-Pro residue, forced by the 4-D-Ala residue in the neighborhood. The most compact seems to be a molecule of pentapeptide with the 2-D-Asp that could be stabilized with the H-bond between OH group of the 1-Tyr and C=O group of the 3-Pro. On contrary to restricted cyclic analog of **5P**, having one order of magnitude lower oostatic effect<sup>2</sup>, these linear analogs with partially restricted structures due to the presence of D-amino acids are flexible enough to maintain and even potentiate this effect. In general, increased stability of oostatic peptides after the introduction of D-amino acids into pentapeptide chain resulted in more oocytes influenced during the period of their development, which enhanced the regulatory potency of majority of the analogs.

*Supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Research project No. Z40550506) and by the Czech Science Foundation No. 203/06/1272.*

#### REFERENCES

1. Hlaváč J., Tykva R., Bennettová B., Barth T.: Bioorg. Chem. 26, 131 (1998).

- Hlaváček J., Černý B., Bennettová B., Holík J., Tykva R.: *Amino Acids* 33, 489 (2007).
- Hlaváček J., Buděšínský M., Bennettová B., Mařík J., Tykva R.: *Bioorg. Chem.* 29, 282 (2001).

## DRUHÁ GENERACE 7-DEAZAPURINOVÝCH NUKLEOSIDOVÝCH CYTOSTATIK

**MICHAL HOCEK\***, AURELIE BOURDERIOUX, PETR NAUŠ

UOCHB AV ČR, Gilead Sciences & IOCB Research Center, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
hocek@uochb.cas.cz

V rámci našeho systematického studia modifikovaných C-substituovaných purinových nukleosidů byla objevena cytostatická aktivita 6-hetarylpurinových<sup>1,2</sup> a 6-hetaryl-7-deazapurinových ribonukleosidů<sup>3</sup>. Další modifikací a substitucí heterocyklické části jsme dospěli k druhé generaci velmi účinných cytostatik s nanomolárními IC<sub>50</sub> vůči některým buněčným liniím lidských nádorů. Poprvé bude prezentována struktura této skupiny látek a strukturně-aktivitní závislost jednotlivých derivátů. Z patentových důvodů nelze uvést strukturu v abstraktu. Neaktivnější deriváty postoupily do *in vivo* testů ve spolupráci s Gilead Sciences a FN Olomouc.

Tato práce je součástí výzkumného projektu Z4 055 0506, podporována MŠMT (1M0502), Grantovou agenturou AVČR (IAA400550902) a Gilead Sciences, Inc. (Foster City, CA).

### LITERATURA

- Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: *J. Med. Chem.* 43, 1817 (2000).
- Hocek M., Nauš P., Pohl R., Votruba I., Furman P. A., Tharnish P. M., Otto M. J.: *J. Med. Chem.* 48, 5869 (2005).
- Nauš P., Pohl R., Votruba I., Džubák P., Hajdúch M., Ameral R., Birkus G., Wang T., Ray A.S., Mackman R., Cihlar T., Hocek M.: *J. Med. Chem.* 53, 460 (2010).
- Bourderieux A., Nauš P., Hocek M.: PCT/ CZ2010/ 000050.

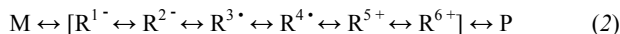
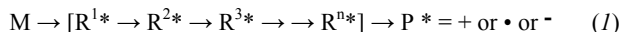
## TANDEM ANIONIC MICHAEL ADDITION/RADICAL CYCLIZATIONS FOR THE CONSTRUCTION OF HIGHLY FUNCTIONALIZED CYCLOPENTANES

**MARTIN HOLAN**, ULLRICH JAHN

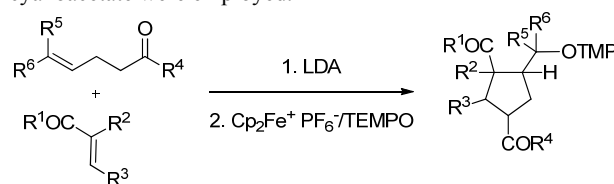
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
holanm@uochb.cas.cz

Tandem reactions are an effective tool in synthetic organic chemistry, since they allow time- and resource-efficient access to complex structures from simple precursors<sup>1</sup>. Domino processes are mostly based on homointermediate

reaction sequences (eq. 1), while heterointermediate reaction sequences (eq. 2) are not well developed.



Our methodology employs anionic Michael additions, where lithium ester and ketone enolates are successfully coupled with various Michael acceptors in good to excellent yields and with switchable diastereoselectivity<sup>2</sup>. Radical cyclizations are then used as the second stage of the tandem sequence. The process as a whole is terminated by trapping with TEMPO radical. The interconversion between anionic and radical stage is mediated by ferrocenium hexafluorophosphate, a recyclable non-toxic SET oxidant. The best results were obtained with *tert*-butyl ester enolates since they exhibit better diastereoselectivity during Michael addition step. As Michael acceptors, malonates, 1,3-diketones, Meldrum's acid and cyanoacetate were employed.



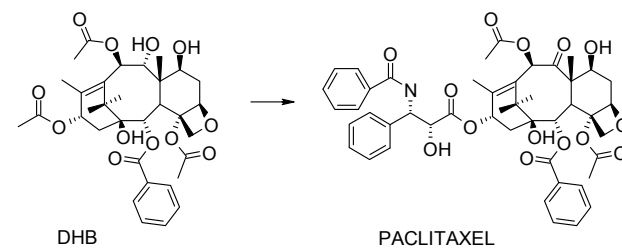
### REFERENCES

- (a) Pellisier H.: *Tetrahedron* 62, 1619 (2006); (b) Pellisier H.: *Tetrahedron* 62, 2143 (2006).
- Jahn U.: *Chem. Commun.* 2001, 1600.

## NEČISTOTY SEMISYNTETICKÉHO PACLITAXELU, ANEB CO TAKÉ UMÍME PŘIPRAVIT, ANIŽ CHCEME

**TOMÁŠ HOLAS**, LADISLAV CVAK, ALEXANDR JEGOROV

Teva Czech Industries s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava, Komárov  
Tomas.holas@tevapharm.cz



Vývojem postupu pro výrobu semisyntetického paclitaxelu se v opavském závodě TEVA zabýváme od roku 2006. Semisyntetický paclitaxel se vyrábí z DHB, který se izoluje z jehličí kanadského tisů (*Taxus canadensis*). První výrobní šarže byly realizovány v roce 2008. Během vývoje jsme izolovali a identifikovali téměř 50 vedlejších látek, které

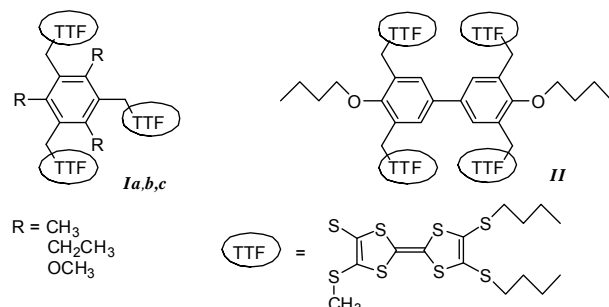
vznikají při syntéze. Z hlediska Správné výrobní praxe jsou to potenciální nečistoty, pro chemika jsou jejich struktury výletem do krásy a bohatosti organické chemie. V přednášce budou diskutovány oba aspekty.

## ELEKTRON-DONOROVÉ LIGANDY S TTF- SKUPINAMI

**JAN HOLEC<sup>a</sup>, JANA HODAČOVÁ<sup>a,b</sup>, JIŘÍ RYBÁČEK<sup>b</sup>,  
MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ<sup>b</sup>, PETR HOLÝ<sup>\*b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie VŠCHT Praha, Technická 5  
166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR,  
Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6  
petrholy@uochb.cas.cz

Tetrathiafulvalen a sloučeniny z něj odvozené (TTF-deriváty) jsou často užívanými stavebními prvky v supramolekulární chemii<sup>1</sup>. Tetrathiafulvalenové jádro je elektronově bohaté, a tak TTF-deriváty jsou schopny interakce s elektron-deficitními systémy. Pro studium komplexace elektronově chudých molekul fullerenu jsme proto navrhli sérii ligandů, v nichž z centrální jednotky vychází několik ramen, nesoucích TTF-jednotky. V první fázi byly připraveny tři tridentátní ligandy (**Ia,b,c**) a jeden tetradentátní ligand (**II**) reakcemi TTF-monothiolátu, který byl *in situ* generován bazickým štěpením<sup>2</sup> kyanoethylsulfanylové skupiny TTF-prekurzoru s brommethylovými skupinami centrálních jednotek.



Ligandy byly připraveny v dobrých výtěžcích a byly plně charakterizovány. Tyto první pozitivní syntetické zkušenosti umožňují dále rozšířit skupinu těchto ligandů s možností modifikovat jejich strukturu podle výsledků komplexačních měření.

Tato práce vznikla v rámci výzkumného záměru ZA 055 0506 a za finanční podpory GAV ČR (grant IAA400550704).

## LITERATURA

- Nielsen M. B., Lomholt C. Becher J.: Chem. Soc. Rev. 29, 153 (2000).
- Simonsen K. B., Svenstrup N., Lau J., Simonsen O., Mørk P., Kristensen G. J., Becher J.: Synthesis 1996, 407.

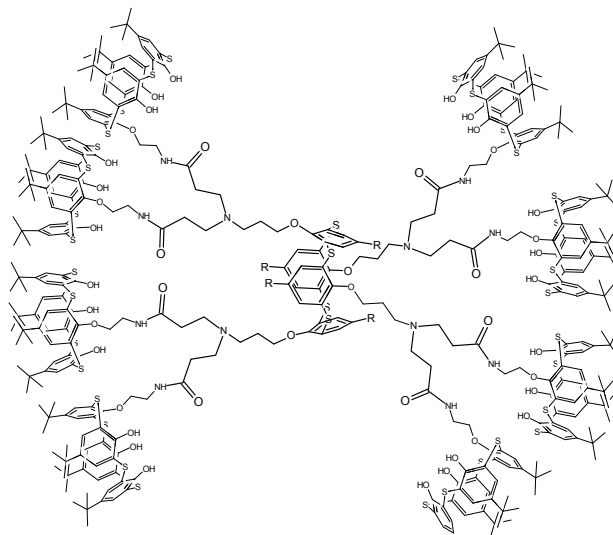
## DESIGN AND SYNTHESIS OF DENDRIMERS BASED ON THICALIX[4]ARENE DERIVATIVES

**JAN HOLUB, PAVEL LHOTÁK**

Department of Organic Chemistry, ICT Prague, Technická 5,  
166 28 Praha 6  
holubj@vscht.cz

The aim of this work has been to synthesize the thiacalix[4]arene-based conjugates where the target compounds should be represented either by oligothiacalix[4]arenes or by PAMAM dendrimers. Novel multi-calixarenes [2] possessing the lower rim-lower rim connections have been designed using the results of preliminary complexation studies carried out with basic thiacalixarenes. We assume that our novel compounds will provide better association constants in comparison with their simple building units. In addition to the extraction capability of these derivatives the PAMAM-thiacalixarene based dendrimers could be used as possible water soluble thiacalixarenes scaffold.

For preparation of multi-calixarenes conjugates we used reactive acyl-chlorides of the central (thia)calix[4]arene and previously prepared *t*-butyl (2-aminoethoxy)thiacalix[4]arene. After that we derivatised the thiacalix[4]arene core by simple aminolysis using polyamino-amides as branches.



This work was supported by the Czech Science Foundation (203/09/0691) and by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (IAAX08240901).

## REFERENCES

- Morohashi N., Narumi F., Iki N., Hattori T., Miyano S.: Chem. Rev. 5291, 106 (2006).
- Baklouti L., Cheriaa N., Mahouachi M., Abidi R., Kim J. S., Kim Y., Vicens J.: J. Inclusion Phenom. Macro. Chem. 1, 54 (2006),

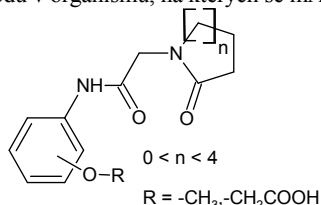
## LÁTKY S FRAGMENTEM 2-(2-OXO-1-AZACYKLO-ALKAN-1-YL)ACETAMIDU JAKO INHIBITORY AMINOPEPTIDASY N

**LENKA HOLUBÁŘOVÁ, IRENA MACKŮ, OLDŘICH FARSA**

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno  
lenka.holubarova@seznam.cz

Membránová alanyl aminopeptidasa (mAAP), dříve často označovaná také jako aminopeptidasa M (mikrozomální/membránová) nebo aminopeptidasa N (pro svou afinitu k neutrálním aminokyselinám) je integrální membránový protein, poprvé izolovaný z mikrozomální frakce prasečích ledvin. Náleží do skupiny Zn-dependentních metaloproteinů, ty patří mezi hydrolasy, u nichž je nukleofilní atak na peptidickou vazbu zprostředkován molekulami vody. Jedná se o v organismu rozšířenou peptidasu, obzvláště pak v kartáčovém lemu v membránách ledvin, slizničních buňkách tenkého střeva, v játrech a rovněž v placentě. Značnou pozornost k ní přilákalo zjištění jejího výskytu v mozku a předpoklad, že se může účastnit hydrolýzy a inaktivace enkefalinů a metabolismu angiotensinu III. V imunitním systému slouží v obecnější rovině jako inaktivátor některých cytokinů a může být rovněž cenným markerem při diagnóze rakoviny prostaty. mAAP má širokou substrátovou specifitu v odstraňování *N*-koncových aminokyselin z téměř veškerých nesubstituovaných oligopeptidů, amidů a arylamidů. Za účinné inhibitory tohoto enzymu jsou považována mimo jiné kovová chelatační činidla, což vyplývá z jeho vlastností<sup>1</sup>.

Cílem naší práce, ve které byl jako substrát enzymu použit leucin *p*-nitroanilid, bylo vyhodnocování inhibičních schopností sloučenin s fragmentem 2-(2-oxo-1-azacykloalkan-1-yl)acetamidů, které byly připraveny jako látky s potenciálním vlivem na CNS. Tyto sice ve srovnání s významným inhibitorem mAAP *o*-fenantrolinem (nebo rovněž popsány amastatinem a probestinem) vykazovaly nižší inhibiční schopnosti, přesto je zde předpoklad možnosti ovlivňování četných metabolických pochodů v organismu, na kterých se mAAP podílí.



Obr. 1. Struktura testovaných potenciálních inhibitorů

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA VFU Brno č. 26/2010/FaF.

### LITERATURA

- Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F.: *The Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2. vyd., Academic Press, London 2003

## SYNTEZA A *IN VITRO* HODNOCENÍ NOVÝCH CHELÁTORŮ ŽELEZA ZE SKUPINY AROYLHYDRAZONŮ SE ZVÝŠENOU STABILITOU V PLAZMĚ

**KATEŘINA HRUŠKOVÁ, PETRA KOVAŘÍKOVÁ, PETRA BENDOVÁ, PAVLÍNA HAŠKOVÁ, ELIŠKA MACKOVÁ, JÁN STARIAT, ANNA VÁVROVÁ, KATEŘINA VÁVROVÁ, TOMÁŠ ŠIMŮNEK**

Univerzita Karlova v Praze, FarmF UK, Katedra anorganické a organické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové,  
hrusk4aa@faf.cuni.cz

Oxidační stres se podílí na rozvoji mnoha závažných kardiovaskulárních onemocnění. Volné nitrobněčné ionty železa slouží jako katalyzátor Haber-Weissovy a Fentonovy reakce mezi superoxidy a peroxidy a výrazně tak přispívají k tvorbě vysoce toxických hydroxylových radikálů a následně k buněčnému poškození. Chelátory železa hladinu volného železa snižují a jsou proto perspektivními látkami s možností využití při léčbě mnoha závažných onemocnění, mj. anthracykliny navozené kardiotoxicity. Intracelulární chelátor železa salicylaldehyd-isonikotinoylhydrazon (SIH) vykazuje slibné kardioprotektivní účinky *in vitro* i *in vivo*<sup>1</sup>, labilní hydrazonová vazba však snižuje jeho stabilitu v plazmě a SIH podléhá rychlé hydrolýze. Proto byla připravena série látek s cílem zvýšit stabilitu aroylhydrazonů v plazmě. Základním principem při syntéze je záměna aldehydu za keton substituovaný donory a akceptory elektronů na fenylovém kruhu. Reakce probíhaly dvěma metodami za katalýzy kyselinou octovou v prostředí vodného ethanolu. První metoda, konvenční ohřev na olejové lázni, vyžadovala dlouhou reakční dobu, proto byl navržen jiný postup, ohřev v mikrovlnném reaktoru. Jeho použitím se reakční časy značně zkrátily. Na základě provedených studií *in vitro* se ukázalo, že všechny nově připravené sloučeniny vykazují vyšší stabilitu v plazmě a jejich chelatační a antioxidační aktivita zůstala zachována. Některé z produktů mají také vyšší cytoprotektivní aktivitu vůči oxidativnímu stresu a nižší toxicitu ve srovnání se SIH.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK124307/C/2007, SVV-2010-261-001 a MSM0021620822.

### LITERATURA

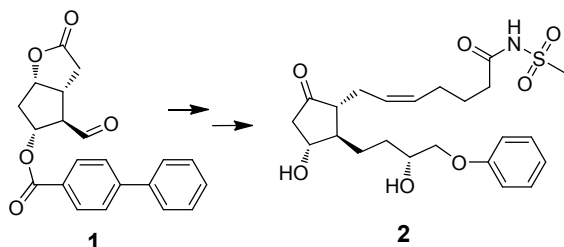
- Šimůnek T., Bouwman R. A., Vlasblom R., Versteilen A. M., Štěrba M., Geršl V., Hrdina R., Poňka P., de Lange J. J., Paulus W. J., Musters R. J.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 345 (2005).

### OPTIMALIZACE SYNTEZY SULPROSTONU

**MARTIN CHADIM\*, JAN PAVLÍK**

Cayman Pharma s.r.o., ul. Práce 657, 277 11 Neratovice  
martin.chadim@caymanpharma.cz

Sulproston **2** je metabolicky rezistentní analog PGE<sub>2</sub> (cit. <sup>1,2,3</sup>). V původní práci byl syntetizován z výchozího Corey aldehydu **1** v osmi stupních v celkovém výtěžku 3,2 % (cit. <sup>4</sup>). V rámci zakázkové přípravy biologicky aktivních látek byla naše výzkumná skupina pověřena syntézou této substance. Během její přípravy byla nově využita stereoselektivní redukce enonového uskupení v molekule a optimalizováno připojení horního řetězce Wittigovou reakcí. Celkový výtěžek po osmi reakčních krocích pak byl 10,5 %.



## LITERATURA

1. Topozada M., Warda A., Ramadan M.: Prostaglandins 17, 461 (1979).
2. Jumblatt M. M., Paterson C. A.: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32, 360 (1991).
3. van Beekhuizen H. J., de Groot A. N., De Boo T., Burger D., Jansen N., Lotgering F. K.: Am. J. Obstet. Gynecol. 194, 446 (2006).
4. Schaaf T. K., Bindra J. S., Eggler J. F., Plattner J. J., Nelson, A. J., Johnson M. R., Constantine J. W., Hess H.-J., Elger J.: J. Med. Chem. 24, 1353 (1981).

### VARIANTY PŘÍPRAV TETRAHYDRO-DIAZEPINOVÉHO SKELETU JAKO INTERMEDIÁTU PRO ASMARINY

#### NADĚŽDA CHUDÍKOVÁ, DALIMIL DVOŘÁK

VŠCHT, Fakulta chemicko-technologická, Ústav organické chemie, Technická 5, 166 28 Praha 6  
chudikon@vscht.cz

Asmariny lze formálně považovat za tetrahydro[1,4]diazepino[1,2,3-g-h]purinové deriváty<sup>1</sup> (THDAP) **5**. Cílem našeho projektu je připravit tetrahydrodiazepinový kruh a rozšířit varianty jeho příprav. Výchozím substrátem pro tvorbu heterocyklického systému **5** jsou substituované puriny **2, 3, 4**. Ve schématu 1 jsou naznačeny cesty, které lze využít pro přípravu tetrahydrodiazepinového skeletu.

Příprava 7-substituovaných adeninů **2** vychází z 6-chloropurinu **1**, kde je použita metodika selektivní N<sup>7</sup>-alkylace<sup>2</sup> a následná nukleofilní substituce chloru za příslušný amin. Syntéza 6-(3-hydroxypropyl)aminopurinu **3** nabízí zdanlivě jednoduchou cestu k uzavření 7-členného cyklu. Při přípravě sloučenin typu **4** byla opět využita metodika selektivní N<sup>7</sup>-alkylace<sup>2</sup>.

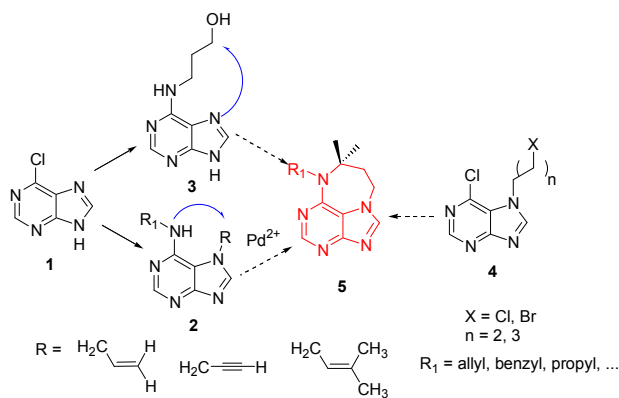


Schéma 1. Varianty příprav diazepinového skeletu

V příspěvku budou diskutovány nové výsledky během pokusů o přípravu derivátů **2, 3, 4** včetně pokusů o uzavření diazepinového skeletu.

*Tato práce byla podporována grantovou agenturou ČR (GA ČR 203/09/1552) a Centrem základního výzkumu LC06070: "Struktura a syntetické aplikace komplexů přechodných kovů" Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.*

## LITERATURA

1. Pappo D., Rudi A., Kasman Y.: Tetrahedron Lett. 42, 5941 (2001).
2. Kotek V., Chudíková N., Tobrman T., Dvořák D.: Org. Lett. zasláno do tisku.

### SYNTÉZA A ANTIFUNGÁLNÍ VLASTNOSTI NOVÝCH 2-SUBSTITUOVANÝCH BENZOTHIAZOLŮ

**ALEŠ IMRAMOVSKÝ<sup>a</sup>, ALEXANDRA M. BRITO<sup>a</sup>,  
VLADIMÍR PEJCHAL<sup>a</sup>, ZBYNĚK OKTÁBEC<sup>b</sup>,  
JOSEF JAMPÍLEK<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita, Pardubice, 532 10 Pardubice  
<sup>b</sup>Zentiva a.s., U kabelovny 130, 102 37 Praha 10  
ales.imramovsky@upce.cz

Substituované benzoxazoly a benzothiazoly jsou látky s velmi zajímavými biologickými vlastnostmi. Substituce v jádře heterocyklu nepřináší dobré výsledky vzhledem k aktivitě, ale také k fyzikálně chemickým vlastnostem. Substituce v postraní řetězci, zejména v poloze 2 přináší zajímavé výsledky biologických aktivit<sup>1</sup>. Typem postraního řetězce lze měnit hydrofóbní povahu celé molekuly a s ní i schopnost pronikat přes buněčné membrány.

V rámci této studie byly připraveny nové 2-substituované deriváty 6-fluoro-benzothiazolu **I**. Látky byly primárně testovány jako potenciální antifungálně aktivní látky. S využitím RP-HPLC<sup>2,3</sup> byla studována lipofilita připravených sloučenin, která byla porovnána s výsledky získanými



z komerčně dostupných výpočetních programů (ChemOffice, ACD/LogP).

Bude prezentována syntetická cesta vedoucí k přípravě uvedených molekul **1**, bez nutnosti (ale s možností) izolace jednotlivých reakčních intermediátů. Součástí prezentace bude též porovnání výsledků biologického hodnocení a zjištěných fyzikálně chemických vlastností (LogP), na jejichž základě budou komentovány vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou.

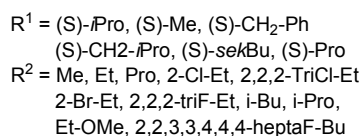
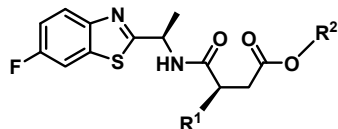


Schéma 1. Knihovna připravených derivátů 6-fluoro-benzothiazolu

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstva školství, mládeže tělovýchovy České republiky (Projekt MSM 002 162 7501).

#### LITERATURA

- Vinšová J., Čermáková K., Tomečková A., Čečková M., Jampílek J., Čermák P., Kuneš J., Doležal M., Štaud F.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 5850 (2006).
- Pliska V.: *Lipophilicity in drug action and toxicology (Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Vol. 4)*, 1. vyd.; Wiley-VCH, Weinheim 1996.
- Doležal M., Pálek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Králová K.: *Molecules* 11, 242 (2006).

### SYNTHESIS OF HIGHLY FUNCTIONALIZED CARBOCYCLES IN TANDEM REACTION INVOLVING DIFFERENT INTERMEDIATES

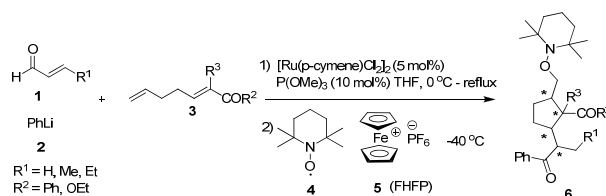
#### PRATAP JAGTAP, ULLRICH JAHN\*

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences CR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Prague 6  
 prataprajgata@gmail.com; jahn@uochb.cas.cz*

Domino reactions are a powerful tool in the synthesis of complex molecules in a time-efficient way. Anionic/radical tandem processes by oxidative electron transfer using ferrocenium hexafluorophosphate (FHFP) as a SET reagent were introduced in 1998<sup>1</sup>. Our interest is centered around SET induced domino reactions involving the formation of multiple organometallic/radical intermediates for the synthesis of highly functionalized cyclic molecules.

Here we present our recent results on tandem reactions involving nucleophilic addition to **1**, transition metal-catalyzed isomerization, Michael addition to **3**, switching of the anion to a radical using **5**, which is followed by cyclization and quenching by TEMPO **4**. This gives complex cyclized

molecules such as **6** starting from simple  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes in moderate to good yield.



Scheme 1

#### REFERENCES

- a) Jahn U., Hartmann P.: *Chem. Commun.* 1998, 209; b) Jahn U., Hartmann P., Dix I., Jones P. G.: *Eur. J. Org. Chem.* 2001, 3333; c) Jahn U., Hartmann P.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2001, 2277; d) Jahn U., Hartmann P., Kaasalainen E.: *Org. Lett.* 6, 257 (2004).

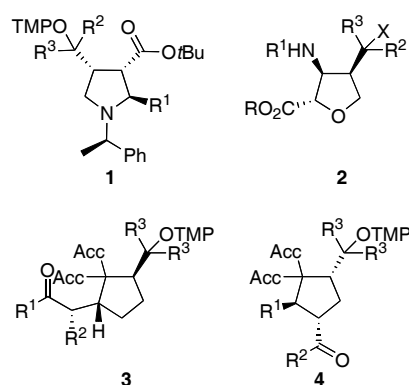
### OXIDATIVE ELECTRON TRANSFER-INDUCED TANDEM REACTIONS - NEW METHODOLOGY

#### ULLRICH JAHN\*, MARTIN HOLAN, PRATAP JAGTAP, FRANTIŠEK KAFKA, DMYTRO RUDAKOV, AUDE VIBERT

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

Radicals are central among the common reactive intermediates with respect to their oxidation state, since they can be generated from many other reactive intermediate types by oxidative or reductive processes. Vice versa, they serve of course as precursors to other intermediates.

We present here new oxidative diastereoselective and enantioselective oxidative tandem reactions that combine anionic and radical reaction steps. Using such sequences, heterocyclic structures such as pyrrolidines **1** or tetrahydrofurans **2** can be synthesized efficiently. This approach can also be used to access highly functionalized carbocycles such as cyclopentanes **3** and **4** selectively.



Financial Support by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Z4 055 0506) and the Grant Agency of the Czech Republic (203/09/1936) is gratefully acknowledged.

## STUDIUM DUSÍKOVÉ VAZBY

**MILAN JAKUBEK\***, **VÁCLAV PARCHAŇSKÝ**,  
**BOHUMIL DOLENSKÝ**

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická  
v Praze, Technická 5, 166 28 Praha  
jakubekm@vscht.cz

Nekovalentní mezimolekulární interakce, přestože jsou slabé, rozhodují o vlastnostech materiálů, existenci života. Jednou z těchto interakcí je halogenová vazba tvořená mezi atomem halogenu (Cl, Br, I, ...) a atomem s volným elektronovým párem (N, O, S, ...). Halogen vázaný na uhlíku v tomto případě vystupuje jako elektron akceptor (Lewisova kyselina) a atom s volným elektronovým párem jako elektron donor (Lewisovova báze). V případě, že elektronovým donorem je atom dusíku, jedná se o doposud málo probádanou dusíkovou vazbu.

Práce se zabývá vznikem dusíkové vazby mezi atomem jódu 1,2,3,4,5-pentafluor-6-jodbenzenu a atomem dusíku 1,4-dikyanobenzenu. Tento systém lze studovat pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{19}\text{F}$  NMR, IČ a Ramanovy spektroskopie. Abychom získali další charakteristiky dusíkové vazby tohoto systému, připravili jsme isotopově značený 1,4-dikyanobenzen ( $^{15}\text{N}\equiv^{13}\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-^{13}\text{C}\equiv^{15}\text{N}$ ). Tato látka umožní sledovat dusíkovou vazbu i pomocí  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  NMR a interpretovat detaily IR a Ramanových spektr.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR MSM 6046137307 a LC06077.

## LITERATURA

1. Marek R., Lyčka A., Kolehmainen E., Sievanen E., Tousek J.: *Curr. Org. Chem.* 11, 1154 (2007).
2. Jackowski K., Bernatowicz P., Wielogorska E.: *Phys. Chem.* 216, 1401 (2002).

## PŘÍPRAVA NOVÝCH NESYMETRICKY SUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ FLUORENU

**ŠTĚPÁNKA JANKOVÁ<sup>a</sup>**, **MARTIN KOTORA<sup>a,b,\*</sup>**

<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
jankovas@seznam.cz, kotora@natur.cuni.cz

Dewarovy benzeny jsou valenčními deriváty benzenů, které mohou být připraveny jejich termickým přesmykem<sup>1</sup>. Jiným způsobem přípravy je Dielsova-Alderova reakce *in situ* připraveného cyklobutadienového komplexu chloridu hlinitého s komerčně dostupnými deriváty propynoátů<sup>2</sup> a vzniklé

Dewarovy benzeny jsou obvykle termicky vysoce stabilní látky, které se přesmykují<sup>3</sup> při teplotách nad 100 °C.

Cílem naší práce bylo prozkoumat možnosti přípravy nesymetricky substituovaných fluorenů s využitím Dewarových benzenů jako klíčových meziproduktů. Klíčovým krokem byla syntéza esterů 2-aryl-3,4,5,6-tetraalkyl[2.2.0]karboxylových kyselin. Hydrolyzou či redukcí esterové skupiny vznikly kyseliny či alkoholy, které byly využity v intramolekulární Friedel-Craftsově reakci (Schéma 1).

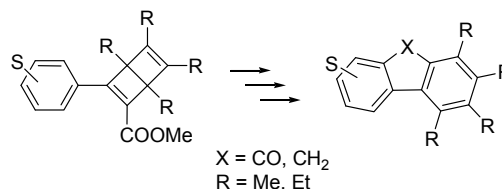


Schéma 1

Tato práce vznikla za podpory grantů MSM0021620857, LC06070, a Z40550506.

## LITERATURA

1. van Tamelen E. E., Pappas S. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 84, 3789 (1962).
2. Schaffer W.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 3, 695 (1964).
3. Janková Š., Dračínský M., Císařová I., Kotora M.: *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 47.

## PŘÍPRAVA KONDENZOVANÝCH OXAZABORINŮ, TRIAZABORINŮ A PYRIDAZINIOVÝCH SOLÍ

**FRANTIŠEK JOSEFÍK<sup>a</sup>**, **MARKÉTA SVOBODOVÁ<sup>a</sup>**,  
**VALERIO BERTOLASI<sup>b</sup>**, **PETR ŠIMŮNEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Univerzita Pardubice, FCHT, Ústav organické chemie a technologie, 532 10 Pardubice 2; <sup>b</sup>Università di Ferrara, Dipartimento di Chimica and Centro di Strutturistica Diffraattometrica, Via L. Borsari 46, I-441 00, Ferrara, Italy  
josefik.frantisek@email.cz

Reakcemi polarizovaných ethylenů s diazoniovými solemi vznikají obvykle azo- nebo hydrazosloučeniny. Touto reakcí lze však získat také heterocyklické sloučeniny, jako např. pyridaziniové soli, borové heterocykly nebo pyrazoly.

Tato práce<sup>1</sup> je zaměřena na reakce β-enaminonů **I** se substituovanými benzendiazonium-tetrafenylboráty **II** a benzendiazonium-tetrafluorboráty **III**.

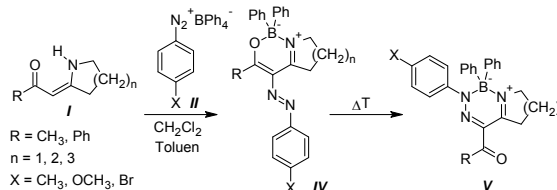


Schéma 1. Příprava oxazaborinů a triazaborinů

Enaminony **I** poskytují reakci s benzendiazonium-tetrafenylboráty **II** oxazaboriny **IV**. Některé z nich přesmykují na termodynamicky stabilnější formu, kterou jsou triazaboriny **V** (Schéma 1).

Šimůnek a spol. popsali v roce 2008 vznik pyrazolu reakcí enaminonů mající methylenovou skupinou vedle aminoskupiny s diazoniiovými solemi. Při reakcích  $\beta$ -enaminonů **I** s benzendiazonium-tetrafluorboráty **III** však byly izolovány místo očekávaných pyrazolů **VI** pyridaziniové soli **VII** (Schéma 2).

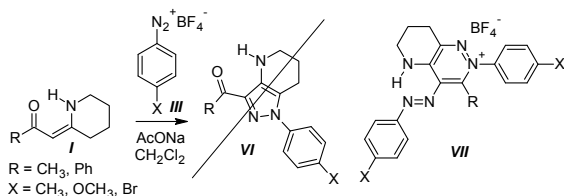


Schéma 2. Příprava pyridaziniových solí

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR č. 0002 162 7501 a projektu IGA SGFCHT 02 UPa.

#### LITERATURA

1. Josefík F.: *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice (2009).

### STEROIDNÍ „CLICK DEŠTNÍKY“, SYNTÉZA A VLASTNOSTI

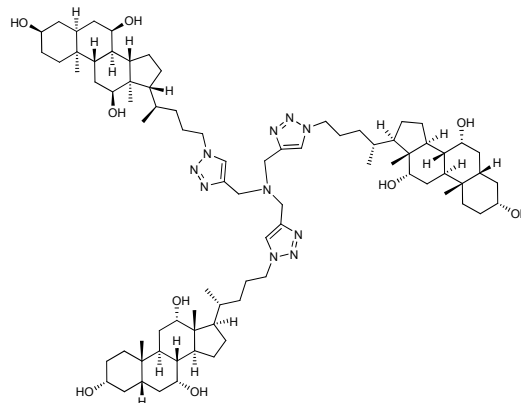
**MICHAL JURÁŠEK, PAVEL DRAŠAR**

*Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
michal.jurasek@gmail.com, pavel.drasar@vscht.cz*

Huisgenova<sup>1</sup> [3+2] cykloadice - “click reakce” terminálních alkyňů a azidů je v současném vědeckém výzkumu a vývoji často využívaným nástrojem zejména kvůli její experimentální jednoduchosti a toleranci k většině funkčních skupin<sup>2</sup>. Byla využita ve vývoji nových léčiv<sup>3</sup>, chemii polymerů<sup>4</sup>, materiálů<sup>5</sup>, biologii či při studiu biokonjugací<sup>6</sup>. Molekulární deštníky<sup>7</sup> jsou unikátní skupinou látek, jež mají dva či více faciálních amfifilů vázaných kovalentně na „centrální lešení“. Takové molekuly jsou amfomorfní. Jejich vystavení hydrofobnímu či hydrofilnímu exteriéru způsobí tvorbu hydrofilního či hydrofóbního interiéru. Tyto supramolekuly jsou schopny přecházet přes lipidové membrány a mohou být využity jako molekulární transportéry. Žlučové kyseliny jsou přírodní látky, jejichž skelet se vyznačuje rigiditou, robustností, chiralitou a hlavně unikátní amfifilicitou. Tyto vlastnosti je dělají vhodným stavebním materiálem pro práci v oblasti supramolekulární chemie a studium samoskladebných vlastností. Hormonální steroid estron a jeho deriváty mají chromofor, čehož využíváme při studiu fosforescencních vlastností.

Žlučová kyselina byla převedena na methylester a hydroxy skupiny byly chráněny methoxymethoxy ethery.

Redukce esteru na alkohol, převedení na mesylát a následná nukleofilní substituce poskytla C-24 azid. Deprotekce acetylchloridem v methanolu založená na *in situ* generovaném HCl poskytla C-24 azidy v celkově uspokojivých výtěžcích. 2-Nitroestron byl redukován na 2-amin a ten byl následně převeden na C-2 azid. Tyto azidy byly následně „zklíknuty“ s terminálními azidy na lešení, za vzniku 1,4-disubstitovaných 1,2,3-triazolů. V současnosti se zabýváme studiem vlastností těchto látek.



Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR MSM6046137305, 2B06024 (SUPRAFYT) a IGA VŠCHT A1\_FPBT\_2010\_005.

#### LITERATURA

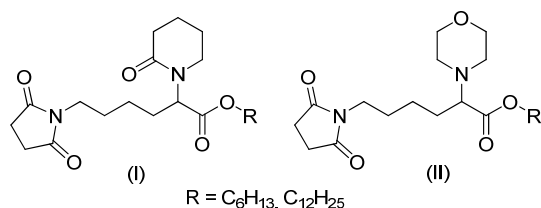
1. Huisgen R.: *Andrew. Chem., Int. Ed.* 2, 565 (1963).
2. Hein J. E., Tripp J., Krasnova L., Sharpless K., Fokin V.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 8018 (2009).
2. Kolb H. C., Sharpless K. B.: *Drug Discovery Today* 8, 1128 (2003).
3. Evans R. A.: *Aust. J. Chem.* 60, 384 (2007).
4. Hawker C. J., Fokin V. V., Finn M. G., Sharpless K. B.: *Aust. J. Chem.* 60, 381 (2007).
5. Link A. J., Tirrell D. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 11164 (2003).
6. Chen W.-H., Janout V., Kondo M., Mosoian A., Mosoyan G., Petrov R. R., Klotman M. E., Regen S. L.: *Bioconjugate Chem.* 20, 1711 (2009).

### KONFORMAČNÍ ANALÝZA SUBSTITUOVANÝCH ALKYL-6-(2,5-DIOXOPYRROLIDIN-1-YL)HEXANOÁTŮ: VÝPOČETNÍ STUDIE

**IVAN RAICH\*<sup>a</sup>, SANDRA KÁČEROVÁ<sup>a</sup>, JOSEF JAMPÍLEK<sup>b</sup>, KATEŘINA BRYCHTOVÁ<sup>c</sup>**

*<sup>a</sup>Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Zentiva a.s., 102 37 Praha 10, <sup>c</sup>Ústav chemických léčiv, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 612 42 Brno  
Ivan.Raich@vscht.cz.*

Pro řadu substituovaných alkyl-6-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoátů obecného vzorce **I** a **II** byly s použitím *ab initio* metod a predikčních programů předpovídány farmakologicky zajímavé fyzikálně chemické vlastnosti<sup>1</sup>, především log *P*, afinita k protonu, *pK<sub>a</sub>* a parciální náboje.



Klíčovým bodem byly geometrické optimalizace všech 4 studovaných látek. Vzhledem k velmi dlouhým alkylovým řetězcům nepřicházelo v úvahu systematické mapování konformačního prostoru a nízkoenergetické konformace musely být hledány jiným způsobem. Použito bylo konformační prohledávání a simulované žihání s následnou geometrickou optimalizací na MM úrovni. Nalezené energeticky nejvýhodnější konformace s relativní energií do 8 kJ/mol byly dále optimalizovány na *ab initio* úrovni HF/4-31G nejprve ve vakuu a pak v implicitně zahrnuté vodě. Konformační flexibilita všech látek byla též studována pomocí molekulové dynamiky s explicitně reprezentovanou rozpouštědlovou směsí propylenglykol-voda 1:1.

Optimalizované geometrie byly použity k výpočtu IČ a NMR spekter a dále k predikcím Log*P* hodnot. Vypočtené a predikované hodnoty byly porovnány s dostupnými experimentálními údaji z literatury.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR MSM6046137305.*

#### LITERATURA

1. Brychtová K., Dvořáková L., Kalinowski D. S., Raich I., Opatřilová R., Pláček L., Csolle J., Richardson D R., Jampilek J.: *Bioorg. Med. Chem.*, zasláno do tisku.

### VYUŽITÍ NOVÝCH BIPYRIDIN-*N,N'*-DIOXIDŮ V ASYMETRICKÉ SYNTÉZE PŘÍRODNÍCH LÁTEK A LÉČIV

**ANETA KADLČÍKOVÁ<sup>a</sup>, MARTIN KOTORA<sup>a, b\*</sup>**

<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6 [daise@seznam.cz](mailto:daise@seznam.cz), [kotora@natur.cuni.cz](mailto:kotora@natur.cuni.cz)

Deriváty chirálních bipyridinů (Lewisovské báze) jsou často využívány jako katalyzátory v asymetrické syntéze. Typickým příkladem těchto látek jsou chirální nesymetricky substituované bis(tetrahydroisochinolin)-*N,N'*-dioxidy, které je možno využít jako katalyzátory v syntéze chirálních stavebních bloků<sup>1-3</sup>. Jimi katalyzované allylace různě substituovaných  $\alpha,\beta$ -

nenasycených aldehydů allyltrichlorsilanem poskytly odpovídající homoallylalkoholy s optickou čistotou do 99 % ee. Například allylací *trans*-cinnamaldehydu byl připraven homoallylalkohol s vysokou optickou čistotou (97 % ee) (schéma 1), který byl dále využit jako výchozí látka pro syntézu goniotalaminu (je znám pro své antikancerogenní účinky). Výše uvedená enantioselektivní allylace byla použita i pro syntézu dalších látek<sup>4</sup>.

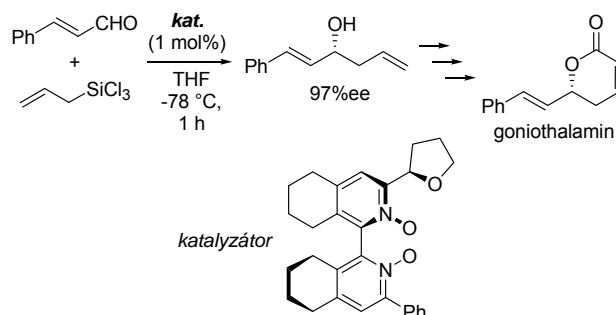


Schéma 1

*Tato práce vznikla za podpory Centra základního výzkumu MŠMT (projekt č. LC06070), GA ČR (projekt č. 203/08/350) a MSM 0021620857.*

#### LITERATURA

1. Hrdina R., Kadlčíková A., Valterová I., Hodačová J., Kotora M.: *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 3185 (2006).
2. Kadlčíková A., Kotora M.: *Molecules* 14, 2918 (2009).
3. Kadlčíková A., Hrdina R., Valterová I., Kotora M.: *Adv. Synth. Catal.* 351, 1279 (2009).
4. Kadlčíková A., Kotora M.: *Chem. Eur. J.* 16, 9442 (2010).

### TANDEM AZA-MICHAEL ADDITIONS-RADICAL CYCLISATIONS AS A CONVENIENT ROUTE TO *N*,2,3,4-TETRASUBSTITUTED PYRROLIDINES

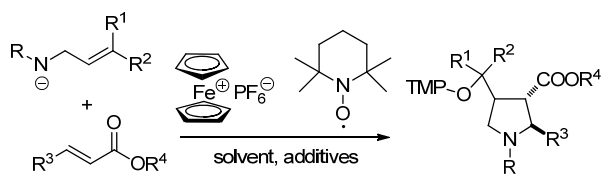
**FRANTIŠEK KAFKA, ULLRICH JAHN\***

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Flemingovo 2, 166 10 Prague 6*  
[jahn@uochb.cas.cz](mailto:jahn@uochb.cas.cz)

We develop diastereoselective approaches to polysubstituted pyrrolidines, which occur in complex natural products such as the *Stemona* alkaloids<sup>1</sup>. Use of tandem processes in the synthetic strategy<sup>2</sup> allows us to take control over the formation of up to three stereogenic centers in a one-pot reaction. Recently we devised novel synthetic routes to 4-substituted pyrrolidine-3-carboxylates via oxidative 5-*exo* radical cyclisations of  $\beta$ -aminoesters<sup>3</sup>.

Our current interest is the use of tandem aza-Michael additions-radical cyclisations in the synthesis of *N*,2,4-trisubstituted pyrrolidine-3-carboxylates. We present a variety of derivatives with good to excellent yields and stereoselectivity. Previously investigated oxidative cyclisations

of  $\beta$ -aminoesters can serve as a complementary method with similar results.



We also investigate conditions and scope of radical cyclisations using catalytic amounts of ferrocene. Furthermore, we optimized conditions for reductive deprotection of the TMP unit, which enable us to separate diastereomeric mixtures and extend the synthetic use of prepared compounds.

#### REFERENCES

1. Greger H.: *Planta Medica* 72, 99 (2006).
2. Jahn U., Müller M., Aussieker S.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 5212 (2000).
3. Jahn U., Kafka F., Pohl R., Jones P.G.: *Tetrahedron* 65, 10917 (2009).

#### NOVÉ LINEÁRNÍ A LOMENÉ DERIVÁTY *o*-KARBORANU OBSAHUJÍCÍ BICYKLO[1.1.1]PENTANOVOU KLÍCKU

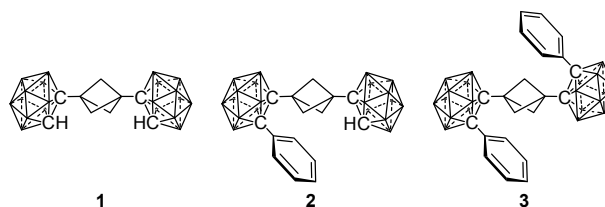
JIRÍ KALETA<sup>a</sup>, MAREK NEČAS<sup>b</sup>, ZBYNĚK  
JANOŠEK<sup>c</sup>, CTIBOR MAZAL<sup>b</sup>, JOSEF MICHL<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>ÚOCHB AV ČR, 166 10 Praha; <sup>b</sup>Ústav chemie, Masarykova  
universita, Kotlářská 2, 61137 Brno; <sup>c</sup>Ústav anorganické  
chemie AV ČR, 250 68 Řež; <sup>d</sup>Dept Chem. Biochem., University  
of Colorado, Boulder, Colorado 80309-0215  
kaleta@uochb.cas.cz

Do dnešních dnů byla připravena široká škála různých rigidních tyčinkovitých molekul obsahujících bicyklo[1.1.1]pentanovou (BCP) klíčku<sup>1</sup>. Množství lomených struktur je však výrazně nižší<sup>2</sup>.

Cílem tohoto projektu byla syntéza lineární **1** a následně jednou **2** a dvakrát lomených molekul **3** odvozených od *o*-karboranu (CB). Jeho strukturální parametry totiž umožňují permanentní ohnutí výsledných substituovaných struktur (**2** a **3**).

Jednotlivé syntetické cesty jsou navíc navrženy tak, že umožňují přípravu derivátů **2** a **3** nesoucích různé substituenty na aromatických jádrech (např. COOCH<sub>3</sub> a I). Získané látky tak mohou nalézt uplatnění jako prekurzory MOFů (MOF = Metal-Organic Framework) či jiných struktur supramolekulární chemie.



Nezvyklý geometrický tvar molekul **1** – **3** se promítl do jejich fyzikálně-chemických vlastností (rozpuštnost, chemické posuny v protonových spektrech, atd.). Právě vliv C-substituentů CB jednotek na chemický posun vodíků BCP klíčky byl studován pomocí <sup>1</sup>H NMR.

Připravené struktury jsou prvními zástupci látek s do té doby neznámým strukturálním motivem CB-BCP-CB. Získané látky byly postoupeny následné krystalografické analýze. Studium jejich chemického chování je oblastí zájmu dalšího výzkumu.

Projekt KONTAKT ME 09114 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, National Science Foundation (USA) a výzkumný záměr MSM0021622410.

#### LITERATURA

1. a) Kaszynski P., Friedli A., Michl J.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 601 (1992); b) Kaleta J.: *Disertační práce*, MU Brno (2010).
2. Schwab P., Noll B., Michl J.: *J. Org. Chem.* 67, 5476 (2002).

#### ZMĚNY VE VÝVOJI SYNTÉZY PRASURGELU V PODMÍNKÁCH FARMACEUTICKÉ FIRMY

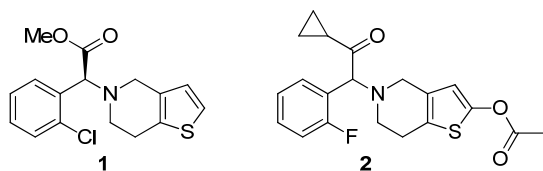
KATEŘINA KAMINSKÁ, HANA ŠTĚPÁNKOVÁ,  
JOSEF HAJÍČEK

Zentiva k.s., U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10 – Dolní  
Měcholupy  
Katerina.Kaminska@zentiva.cz, Josef.Hajicek@zentiva.cz

Clopidogrel (**1**) ve formě hydrogensulfátu je účinnou látkou v nejprodávanějším přípravku firmy Sanofi-Aventis -Plavixu (v roce 2009 3. místo v prodeji léků na světě – roční prodeje přes 4 mld. \$). Jeho nástupcem s výhodou výrazně nižšího dávkování by se měl stát Prasugrel (**2**).

Vyvinuli jsme novou syntetickou cestu<sup>1</sup> pro přípravu této látky, která se vyznačovala několika výhodami oproti syntéze používané origonátorem<sup>2</sup>. Jejím hlavním kladem byla možnost všechny meziproducty snadno izolovat a čistit jednoduchými operacemi, jako je krystalizace či destilace, a získat tak výsledný produkt s čistotou větší než 99,8 %. V neposlední řadě se nám některé kroky podařilo sloučit<sup>3</sup> a minimalizovat tak technologické ztráty při jednotlivých operacích.

Důležitým faktorem ve vývoji API (active pharmaceutical ingredient) je její forma použitá ve formulaci. Další vývoj tedy směřoval ke screeningu použitelných solí, jednotlivých polymorfních forem a jejich vlastností<sup>4</sup>.



## LITERATURA

1. Štěpánková H., Hájíček J.: Int. Patent Application WO2009006859. b) Štěpánková H., Kaminská K., Hájíček J.: Czech Patent Application PV-2009-763.
2. Koike H., Asai F., Sugidachi A.: European Patent Application EP 0542 411 B1.
3. Štěpánková H., Hájíček J.: Int. Patent Application WO2010060389.
4. Kaminská K., Štěpánková H., Hájíček J.: Czech Patent Application 2009-PV-762.

## USING PROTEIN IR AND CD SPECTRA FOR PEPTIDE FOLDING STUDIES

**JAKUB KAMINSKÝ<sup>a</sup>, JAN KUBELKA<sup>b</sup>,  
PETR BOUŘ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague, Czech Republic; <sup>b</sup>University of Wyoming, 1000E Univ. Avenue, Laramie, WY 82071, USA  
kaminskj@gmail.com

Protein folding remains one of the unsolved problems of modern science. We focused on small and structurally simple proteins, such as helix-turn-helix motifs, which are excellent models for obtaining important insights into the secondary and tertiary structure formation during protein folding<sup>1</sup>. Detailed understanding of the mechanism is a crucial step toward understanding of the biological role.

Spectroscopy is one of useful tools for such investigations. We concentrated on information obtained by infrared spectroscopy (IR) and circular dichroism (CD). In particular, we investigated the temperature-dependent amide I frequency an intensity shifts complicated by nonstructural effects (solvent, environment), which are not related to the thermal unfolding of the peptide or protein backbone<sup>2</sup>. Similarly, we focused on the simulation of CD spectra of  $\alpha$ -helical peptides to investigate the influence of the chain length. The effect of another peptide in the proximity of the helix was also studied. We have used experimental data of model compounds, such as *N*-methylacetamide (NMA) and small oligopeptides. Simulations of the spectra were predominantly based on density functional theory (DFT) coupled with Molecular dynamics (MD).

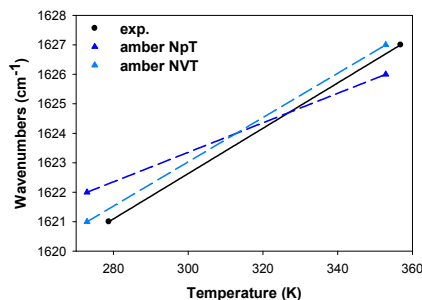


Fig. 1. The temperature dependence of the amide I band position

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports (project 604 613 7305), the GA CR (project P208/10/P356) and the Academy (M200550902), and the National Science Foundation (CAREER: 0846140).

## REFERENCES

1. Amunson K. E., Ackels L., Kubelka J.: J. Am. Chem. Soc. 130, 8146 (2008).
2. Amunson K. E., Kubelka J.: J. Phys. Chem., B 111, 9993 (2007).

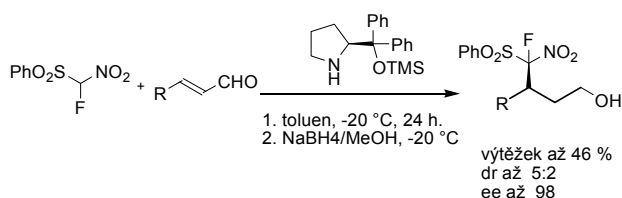
**VYSOCE ENANTIOSELEKTIVNÍ ADICE  
1-(FLUORNITROMETHYLSULFONYL)METHANU NA  
 $\alpha,\beta$ -NENASYCENÉ ALDEHYDY**

**MARTIN KAMLAR, JAN VESELÝ**

Katedra organické a jaderné chemie, Univerzita Karlova,  
Hlavova 2030, 124 43 Praha 2  
kamlar.m@centrum.cz, jxvesely@post.cz

Organické sloučeniny obsahující atom fluoru mají některé unikátní fyzikální a chemické vlastnosti díky vysoké polaritě vazby C-F. Vysoká polarita této vazby může významně ovlivnit vlastnosti sousedních vazeb nebo elektronových párů sousedních atomů. Organické sloučeniny obsahující fluor nacházejí uplatnění v medicíně, zemědělství, spotřebním a textilním průmyslu<sup>1</sup>. Díky tomu byla vypracována řada metod pro selektivní zavedení fluoru nebo fragmentů obsahující fluor do organických molekul, které nacházejí využití především ve farmaceutickém průmyslu. Nejběžnější strategií pro stereoselektivní zavedení fluoru do organických molekul je pomocí elektrofilního fluoru. Další možností je využití nukleofilní fluoralkylace, která zahrnuje adici fluorovaného karbaniontu na elektrofil. Tento syntetický přístup se stal nejdůležitějším a nejrychleji rostoucím odvětvím chemie fluoru.

V kontextu naší předešlé práce, zabývající se adicí 2-fluormalonátu na  $\alpha,\beta$ -nenasyčené aldehydy<sup>2</sup>, jsme naši pozornost věnovali adici 1-(fluornitromethylsulfonyl)benzenu na  $\alpha,\beta$ -nenasyčené aldehydy<sup>3</sup>. Tato jednoduchá metoda může sloužit pro přípravu zajímavých produktů pro farmaceutický průmysl, například stavebních jednotek pro syntézu léčiv nebo fluorem značených biologicky značených látek.



Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT ČR MSM0021620857 a Grantové agentury ČR P207/10/0428.

#### LITERATURA

1. Miller K., Faeh C., Didrich F.: *Science* 317, 1881 (2007).
2. Companyó X., Hejnová M., Kamlar M., Veselý J., Moyano A., Rios R.: *Tetrahedron Lett.* 50, 5021 (2009).
3. Kamlar M., Bravo N., Alba A.-N. R., Hybelbauerová S., Císařová I., Veselý J., Moyano A., Rios R.: *Chem. Eur. J.* v tisku (DOI: 10.1002/ejoc.201000851) (2010).

### INHIBICE NITRIC OXID SYNTETAS (NOS) KOBALT BIS(DIKARBOLLIDOVÝMI) DERIVÁTY

**ROBERT KAPLÁNEK<sup>a</sup>, JAKUB RAK<sup>a</sup>, VLADIMÍR KRÁL<sup>a</sup>, TOM SHEA<sup>b</sup>, MARKANDESWAR PANDA<sup>b</sup>, SATYA PANDA<sup>b</sup>, BETTIE SUE MASTERS<sup>b</sup>, PAVEL MARTÁSEK<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha; <sup>b</sup>Dept. of Biochemistry, University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA; <sup>c</sup>1. Lékařská fakulta UK, Praha robert.kaplanek@vscht.cz

V posledních dvou dekadách jsou borové klastry (borany, karborany, dikarbollidy, metalakarborany) díky svým pozoruhodným vlastnostem v hledáčku vědců zabývajících se medicínou, materiálovou či supramolekulární chemií. Tyto nepřirodní sloučeniny jsou intenzivně studovány jako modulatory enzymové aktivity (modulace aktivity HIV proteasy či protein kinasy C)<sup>1,2</sup>.

Z tohoto důvodu jsme připravili sérii derivátů kobalt bis(dikarbollidu) a testovali je jako ligandy pro vazbu na specifické isoformy nitric oxid syntetas (eNOS, nNOS, iNOS) a studovali jejich aktivační či inhibiční vliv na tvorbu NO.

Připravené kobalt bis(dikarbollidové) deriváty jsou syntetická analoga přírodních hydrofobních inhibitorů NOS. Borový kluster je záporně nabit (náboj je rovnoměrně rozložen mezi 45 atomů), velice chemicky a biologicky odolný, tvoří netradiční vodíkové vazby, např. s proteiny.

Přímé použití kobalt bis(dikarbollidových) derivátů je komplikované z důvodu jejich nízké rozpustnosti a spontánní agregaci ve vodě<sup>3</sup>. Z tohoto důvodu jsme připravili a testovali jejich komplexy s biokompatibilními excipienty.

Většina z testovaných látek vykazuje efektivní inhibici NOS. Některé deriváty vykazují rozdílnou inhibiční aktivitu pro různé isoformy „nitric oxide“ syntetas.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (projekt LC512), GAČR (grant 203/09/1311) a NIH (grant GM52419).

#### LITERATURA

1. Řezáčová P., Pokorná J., Brynda J., Kožíšek M., Cígler P., Lepšík M., Fanfrlík J., Řezáč J., Grantz Šašková K., Siegllová I., Plešek J., Šícha V., Grüner B., Oberwinkler H., Sedláček J., Krausslich H. G., Hobza P., Král V., Konvalinka J.: *J. Med. Chem.* 52, 7132 (2009).
2. Valliant J. F., Guenther K. J., King A. S., Morel P., Schaffer P., Sogbein O. O., Stephenson K. A.: *Coord. Chem. Rev.* 232, 173 (2002).
3. Rak J., Kapláník R., Král V.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 1045 (2010).

### SYNTÉZA SELENOVÝCH ANALOGŮ ANTITUBERKULOTICKY ÚČINNÝCH 1-R-5-ALKYLSULFANYL-1H-TETRAZOLŮ

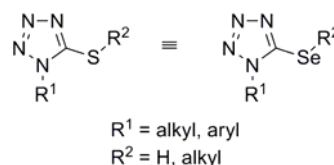
**GALIŇA KARABANOVICH, JAROSLAV ROH, KATEŘINA VÁVROVÁ, ALEXANDR HRABÁLEK**

Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové jaroslav.roh@faf.cuni.cz

Chemie selenových sloučenin je do jisté míry obdobná s chemií sloučenin sírných, ale oproti sírným sloučeninám jsou organické sloučeniny selenu mnohem méně prostudovány, ať už z důvodu jejich časté nestability, tak i z důvodu jejich možné toxicity. V poslední době se však ukazuje, že ne všechny sloučeniny selenu musí být díky své potenciální toxicitě předem vyloučeny z jakékoli farmaceutické aplikace. Nejenže byla potvrzena esencialita selenu pro lidský organismus a selen byl objeven například v aktivním místě lidské glutathionperoxidasy (GSHPx), specifické organické sloučeniny selenu navíc vykazují různorodou biologickou aktivitu.

Základním strukturálním motivem velké skupiny antituberkuloticky účinných látek, syntetizovaných na Farmaceutické fakultě UK, je 1-alkyl/aryl-1H-tetrazol-5-thiol<sup>1</sup>.

Cíl této práce spočívá ve studiu selenových analogů těchto látek, především v nalezení vhodných postupů jejich přípravy, optimalizaci syntéz a hodnocení jejich antituberkulotické aktivity.



V rámci této práce byly provedeny pokusy o syntézu 1-cyklohexyl a 1-fenyl-1H-tetrazol-5-selenolů z odpovídajících isoselenokyanátů, avšak bez úspěchu. Ve vodném prostředí však byly připraveny jejich sodné soli, které byly úspěšně alkylovány v podmínkách mezifázové katalýzy. Touto

metodou byla připravena série cílových 1-alkyl-5-alkylselanyl-1*H*-tetrazolů. V případě alkylace 1-aryl-1*H*-tetrazol-5-selenolátů byly překvapivě jako hlavní produkty izolovány 2-alkyl-1-aryl-1*H*-tetrazol-5(2*H*)-selenony. Jedná se o zásadně odlišnou regioselektivitu v porovnání s alkylacemi kyslíkatých, resp. sírných analogů těchto látek.

Práce vznikla za podpory VZ MŠMT ČR (MSM 0021620822) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK č. projektu 55610/2010)

## LITERATURA

1. Waisser K., Kuneš J., Hrabálek A., Macháček M., Odlerová Z.: Collect. Czech. Chem. Commun. 61, 791 (1996).

### CYKLODEXTRIN-PORFYRINY: SUPRAMOLEKULÁRNÍ SYSTÉM PRO CÍLENÝ TRANSPORT A KOMBINOVANOU TERAPII

**ZDENĚK KEJÍK<sup>a,b</sup>, TOMÁŠ BŘÍZA<sup>a,b</sup>, PAVLA  
POUČKOVÁ<sup>b</sup>, JARMILA KRALOVÁ<sup>c</sup>, VLADIMÍR  
KRÁL<sup>a,d</sup>, PAVEL MARTÁSEK<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>VŠCHT, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>1. LF UK, 121 08 Praha 2; <sup>c</sup>ÚMG AV ČR, 142 20 Praha 4, <sup>d</sup>Zentiva R & D (Sanofi-Aventis group), U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10  
vladimir.kral@vscht.cz, zkejik@centrum.cz

Léčba rakoviny je závažný problém moderní medicíny. Řešení je buďto vývoj nových léčiv, nebo lepší užití současných. Jsou známy dvě základní metody pro tyto účely kombinovaná terapie a cílený transport léčiv.

Z tohoto důvodu jsme připravili cyklodextrin-porfyriny, jejich zinečnaté matolokomplexy, testovali jejich interakce s léčivými proteiny a jejich protinádorovou účinnost v *in vivo* a *in vitro* studiích<sup>1-3</sup>.

Hodnoty stanovených konstant stability ukázaly dostatečně silnou stabilitu inkluzního komplexu při pH krve a snadné uvolnění léčiva při pH nádorových buněk. Spektroskopické studie zaměřené na interakce zinečnatých metalokomplexů těchto konjugátů a vybraných biopolymerů používaných pro transport cytostatik, ukázaly dostatečně silnou interakci pro použití v DDS aplikacích. Vysoký potenciál tohoto supramolekulárního přístupu byl potvrzen následnými studiemi *in vivo* a *in vitro*.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (Granty 1M 6837805002, LC 512, MSM6036137307, MSM0021620857, LC06077, AV0Z50520514; a MSM6036137307), GAČR (Grant 203/09/1311), NIH (grant GM52419) projektu AV0Z50520514 a grantu KAN200200651 GA AV ČR.

## LITERATURA

1. Kejik Z., Bříza T., Poučková P., Králová J., Král V., Martásek P.: J. Controlled Release 132, e27 (2008).
2. Král V., Bříza T., Kejik Z., Králová J., Poučková P.: CZ 300197 (2009); Chem. Abstr. 152, 343563 (2009).

3. Králová J., Kejik Z., Bříza T., Poučková P., Král A., Martásek P., Král V.: J. Med. Chem. 53, 128 (2010).

### HOVEYDOVY-GRUBBSOVY KOMPLEXY MODIFIKOVANÉ FLUOROVÝMI NHC LIGANDY

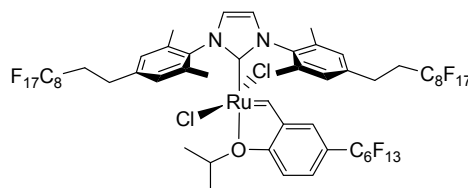
**VENDULA KELBICOVÁ, MARIO BABUNĚK,  
JAROSLAV KVÍČALA**

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5,  
166 28 Praha 6

vendula.kelbichova@vscht.cz

*N*-Heterocyklické karbeny (NHC) jako ligandy v Grubbsových a Hoveydoových-Grubbsových katalyzátorech zvyšují jejich stabilitu i katalytickou aktivitu v metatezi alkenů<sup>1</sup>. Fluorová chemie umožňuje recyklaci komplexů přechodných kovů extrakcí do perfluorovaného rozpouštědla nebo chromatografií na fluorové pevné fázi (FSPE)<sup>2</sup>.

Jedním z našich současných projektů je příprava a komplexace fluorových NHC ligandů. Za účelem zvýšení fluorofility jsme pro modifikaci dříve publikované syntézy klíčové imidazoliové soli založené na Heckově reakci s bis(jodaryl)diiminem<sup>3</sup> využili (perfluoroktyl)ethen. Její deprotonací s *terc*-pentylalkoholátem draselným v hexanu jsme *in situ* připravili karben, který jsme převedli reakcí s Grubbsovým katalyzátorem 1. generace na odpovídající fluorový katalyzátor 2. generace. Vzhledem k jeho obtížné izolaci jsme jej ihned působením perfluoralkylovaného 2-isopropoxystyrenu transformovali na vícenásobně fluorovaný Hoveyduv-Grubbsův katalyzátor 2. generace, izolovatelný pomocí sloupcové chromatografie.



Připravený fluorový katalyzátor vykázal v modelové metatezi diethyl-diallylmalonátu s uzavřením cyklu vyšší aktivitu než Grubbsův katalyzátor 1. generace.

Děkujeme Grantové agentuře České republiky (grant č. 207/10/1533) a Ministerstvu školství, mádeže a tělovýchovy (výzkumné centrum LC 06070, výzkumný záměr č. 6046137301) za finanční podporu.

## LITERATURA

1. Peters J., Thomas C., v knize: *Comprehensive Organometallic Chemistry* (Crabtree R. H., P. Mingos D. M., ed.) Elsevier 2007 (el. verze) sv. 1, s. 66.
2. Gladysz J. A. a da Costa R. C., v knize: *Handbook of Fluorous Chemistry* (Gladysz, J. A., Curran, D. P., Horváth, I. T., ed.) Wiley-VCH 2004, s. 24.



3. Kelbichová V., Skalický M., Kvíčala J.: Chem. Listy 103, 961 (2009).

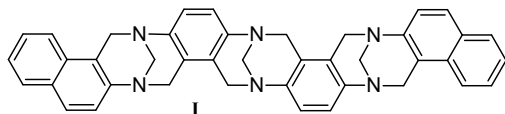
### SYNTÉZA A STUDIUM VAZEBNÝCH VLASTNOSTÍ *tris*-TRÖGEROVÝCH BAZÍ VHODNÝCH PRO ANALYTICKÉ APLIKACE

JIŘÍ KESSLER\*, MARTIN HAVLÍK, VÁCLAV PARCHAŇSKÝ, BOHUMIL DOLENSKÝ

Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha kesslerj@vscht.cz

Kavitandy jsou látky schopné navázat do své kavity externí sloučeninu. Do této skupiny látek se řadí např. molekulární kleště a pinzety<sup>1</sup>. Díky jejich vazebným vlastnostem nacházejí uplatnění jako specifické receptory a jsou například funkční součástí chemických senzorů či stacionárních fází chromatografických technik<sup>2</sup>. Jednou ze skupin látek mající výše uvedené vlastnosti jsou nedávno objevené *tris*-Trögerovy báze (*tris*-TB). Tyto látky mohou tvořit 3 diastereoisomery. Isomer „*anti,anti*“ nemá strukturu tweezeru ani clipsu, zatímco isomer „*syn,anti*“ strukturně spadá do molekulárních pinzet a isomer „*syn,syn*“ do kleští<sup>3</sup>.

Práce se zabývá přípravou, izolací, identifikací (prostřednictvím technik 1D a 2D NMR spektrometrie) diastereoisomerů *tris*-Trögerových bazí, jejich vzájemnou přeměnou pomocí isomerizace v různém prostředí. Jmenovitě byly připraveny všechny diastereoisomery látky **I** (obr. 1). Na jednotlivých isomerech byly provedeny komplexační studie s vybranými analyty.



Obr. 1. Strukturní vzorec *tris*-TB

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR MSM 6046137307 a LC06077.

#### LITERATURA

- Lehn J. M.: *Supramolecular chemistry: concepts and perspectives*; VCH, Weinheim 1995.
- Kamieth M., Burkert U., Corbin P. S., Dell S. J., Zimmerman S. C., Klärner F.-G.: *Eur. J. Org. Chem.* 1999, 2741.
- Hansson A., Wixe T., Bergquist K. E., Wärnmark K.: *Org. Lett.* 7, 2019 (2005).

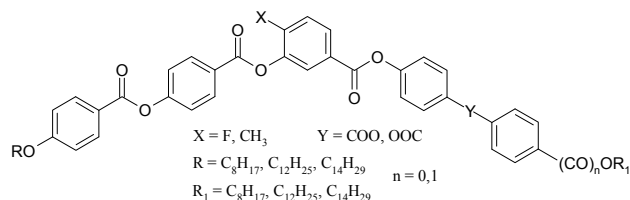
### DESIGN A SYNTÉZA NEMATICKÝCH LOMENÝCH KAPALNÝCH KRYSŤALŮ

MICHAL KOHOUT<sup>a</sup>, JIŘÍ SVOBODA<sup>a</sup>, VLADIMÍRA NOVOTNÁ<sup>b</sup>, MILADA GLOGAROVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Fyzikální ústav AV ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8

Michal.Kohout@vscht.cz

Lomené kapalné krystaly patří pro své polární vlastnosti do popředí zájmu v oblasti materiálové chemie<sup>1</sup>. Nedávno jsme do této oblasti zavedli nový typ centrálního jádra založený na 8-substituované 7-hydroxynaftalen-2-karboxylové kyselině<sup>2-4</sup> a studovali jsme vliv orientace esterových spojek na celkové mesomorfní chování syntetizovaných materiálů. U série sloučenin s inverzním uspořádáním polárních esterových spojek jsme identifikovali unikátní sekvenci nematické a polární kolumnární fáze<sup>2</sup>. Vzhledem k tomu, že nematická fáze lomených kapalných krystalů může potenciálně vykazovat biaxiální vlastnosti<sup>5</sup>, rozhodli jsme se studovat vliv orientace esterových funkcí u nových sloučenin odvozených od 4-substituované (X=F, CH<sub>3</sub>) 3-hydroxybenzoové kyseliny (Obr. 1).



Obr. 1. Obecná struktura studovaných materiálů

Připravené materiály byly studovány metodami optické polarizační mikroskopie (POM) a diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Bude diskutován vliv laterální substituce centrálního jádra, orientace polárních esterových spojek a délky terminálního alkylového řetězce na mesomorfní chování připravených látek. Mesomorfní vlastnosti budou porovnány s vlastnostmi dříve studovaných materiálů.

Práce vznikla za podpory grantů GAČR (grant č. 202/09/0047), GAAV (grant č. IAA100100911) a MŠMT ČR (projekt č. MSM 6046137301).

#### LITERATURA

- Niori T., Sekine T., Watanabe J., Furukawa T., Takezoe H.: *J. Mater. Chem.* 6, 1231 (1996).
- Kohout M., Svoboda J., Novotná V., Pociacha D., Glogarová M., Gorecka E.: *J. Mater. Chem.* 19, 3153 (2009).
- Kohout M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Pociacha D.: *Liq. Cryst.* 37, 987 (2010).
- Kohout M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Baumeister U., Pociacha D.: *Liq. Cryst.*, zasláno do tisku.
- Tschierske C., Photinos D. J.: *J. Mater. Chem.* 20, 4263 (2010).

## IN VITRO ANTIINFEKČNÍ AKTIVITA 5,6-SUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ PYRAZIN-2,3-DIKARBONITRILU

**KAMIL KOPECKÝ, PETR ZIMČÍK, VERONIKA  
NOVÁKOVÁ, MARTIN DOLEŽAL**

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci  
Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv,  
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
kamil.kopecky@faf.cuni.cz

Deriváty 5,6-substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů jsou používány jako prekurzory pro přípravu pyrazinoporfyrasinů<sup>1</sup>. Ale současně jsou deriváty pyrazinu intenzivně studovány pro jejich antiinfekční (antibakteriální, antifungální a antituberkulotické) účinky<sup>2</sup>.

Deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu byly testovány na *in vitro* aktivitu vůči 8 kmenům bakterií, 8 kmenům hub a mykobakteriím. Provedené testy ukázaly vztah mezi strukturou a *in vitro* aktivitou, kde byli účinné pouze alkylaminoderiváty, a to pouze na G+ bakterie a mykobakterie. Některé alkyloxy- a alkylsulfanylderiváty vykazaly aktivitu pouze proti mykobakteriím. Inhibiční aktivity testovaných sloučenin byly porovnány s inhibičními aktivitami používaných antiinfekčních látek. Pro předpokládanou vysokou cytotoxicitu nejúčinnějších sloučenin byla testována i cytotoxicita na jaterních buňkách HEP G2. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že poměr mezi aktivitou připravených účinných derivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu je vyšší než 10. Tento poměr dává naději pro jejich další testování.

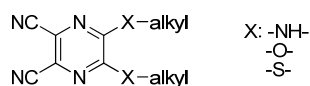


Schéma 1. Obecná struktura testovaných sloučenin

Tato práce vznikla za podpory Výzkumného záměru MŠMT ČR MSM0021620822.

### LITERATURA

- Zimcik P., Novakova V., Miletin M., Kopecky K.: *Macroheterocycles* 1, 21 (2008).
- Doležal M., Zitko J., Kešetovičová D., Kuneš J., Svobodová M.: *Molecules* 14, 4180 (2009).

## SYNTEZA POLYARENŮ S VYUŽITÍM AKTIVACE C-C VAZEB

**ALEŠ KOROTVIČKA<sup>a</sup>, MARTIN KOTORA<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6 akorot@seznam.cz, kotora@natur.cuni.cz

Zatímco tvorba nových C-C vazeb je základním prvkem organické syntézy, metody založené na jejich štěpení jsou

používány poměrně zřídka. Syntetický postup založený na štěpení vazby C–C lze úspěšně aplikovat například na pnuté karbocyklické systémy. Vhodnými substráty jsou například sloučeniny obsahující cyklopropanový nebo cyklobutanový kruh.

Bifenylen **1** je typická látka, obsahující pnutý čtyřčlenný kruh, jenž snadno podléhá oxidativní adici s některými komplexy přechodných kovů (Ir, Rh, Ni, Co, Pd, Pt, Fe) za vzniku metalacyklopentanů (Schéma 1)<sup>1</sup>. V našem případě jsme se zaměřili na katalytické reakce bifenylenů s alkylny a nitrily v přítomnosti komplexů iridia a rhodia. Reakcí alkylnů, resp. nitrilů byla připravena řada příslušných fenanthrenů **2**, resp. fenanthridinů **3**. Tento protokol byl aplikován i na penta-fenylen **4**. Za pozornost zde stojí selektivita reakce – v reakční směsi byly detekovány jako produkty inserce pouze picyeny **5** (schéma 2).

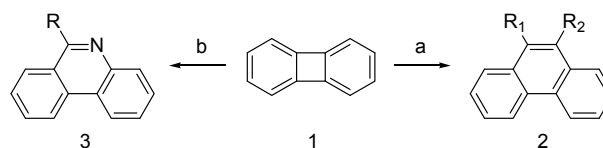


Schéma 1. a)  $[\text{IrCl}(\text{cod})_2]$ , dppe,  $\text{R}^1\text{CCR}^2$ , toluen b)  $[\text{RhCl}(\text{cod})_2]$ , dppe, RCN

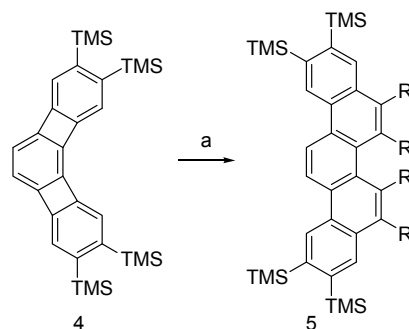


Schéma 2. a)  $[\text{IrCl}(\text{cod})_2]$ , dppe,  $\text{R}^1\text{CCR}^1$ , toluen

Tento projekt byl financován z Centra pro nová antivirotika a antineoplastika MŠMT.

### LITERATURA

- Shibata T., Nishizawa G., Endo K.: *Synlett* 5, 765 (2008).

## VYUŽITÍ DIHYDROPURINŮ K SELEKTIVNÍ SYNTEZE 7-SUBSTITUOVANÝCH A 6,7-PŘEMOSTĚNÝCH PURINŮ

**VLADISLAV KOTEK, DALIMIL DVOŘÁK**

Ústav organické chemie, Fakulta chemické technologie  
VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6  
vladislav.kotek@vscht.cz

Purinový skelet představuje důležitý motiv v živých systémech. Není proto překvapující, že mnoho 9- ale i 7-substituovaných purinových derivátů vykazuje biologickou

aktivitu<sup>1</sup>. Doposud známé metodiky syntézy 7-substituovaných purinů jsou komplikované nebo vykazují nízkou selektivitu. Proto v naší laboratoři věnujeme pozornost dihydropurinům **1**. Ukázali jsme, že slouží jako cenné intermedie při transformacích purinového skeletu a lze je využít například k syntéze 7-substituovaných purinů **2**.

Námi vypracovaná metodika je znázorněna ve Schématu 1. Vyniká jednoduchostí, vysokými výtěžky a excellentní tolerancí funkčních skupin. Je omezena pouze možnostmi derivatizace dihydropurinů v poloze 7. Dále jsou diskutovány možnosti přípravy 7,9-disubstituovaných dihydropurinů.

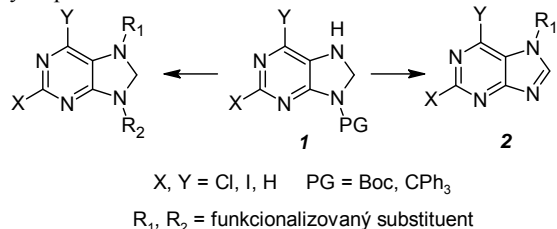


Schéma 1. Příprava 7-substituovaných purinů

Ze Schématu 2 je patrné, že dihydropuriny **3** nabízí efektivní cestu k přemostění poloh 6 a 7. Toto lze uskutečnit například intramolekulární Heckovou nebo Negishiho reakcí pro tvorbu karbocyklických derivátů, resp. Buchwald-Hartwigovou reakcí pro tvorbu heterocyklických derivátů. Budou prezentovány doposud dosažené výsledky.

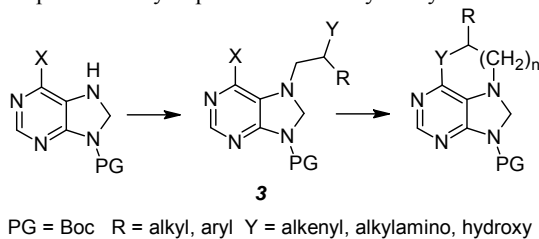


Schéma 2. Syntéza 6,7-přemostěných purinů

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR č. 203/09/1552 a Centra základního výzkumu LC06070 MŠMT.*

## LITERATURA

- Rosemeyer H.: Chem. Biodivers. 2004, 361.

## SYNTÉZA 1-(INDOL-2-YL)-2-DEOXYRIBOSIDŮ

DAVID NEČAS<sup>a</sup>, DENISA HIDASOVÁ<sup>a</sup>,  
MICHAL HOCEK<sup>b</sup>, MARTIN KOTORA<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6 kotora@natur.cuni.cz

1-(Indol-2-yl)sacharidy tvoří skupinu přírodních látek, které tvoří důležitou součást řady proteinů vykazující zajímavé

biologické vlastnosti. Z toho hlediska je vývoj obecné metody přípravy substituovaných indolylsacharidů žádaným syntetickým problémem. Náš přístup je zaměřen na syntézu 1-(indol-2-yl)deoxyribosidů s využitím 1-ethynyldeoxyribosidů. 1-Alkynyldeoxyribosidy se již dříve osvědčily jako vhodný syntetický intermedie pro přípravu  $\alpha$  a  $\beta$  substituovaných derivátů deoxyribosy nesoucí arylové<sup>1</sup>, alkynyllové<sup>2</sup> či alkylidenbutenolidové<sup>3</sup> skupiny v postranním řetězci.

Po testování řady možných postupů se jako nejuniverzálnější ukázal být 2-krokový přístup založený na Sonogashirově reakci a následovaný intramolekulární cyklizací. Sonogashirova reakce 1-ethynyldeoxyribosy se substituovanými 2-haloaniliny poskytly odpovídající substituované alkynyldeoxyribosidy, jež byly v následujícím kroku cyklizovány v přítomnosti katalytického množství palladiového komplexu na odpovídající 1-(indol-2-yl)deoxyribosidy. Odstraněním chránících skupin ze sacharidové části byly získány volné indolyldeoxyribosidy.

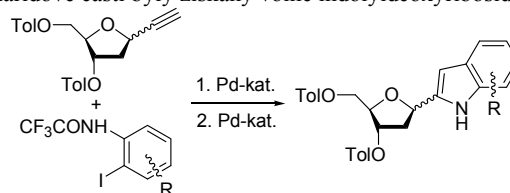


Schéma 1

*Tato práce vznikla za podpory grantu MSM0021620857, Z40550506, a 1M0508.*

## LITERATURA

- (a) Novák P., Pohl R., Hocek M., Kotora M.: Org. Lett. 8, 2051 (2006); (b) Novák P., Čihalová S., Otmar M., Hocek M., Kotora M.: Tetrahedron 64, 5200 (2008).
- Novák P., Pour M., Špulák M., Votruba I., Kotora M.: Synthesis 2008, 346.
- Bobula T., Hocek M., Kotora M.: Tetrahedron 66, 530 (2010).

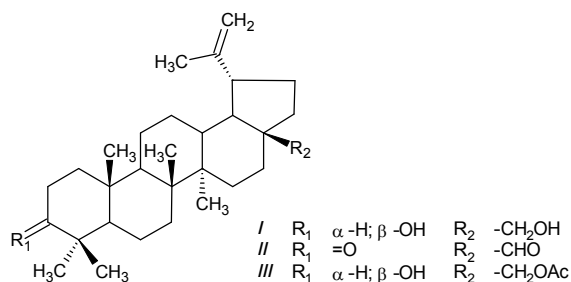
## ELEKTROCHEMICKÉ PŘEMĚNY BETULINU

JAN KOŤUHA, JAN HRDLIČKA, VÁCLAV RICHTR

FPE ZČU v Plzni, Veleslavínova 42, 303 74 Plzeň  
SaulH@Seznam.cz, hrdlicka@kch.zcu.cz, richtr@kch.zcu.cz

Ve snaze o přeměnu betulinu (*I*) na betulonaldehyd (*II*) byla provedena série elektrochemických reakcí sledovaných tenkovrstvou chromatografií. Původní elektrolyt tvořený kyselinou octovou s přidavkem chloridu draselného, při jehož použití vzniká směs špatně dělitelných produktů, z nichž dva vykazují pozitivní Beilsteinovu reakci<sup>1</sup>, byl nahrazen kyselinou octovou s přidavkem octanu sodného (10 % m/m).

Ve zdokonaleném elektrolyzátoru tvořeném nerezovou katodou o ploše 110 cm<sup>2</sup> oddělenou skleněnou fritou S4 od platinové anody o ploše 60 cm<sup>2</sup> byl v anodickém prostoru za míchání podroben 36 hodinové reakci při napětí 1,4 V a proudu 3 mA roztok 100 mg betulinu v 250 ml elektrolytu.



Po zředění reakčního produktu vodou, vytřepání do chloroformu a vysušení síranem sodným byl získán odparek, který preparativní tenkovrstvou chromatografií na silikagelu ve směsi hexanu a ethyl-acetátu (10 : 3) poskytl vedle nezreagovaného betulinu v poměru 1:1 výrazně pohyblivější produkt t. t. 210–212 °C, který byl pomocí IR a <sup>1</sup>H-NMR spektroskopie identifikován jako betulin-28-acetát (III), který lze připravit také parciální acetylací betulinu<sup>2</sup>. Zajímavé na této reakci je to, že složení reakčního produktu se prakticky nemění ani při použití elektrolytu ředěného vodou.

*Autoři děkují prof. RNDr. Jiřímu Klinotovi, CSc. za pomoc při identifikaci produktu reakce.*

*Tato práce je realizována s přispěním finančních prostředků projektu ZČU v Plzni SGS-2010-051.*

#### LITERATURA

- Kořuha J., Hrdlička J.: Chem. Listy 103, 965 (2009).
- Thibeault D., Gauthier C., Legault J., Bouchard J., Dufour P., Pichette A.: Bioorg. Med. Chem. 15, 6144 (2007).

#### STUDIUM LOMENÝCH KAPALNÝCH KRYSTALŮ ODVOZENÝCH OD BIARYLKARBOXYLOVÝCH KYSELIN

**ANNA KOVÁŘOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ SVOBODA<sup>a</sup>, VLADIMÍRA NOVOTNÁ<sup>b</sup>, MILADA GLOGAROVÁ<sup>b</sup>**

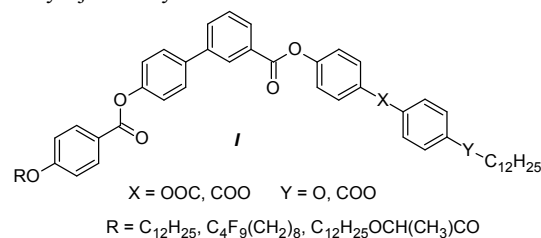
<sup>a</sup>Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6;

<sup>b</sup>Fyzikální ústav AV ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8  
kovarova@vscht.cz

Lomené kapalně krystalické krystaly na sebe upoutaly pozornost díky svým jedinečným vlastnostem a schopnosti tvořit polární mezofáze<sup>1</sup>. Nejnověji se dostávají do popředí zájmu jako vhodné strukturální typy pro tvorbu biaxiální nematické fáze<sup>2,3</sup>. Předpokládá se, že látky s biaxiální nematickou fází by umožňovaly podstatně rychlejší přepínání, než je možné u současných displejů založených na uniaxiálních nematikách.

Cílem této práce je prezentovat syntézu a fyzikální vlastnosti lomených kapalných krystalů odvozených od 5-fenylthiofenkarboxylových kyselin lišících se orientací a typem polárních spojek a koncovým alkylem, porovnat tyto látky s analogickými deriváty odvozenými od

bifenylkarboxylové kyseliny (I), a dále porovnat získané výsledky s již známými látkami<sup>4,5</sup>.



Mesomorfní vlastnosti připravených látek byly studovány metodami optické polarizační mikroskopie, diferenční skenovací kalorimetrie a rentgenostrukturní analýzou.

*Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR (grant č. 202/09/0047), GAAV (grant č. IAA100100911) a MŠMT ČR (projekt č. MSM 6046137301).*

#### LITERATURA

- Niori T., Sekine T., Watanabe J., Furukawa T., Takezoe H.: J. Mater. Chem. 6, 1231 (1996).
- Madsen L. A., Dingemans T. J., Nakata M., Samulski E.T.: Phys. Rev. Lett. 92, 145505 (2004).
- Tschierske C., Photinos D. J.: J. Mater. Chem. 20, 4263 (2010).
- Weissflor W., Naumann G., Kořata B., Schröder M. W., Eremin A., Diele S., Vakhovskaya Z., Kresse H., Friedemann R., Krishnan A. A. R., Pelzl G.: J. Mater. Chem. 15, 4328 (2005).
- Kohout M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Pocięcha D.: Liq. Cryst. 37, 987 (2010).

#### SYNTÉZA A VLASTNOSTI NOVÝCH KAPALNÝCH KRYSTALŮ NA BÁZI BENZO[b]THIOFENU

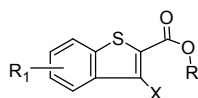
**VÁCLAV KOZMÍK<sup>a</sup>, MILAN KURFÜRST<sup>a</sup>, MARKÉTA SLABOCHOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ SVOBODA<sup>a</sup>, VLADIMÍRA NOVOTNÁ<sup>b</sup>, MILADA GLOGAROVÁ<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, VŠCHT, 166 28 Praha 6,

<sup>b</sup>Fyzikální ústav, AV ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8  
Vaclav.Kozmik@vscht.cz

V rámci systematického výzkumu a vývoje nových termotropních kapalných krystalů s heterocyklickými centrálními jádry byl zkoumán vliv postranních řetězců, místa jejich napojení na centrální jádro a vliv laterálního substituentu (H, Cl, CH<sub>3</sub>) v poloze 3 centrálního benzothiofenového jádra (obr. 1) na mesomorfní chování nově připravených kapalných krystalů. V této práci je uvedena syntéza jednotlivých centrálních jader a syntéza konečných cílových produktů. Syntéza centrálního jádra s chlorem v poloze 3 vycházela ze substituovaných skořicových kyselin, které Higovou reakcí<sup>1</sup> poskytly vhodné intermediáty pro další syntézu cílených molekul. Methylderivát byl připraven cyklizační reakcí<sup>2</sup> a následnou adicí připravené soli na oxid uhličitý byla připravena

základní stavební kyselina pro deriváty s methylovou skupinou v poloze 3. V další části je pak diskutován vliv vazebných úhlů, typů řetězců a laterálních substituentů na mesomorfní chování připravených látek.



X = H, Cl, CH<sub>3</sub>

R, R<sub>1</sub> = alkyloxy, popř. aryloxy prodlužující řetězce

Obr. 1. Obecný vzorec centrálního benzo[*b*]thiofenového jádra

Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR (grant č. 202/09/0047), GAAV (grant č. IAA100100911) a MŠMT ČR (projekt č. MSM 6046137301).

#### LITERATURA

1. Higa T., Krubsack A. J.: J. Org. Chem. 40, 3037 (1975).
2. Campaigne E., Dinner A., Neiss E. S.: J. Heterocycl. Chem. 7, 695 (1970).

### NOVÉ SALICYLANILIDOVÉ ESTERY S POTENCIÁLNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ A ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITOU

**MARTIN KRÁTKÝ<sup>\*a</sup>, JARMILA VINŠOVÁ<sup>a</sup>, VLADIMÍR BUCHTA<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>KAOCH, FarmF UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; <sup>b</sup>KBLV, FarmF UK a Fakultní nemocnice a LF UK v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 12 Hradec Králové martin.kratky@faf.cuni.cz

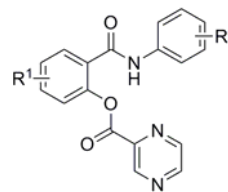
V poslední době je hojně diskutovaným problémem antibiotická rezistence. Navíc se zdá, že tyto rezistentní kmeny se stávají postupně virulentnějšími. Tato problematika se tak úzce dotýká celé populace, např. výskyt mehicillin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA) je vážným terapeutickým problémem. Podobná je situace i u jiných G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterií. Analogické problémy se vyskytují i v případě houbových patogenů, také zde byla popsána multiléková rezistence<sup>1</sup>.

U salicylanilidů byly popsány mj. antifungální, antibakteriální a antimykobakteriální účinky<sup>1,2</sup>. Proto jsme se zaměřili na přípravu a hodnocení jejich *O*-esterů jakožto derivátů, u kterých jsme díky změně fyzikálně-chemických vlastností předpokládali zvýšení antimikrobiální aktivity. V tomto sdělení navazujeme na naši předchozí práci v této oblasti<sup>1,3</sup>.

Zde prezentujeme sérii esterů halogenovaných salicylanilidů s kyselinou pyrazin-2-karboxylovou, které byly připraveny osvědčenou a zavedenou metodikou kondenzace s využitím *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu<sup>1,3</sup>.

Tyto deriváty byly testovány *in vitro* vůči osmi houbovým a osmi bakteriálním kmenům. Bude podrobně prezentována jejich antibakteriální a antifungální aktivita. Všechny deriváty mají velmi dobrou aktivitu vůči G<sup>+</sup> kmenům včetně MRSA (MIC od 0,98 μmol/l), vůči G<sup>-</sup> bakteriím působily jen některé. Pyrazinoáty salicylanilidů obecně působí

lépe na vláknité houby (MIC od 1,95 μmol/l) než na kandidy, které jsou navíc vůči některým esterům necitlivé.



Tato práce vznikla za podpory grantů GAUK 27610/2010, IGA NS 10367-3 a SVV-2010-261-001.

#### LITERATURA

1. Krátký M., Vinšová J., Buchta V., Horvati K., Bösze S., Stolaříková J.: Eur. J. Med. Chem., v recenzním řízení.
2. Vinšová J., Imramovský A.: Cesk. Slov. Farm. 53, 294 (2004).
3. Imramovský A., Vinšová J., Férriz J. M., Buchta V., Jampílek J.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 19, 348 (2009).

### SYNTÉZA ANALOG 5,6-DIHYDRO-2H-PYRAN-2-ONU

**ONDŘEJ KRENK, MILAN POUR**

Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové kreno3aa@faf.cuni.cz

Strukturální obměnami přírodního butenolidu inkrustoporinu s antifungálním účinkem byly získány látky, srovnatelné s amfotericinem B *in vitro*<sup>1,2</sup>. Studie biologické aktivity analogických laktonů<sup>2</sup> ukázaly, že cytostatickou aktivitu vykazují rovněž látky s analogickým šestičlenným kruhem. Další krok obměny skeletu inkrustoporinu proto vedl k syntéze šestičlenných analogů tj. 5,6-dihydro-2H-pyran-2-onů<sup>2</sup>.

Cílem práce je vyvinout optimální syntézu šestičlenných nenasyčených laktonů a jejich analog. Navržené cesty vycházejí z retrosyntéz syntonů **1** a **2**. Laktonizace syntonu **1** je katalyzována bází za vzniku karboaniontu. Jedná se o intramolekulární Claisenovu kondenzaci s následnou kyselé katalyzovanou eliminací za vzniku α,β-nenasyceného δ-laktonu. Uzavření laktonového kruhu syntonu **2** je zamýšleno pomocí metathese Grubbsovým katalyzátorem.

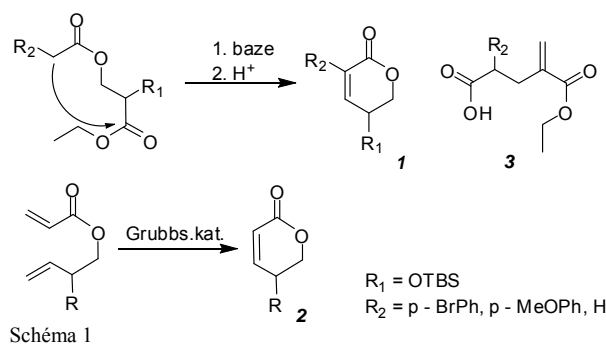


Schéma 1

Kysele katalyzovaná laktonizace nevedla k požadovanému syntonu **1**. Místo Claisenovy kondenzace proběhla nukleofilní substituce a eliminace za vzniku majoritního produktu (**3**).

Práce vznikla za podpory Centra pro výzkum nových antivirotik a antineoplastik, podporovaného MŠMT ČR (1M0508), Grantové agentury ČR (projekt č. 203/07/1302) a výzkumného záměru MŠMT ČR (MSM0021620822).

#### LITERATURA

1. Zapf S., Anke T., Sterner O.: *Acta Chem. Scand.* 49, 223 (1995).
2. Schiller R.: *Disertační práce*, Faf UK Hradec Králové (2004).

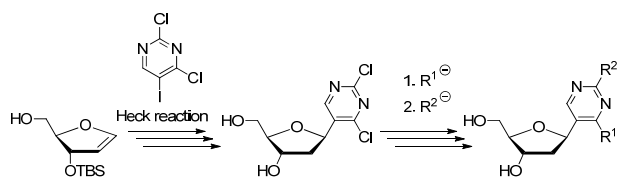
### SEQUENTIAL REGIOSELECTIVE SYNTHESIS OF 2,4-DISUBSTITUTED PYRIMIDIN-5-YL C-2-DEOXYRIBONUCLEOSIDES

**TOMÁŠ KUBELKA, LENKA SLAVĚTÍNSKÁ, MICHAL HOCEK\***

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Flemingovo nám. 2, 16610 Praha 6  
kubelka@uochb.cas.cz, hocek@uochb.cas.cz*

C-nucleosides bearing hydrophobic aryl groups as nucleobase are interesting compounds with wide range of applications in chemical biology, for example in extension of the genetic alphabet<sup>1</sup>. There are several synthetic approaches to C-nucleosides, but none of them is truly general and many of them suffer from poor selectivity and low yields<sup>2</sup>.

A new modular synthesis of diverse 2,4-disubstituted pyrimidin-5-yl C-2'-deoxyribonucleosides by sequential regioselective reactions of 2,6-dichloropyrimidin-5-yl C-nucleoside was developed<sup>3</sup>. The intermediate was prepared by the Heck coupling of 2,6-dichloro-5-iodopyrimidine with glycol followed by desilylation and reduction. Its mild nucleophilic substitutions or Fe-catalyzed cross-coupling with MeMgCl proceeded regioselectively at position 4, while at elevated temperatures or with excess of MeMgCl, double substitution occurred. The 2-chloro-4-substituted intermediates undergo another substitution or coupling to afford 2,4-disubstituted derivatives.



*This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (Z4 055 905), by the Ministry of Education (LC 512), by the GA ASCR (IAA400550902), and by Gilead Sciences, Inc.*

#### REFERENCES

1. Henry A. A., Romesberg F. E.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 727 (2003).
2. Štambaský J., Hocek M., Kočovský P.: *Chem. Rev.* 109, 6729 (2009).
3. Kubelka T., Slavětínská L., Klepetářová B., Hocek M.: *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 2666.

### METATEZE ALKENŮ: KATALYZÁTORY, MECHANISMUS A APLIKACE

**JAROSLAV KVÍČALA, MARIO BABUNĚK, VERONIKA SKALICKÁ, VENDULA KELBICOVÁ**

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
kvicalaj@vscht.cz*

Metateze alkenů katalyzovaná komplexy přechodných kovů patří dnes k nejrychleji se rozvíjejícím oblastem homogenní katalýzy. Aplikace zahrnují organickou syntetickou chemii, farmakochemii, makromolekulární chemii i průmyslové aplikace. Mezi různými typy metateze (Schéma 1) jsou pravděpodobně nejvýznamnějšími zkřížená metateze a metateze s uzavřením cyklu.

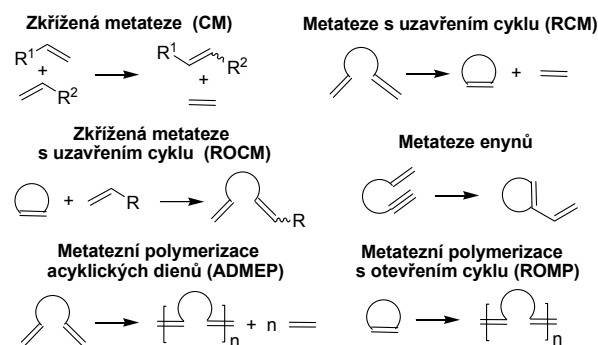
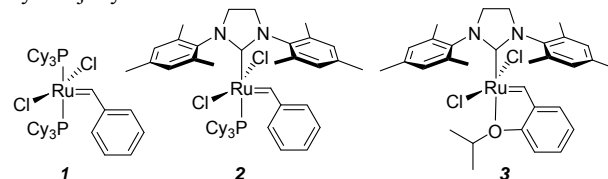


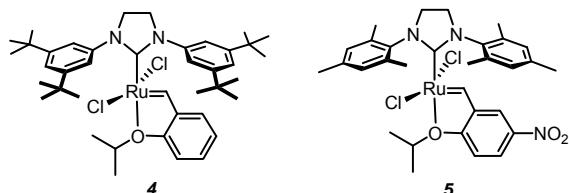
Schéma 1. Různé typy metateze alkenů

Hlavní zásluhu na dramaticky rostoucí popularitě nesou vedle vysoké tolerance vůči různým funkčním skupinám nově vyvinuté robustní katalyzátory na bázi ruthenia, Grubbsovy a Hoveyduvy-Grubbsovy katalyzátory I. (1) a II. (2, 3) generace (Obr. 1). Katalyzátory II. generace s NHC ligandy vykazují vysokou stabilitu termální vůči vzduchu i vodě.



Obr. 1. Grubbsův katalyzátor 1. (1) a 2. generace (2) a Hoveyduv-Grubbsův katalyzátor 2. generace (3)

V důsledku snah o nalezení komplexů s ještě vyšší stabilitou a aktivitou bylo do současné doby publikováno více než 400 nových variant rutheniových katalyzátorů pro metatezi alkenů<sup>1-3</sup>. U komplexů modifikovaných v arylové části NHC ligandů (např. komplex **4**) je zpravidla zvýšená aktivita doprovázena významným snížením stability, substituce alkoxybenzylidenové části arylovými nebo elektron-akceptorními skupinami (např. komplex **5**) pak vede k urychlení iniciační fáze metatezní reakce (Obr. 2).



Obr. 2. Grubbsova (**4**, 2007) a Grelova (**5**, 2002) modifikace Hoveyдова-Grubbsova katalyzátoru

Mechanismus metateze alkenů je poměrně složitý, zahrnuje iniciační periodu, vznik produktu i neproduktivní vedlejší paralelní reakční kroky (Schéma 2). Klíčovým intermediátem je ruthenacyklobutanový skelet, vratnost všech kroků vede po spotřebování alkenů ke zpětné koordinaci isopropoxybenzylidenového ligandu s možnou recyklací sloupcovou chromatografií.

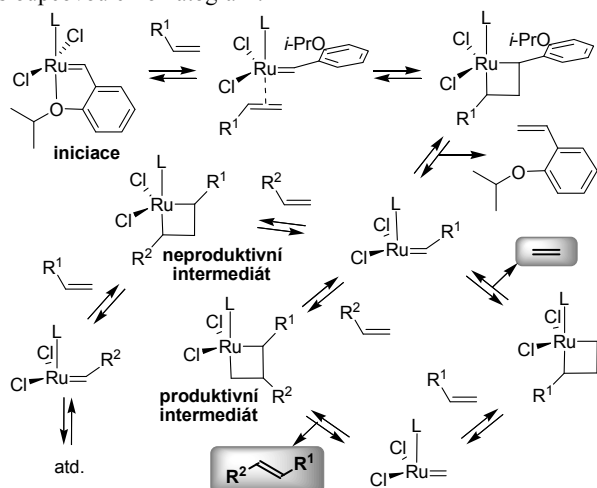


Schéma 2. Mechanismus zkřížené metateze alkenů (L = NHC ligand) katalyzované Hoveydivovým-Grubbsovým komplexem

Fluorová chemie umožňuje recyklaci homogenních katalyzátorů s využitím fluorových separačních metod. V rámci plenární přednášky budou dále diskutovány známé fluorované rutheniové katalyzátory i fluorové komplexy syntetizované v naší laboratoři. Perfluoralkylace alkoxybenzylidenového ligandu vede k urychlení iniciační periody, polyfluoralkylace NHC ligandu vede ke zvýšení účinnosti separace fluorovou extrakcí v pevné fázi (FSPE).

Děkujeme Grantové agentuře České republiky (grant č. 207/10/1533) a Ministerstvu školství, mádeže a tělovýchovy

(výzkumné centrum LC 06070, výzkumný záměr č. 6046137301) za finanční podporu.

## LITERATURA

1. Bieniek M., Michrowska A., Usanov D. L., Grela K.: Chem. Eur. J. 14, 806 (2008).
2. Samojłowicz C., Bieniek M., Grela K.: Chem. Rev. 109, 3708 (2009).
3. Vougioukalakis G. C., Grubbs R. H.: Chem. Rev. 110, 1746 (2010).

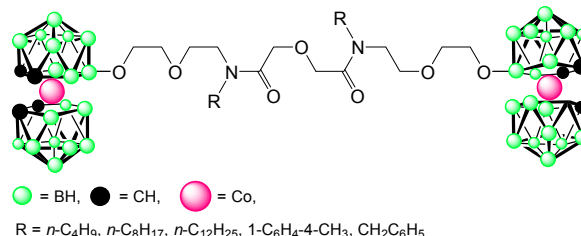
## NOVÁ EXTRAKČNÍ ČINIDLA NA BÁZI BIS(KOBALT-DIKARBOLIDU)

MAGDALENA KVÍČALOVÁ<sup>a</sup>, MARIA LÚČANÍKOVÁ<sup>b</sup>, PAVEL SELUCKÝ<sup>b</sup>, JIŘÍ RAIS<sup>b</sup>, BOHUMÍR GRŮNER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav anorganické chemie AVČR, v.v.i., Husinec-Řež 2001, 250 68 Řež, <sup>b</sup>Ústav jaderného výzkumu Řež a.s., Husinec-Řež 130, 250 68 Řež  
magda@iic.cas

Mezi problémy současné doby patří skladování velkých objemů vysoce radioaktivních odpadů z jaderných elektráren. Jednou z možností snížení objemů i radiotoxicity těchto odpadů je separace nejnebezpečnějších radionuklidů, zvláště minoritních aktinoidů (<sup>241</sup>Am, <sup>243</sup>Am, <sup>245</sup>Cm, <sup>237</sup>Np) s dlouhou dobou aktivity, extrakcí kapalina-kapalina pomocí vhodných extrakčních činidel. Jedním z nejúčinnějších je *N,N,N',N'*-tetraoktyldiglykolamid (TODGA).

V naší práci jsme se pokusili spojit extrakční schopnosti [(1,2-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-3,3'-Co]<sup>-</sup> aniontu (COSANu) a TODGY. Připravili jsme sérii nových sloučenin<sup>1</sup>, v nichž jsou dvě COSANové jednotky propojené amidickou vazbou s diglykolovou kyselinou (Obr. 1).



Obr. 1.

U všech takto připravených derivátů byla testována jejich schopnost extrahovat lantanoidy a aktinoidy ze směsi štěpných produktů. Mimo jiné bylo zjištěno, že všechny vykazují 100-1000krát vyšší extrakční účinnost než synergické směsi TODGY a chlorovaného COSANu při stejných koncentracích obou skupin.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 104/09/0668 a SURAO (Projekt 2007/006/Šumb a 2009/002/Šu)

## LITERATURA

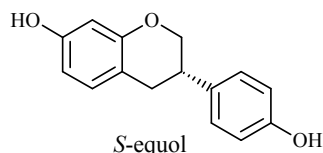
1. Grüner B., Kvičalová M., Selucký P., Lúčaniková M.: J. Organomet. Chem. 695, 1261 (2010).

**ZDROJEM EQUOLU NEMUSÍ BÝT JEN STŘEVNÍ BAKTERIE: DŮKAZ V ROSTLINNÉM MATERIÁLU**

**PETRA LANKOVÁ<sup>a</sup>, KHALED ABDULMANEA<sup>a</sup>, ELENA A. PROKUDINA<sup>a</sup>, VÁCLAV ZELENÝ<sup>b</sup>, OLDŘICH LAPČÍK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>VŠCHT Praha, FPBT, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, 165 21 Praha 6  
petra.lankova@vscht.cz

S-Equol je isoflavan vznikající působením střevních bakterií na daidzein a formononetin – isoflavony, které se vyskytují ve vysokém množství v soje a dalších bobovitých rostlinách. Vykazuje estrogenní aktivitu, jež je dokonce silnější než u jeho prekurzorů. Vysoká exkrece equolu má za následek snížení rizika rakoviny prsu a projevů menopauzy spojené s osteoporózou. Přeměna daidzeinu na equol však probíhá pouze u 30-50 % lidské populace. Dosud nebyl publikován výskyt equolu v rostlinách.



Apiaceae (miříkovité) je početná rostlinná čeleď zahrnující více než 2800 druhů, z nichž některé se pro výrazné aroma pěstují jako koření, např. kmín (*Carum*) a fenykl (*Foeniculum*), nebo jako kořenová zelenina, např. mrkev (*Daucus*) a petržel (*Petroselinum*), jiné našly uplatnění jako léčivky.

Listy pastináku setého (*Pastinaca sativa*) a semena kmínu kořeného (*Carum carvi*) byly lyofilizovány, rozemlety a extrahovány směsí methanol – voda 70:30. Extrakty byly frakcionovány semipreparativní HPLC na reverzní fázi a poté analyzovány metodami ELISA specifickými pro daidzein, genistein, biochanin A a equol a jejich deriváty v polohách 7 a 4'.

V obou rostlinách byly zaznamenány frakce, jejichž imunochemické charakteristiky a retenční časy odpovídaly standardům daidzeinu, sissotrinu, genisteinu, formononetinu, biochaninu A, prunetinu a také equolu.

V současnosti probíhá ověřování imunochemických dat metodou HPLC-MS.

Tato práce vznikla za podpory grantu GACR 525/09/0994 a MSM 6046137305.

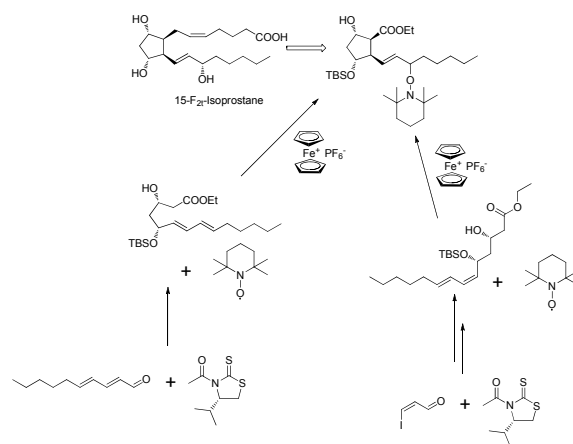
**TOWARD AN ASYMMETRIC TOTAL SYNTHESIS OF 5-, 8-, 12- AND 15-F<sub>21</sub>-ISOPROSTANES**

**TANJA LAU<sup>\*</sup>, ULLRICH JAHN**

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS ČR v. v. i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
Lau@uochb.cas.cz*

Isoprostanes are correlated with human diseases, such as atherosclerosis, pulmonary, and cardiovascular diseases, as well as Alzheimer's syndrome and other neuronal disorders. Today they are considered to be the gold standard for monitoring oxidative stress and pathophysiological conditions in humans *in vivo*<sup>1</sup>.

Since isoprostanes are produced from arachidonic acid via autoxidative pathways, they form a broad spectrum of isomers *in vivo*. Thus they cannot be isolated conveniently from biological material. Therefore regio- and stereoselective total synthesis is required to provide sufficient quantities of isomerically pure material for medical research and diagnostic applications<sup>2</sup>.



We present new results on the development of a unified strategy toward the asymmetric synthesis of 15-F<sub>21</sub>-Isoprostane as well as on the approach to modular asymmetric syntheses of 5-, 8- and 12-F<sub>21</sub>-Isoprostane.

## REFERENCES

1. a) 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); b) 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); c) Davi D., Falco A., Patrono C.: Chem. Phys. Lip. 128, Issue 1-2 (2004).
2. a) Jahn U., Galano J.-M., Durand T.: Angew. Chem. Int. Ed. 47, 5894 (2008); b) Dinca E., Jahn U.: Chem. Eur. J. 15, 58 (2009); c) Dinca E., Jahn U.: J. Org. Chem. 75, 4480 (2010).

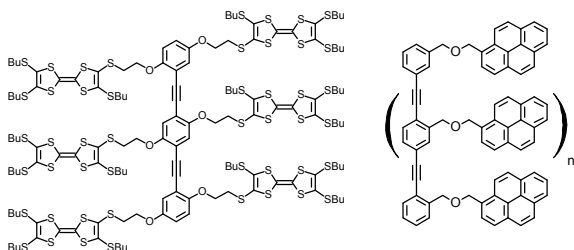


**SYNTEZA A VLASTNOSTI (*p*-FENYLEN)ETHYNYL-  
ENOVÝCH OLIGOMERŮ SUBSTITOVANÝCH  
TETRATHIOFULVALENOVÝMI NEBO PYRENOVÝMI  
JEDNOTKAMI**

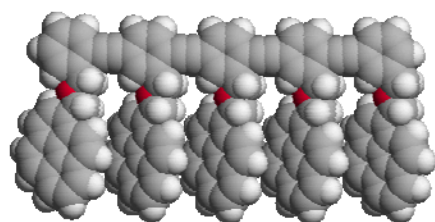
**ŠÁRKA LIPNICKÁ, MARTIN BĚLOHRADSKÝ,  
LUBOMÍR POSPÍŠIL, IVO STARÝ\***

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo  
nám. 2, 166 10 Praha 6  
stary@uochb.cas.cz

Samoskladba organizovaných souborů molekul patří  
k hlavním výzvám současné nanovědy a je perspektivní  
metodou pro přípravu nanomateriálů a nanozařízení.



Ve snaze vyvinout nový přístup ke kontrolované  
samoskladbě vodivých systémů byl navržen jednoduchý model  
využívající donor-akceptorních interakcí postranních  
elektronově bohatých a elektronově chudých jednotek  
připojených k  $\pi$  konjugovanému řetězci. Hlavní pozornost byla  
zaměřena na přípravu oligo-*p*-fenylenethylenových vodičů  
(*p*OPE) substituovaných tetrathiafulvalenovými (TTF) nebo  
pyrenovými jednotkami. Příprava modelových oligomerů byla  
založena na metodice využívající palladium katalyzované  
„cross-coupling” reakce. Hřebínkové oligomery (*p*OPE) byly  
připraveny v dobrých výtěžcích a charakterizovány  
spektroskopickými metodami. Budou rovněž diskutovány  
výsledky získané z měření UV-Vis, fluorescenčních spekter  
a elektrochemických studií modelových oligomerů.



n = 3

Podporováno FP7 (FUNMOL, reg. č. FP7-213382), GA AV  
ČR (reg. č. IAA400550919) a GA ČR (reg. č. P207/10/2214).

**2-O-GLYCOSYLATION OF *N*-UNSUBSTITUTED  
4-HYDROXYQUINOLIN-2(1*H*)-ONES**

**ROMAN KIMMEL<sup>a</sup>, ALENA NĚMCOVÁ<sup>a</sup>, ZUZANA  
MACKOVÁ<sup>a</sup>, ANTONÍN LYČKA<sup>b</sup>, MAREK NEČAS<sup>c</sup>,  
MICHAL ROUČAL<sup>a</sup>, ROBERT VÍCHA<sup>a</sup>, STANISLAV  
KAFKA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Faculty of Technology, Tomas Bata University, 62 72 Zlin;

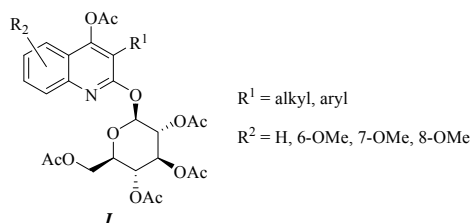
<sup>b</sup>Research Institute for Organic Syntheses, 532 18 Pardubice 20;

<sup>c</sup>Faculty of Science, Masaryk University, 625 00 Brno

kimmel@ft.utb.cz; kafka@ft.utb.cz; antonin.lycka@vuos.com

Some saccharide derivatives of quinolin-2(1*H*)-one were  
isolated from natural sources. An example is zeanoside B,  
which was isolated from corn kernels<sup>1</sup>. Various synthetic  
compounds of this class possess interesting biological  
activities; e.g., some 4-glycosyloxy-1-methylquinolin-2(1*H*)-  
-ones have shown anti-allergic activity<sup>2</sup>. Recently, we  
identified a method of the selective synthesis of 4-( $\beta$ -D-  
glucopyranosyloxy)quinolin-2(1*H*)-ones by glycosylation of *N*-  
unsubstituted 4-hydroxyquinolin-2(1*H*)-ones<sup>3</sup>.

Herein we report our actual study of glycosylation of *N*-  
unsubstituted 4-hydroxyquinolin-2(1*H*)-ones in other positions.  
Hydroxyl group of these compounds was protected by  
acetylation using acetic anhydride in pyridine and the 4-*O*-  
-acetyl derivatives were treated with 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -  
D-glucopyranosyl bromide and silver(I) oxide in acetonitrile.  
The reaction furnished 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-  
glucopyranosyloxy)quinolin-4-yl acetates **I** in satisfactory  
yields.



Structure **I** has been undoubtedly confirmed by <sup>15</sup>N NMR  
experiments. <sup>15</sup>N chemical shifts in **I** were about -140 ppm  
corresponding to -N= fragment (in *N*-derivatives, <sup>15</sup>N chemical  
shifts could be expected to be about -230 to -270 ppm). No  
alternative products, e.g. 4-acetoxy-1-(tetra-*O*-acetyl-D-  
glucopyranosyl)quinolin-2(1*H*)-ones, were observed.

This study was supported by the internal grant of TBU in Zlin  
No. IGA/18/FT/10/A funded from the resources of specific  
university research.

REFERENCES

1. Tateishi K., Shibata H., Matsushima Y., Iijima T.: *Agric. Biol. Chem.* **51**, 3445 (1987).
2. Takagaki H., Nakanishi S., Kimura N., Yamaguchi S. Aoki Y.: *Quinolinone glycoside, production process, and anti-allergic agent*. U. S. US 6,242,425, 5 Jun 2001.
3. Kimmel R., Kafka S., Košmrlj J.: *Carbohydr. Res.* **345**, 768 (2010).

## STUDIUM ANTIFUNGÁLNÍ AKTIVITY ISOMERNÍCH N-FENYL-2,X-DIHYDROXYTHIOBENZAMIDŮ

PAVEL SKÁLA<sup>a</sup>, MILOŠ MACHÁČEK<sup>a</sup>, MARCELA VEJSOVÁ<sup>b</sup>, LENKA KUBICOVÁ<sup>c</sup><sup>a</sup>Univerzita Karlova, FarmF, KAOCH, 500 05 Hradec Králové;<sup>b</sup>Univerzita Karlova, FarmF, KBLV, 500 05 Hradec Králové;<sup>c</sup>University of Leipzig, Faculty of Biosciences, Pharmacy and Psychology, Institute of Pharmacy, D-04103 Leipzig  
machacek@faf.cuni.cz

Antifungální aktivita 2,4-dihydroxythiobenzanilidů byla zjištěna koncem 90. let minulého století polskými autory<sup>1</sup>. Zajímalo nás, jaký vliv na ni bude mít přesunutí 2. hydroxylové skupiny do jiných poloh thiosalicylu<sup>2</sup>.

Cílové látky byly připraveny z odpovídajících dihydroxybenzanilidů jejich thionací v pyridinu a následnou hydrolyzou pyridinium-3-fenyl-2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-benzoxazafosfinin-2-thiolátu (Schéma 1).

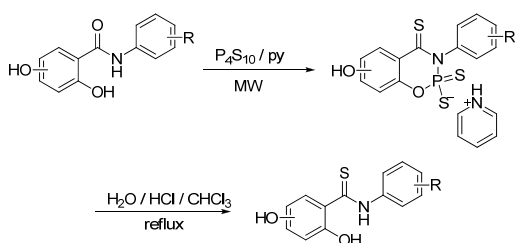


Schéma 1.

Antifungální aktivita výchozích látek a produktů byla testována na 8 druzích hub potenciálně patogenních pro člověka: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*.

Ze srovnání minimálních inhibičních koncentrací isomerních dihydroxybenzanilidů vyplývá, že významnější antifungální aktivitu vykazují 2,3- a 2,6-dihydroxyderiváty. Aktivita 2,4-dihydroxyderivátů byla méně významná. Náhrada kyslíku amidové skupiny za síru v dihydroxythiobenzanilidech se projevila různým způsobem. U 2,3-dihydroxyderivátů zůstala aktivita zachována nebo došlo k jejímu růstu. Oproti tomu v případě 2,6-dihydroxyderivátů nastal spíše její pokles.

Práce vznikla s podporou výzkumným záměrem MSM 0021620822.

## LITERATURA

1. Matysiak J., Niewiadomy A., Macik-Niewiadomy G.: Eur. J. Pharm. Sci. 10, 119 (2000).
2. Skála P.: *Disertační práce* (Ph.D.), Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2010.

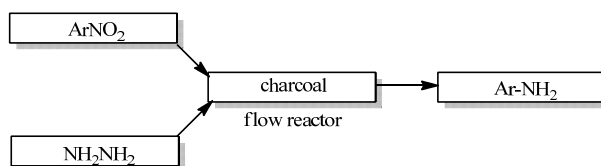
## REDUCTION OF NITRO GROUP BY HYDRAZINE

MAREK MARTÍNEK, JIŘÍ ŠROGL\*

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6

jsrogl@uochb.cas.cz

The reduction of nitro group by hydrazine catalyzed by charcoal<sup>1</sup> has been investigated under continuous flow conditions using ThalesNano X-Cube system. A variety of nitroaromatic compounds has been reduced to amines in good to excellent yields and scope and limitations of the present protocol as well as the technical optimization of the flow system has been explored.



Scheme 1

The work was supported by the Czech Academy of Sciences (Z40550506, M200550907).

## REFERENCE

1. Han B. H., Shin D. H., Cho S. Y.: Tetrahedron Lett. 26, 6233 (1985).

DIAZIRINYLIDEN – CYKlický CN<sub>2</sub> KARBEN

TOMÁŠ MARTINŮ\*, STANISLAV BÖHM, EVA HANZLOVÁ, VÁCLAV ČMOLÍK

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

3-Brom-3-karbalkoxydiaziriny (**I**) jsou chemicky i geometricky ortogonálními zdroji dvou různých karbenů (Schéma 1). Zatímco fotolytickou nebo termolytickou denitrogenací **I** vznikají brom(karbalkoxy)karbeny (**II**)<sup>1</sup>, reakce **I** s alkoksidy ve smyslu acylové nukleofilní substituce poskytuje diazirinyliden (**III**)<sup>2</sup>. Při vzniku příslušného karbonátu **IV** odstupuje 3-bromdiazirinylový aniont (**V**), který je podle DFT výpočtů snadno disociujícím komplexem karbenu **III** a bromidového iontu. Analogické procesy jsou známy u α-fluordihalokarbenových sloučenin poskytujících příslušné fluorhalokarbeny<sup>3</sup>.

Karben **III** za přítomnosti alkoholů poskytuje adičně-inserční produkty, dialkoksymethany (**VI**). Při reakci v *N,N*-dimethylformamidu rovněž vzniká alkoxy(dimethylamino)methan (**VII**) a oxid uhelnatý.

Karben **III** je posledním experimentálně dosud nepopsaným reaktivním intermediátem CN<sub>2</sub>. Základní elektronický

stav **III** je singlet, na rozdíl od tripletů kyanonitrenu (NCN) a diazomethylen (CNN)<sup>4</sup>. Predikovaný vysoký ionizační potenciál a elektronová afinita<sup>5</sup> ukazují, že klasifikace **III** jako N-heterocyklického karbenu je pouze formální – svými vlastnostmi je **III** blízký karbenům CF<sub>2</sub> a CFCl.

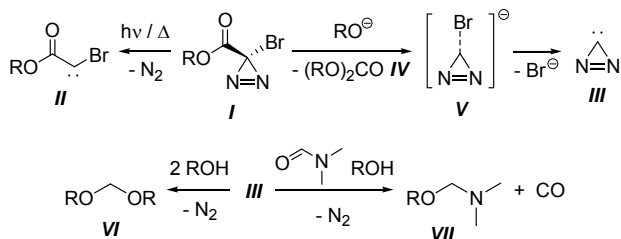


Schéma 1

Tato práce vznikla za podpory Výzkumného centra LC06070 MŠMT ČR.

## LITERATURA

1. Martinů T., Dailey W. P.: *J. Org. Chem.* **69**, 7359 (2004).
2. Martinů T., Böhm S., Hanzlová E.: Abstracts of Papers, 240th ACS National Meeting, Boston, MA, United States, 22–26 August 2010.
3. Brahm D. L. S., Dailey W. P.: *Chem. Rev.* **96**, 1585 (1996).
4. Moskaleva L. V., Lin M. C.: *J. Phys. Chem., A* **105**, 4156 (2001).
5. Sander W., Kötting C., Hübert R.: *J. Phys. Org. Chem.* **13**, 561 (2000).

### SYNTEZA PĚTI- A ŠESTIČLENNÝCH LAKTAMŮ JAKO ANALOG LAKTONŮ S CYTOSTATICKOU AKTIVITOU

**ELIŠKA MATOUŠOVÁ, ONDŘEJ KRENK, MILAN POUR**

*Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
matoe2aa@faf.cuni.cz*

V přírodě se vyskytující pentenolidy s exocyklickou dvojnou vazbou v poloze 4, gelastatiny A a B (**I**), vykazují zajímavou aktivitu vůči gelatinase A, enzymu účastnícího se mj. pronikání nádorových buněk do tkáně a metastázování<sup>1</sup>.

Při přípravě derivátů gelastatinu se ukázalo, že tyto laktony nejsou příliš stabilní<sup>2</sup>. Zejména β-substituované γ-alkylidenpentenolidy jsou ale cytostaticky velmi účinné. Proto jsme se zaměřili na přípravu laktamů (**2**) s cílem zvýšit stabilitu těchto látek a zjistit vliv této strukturní obměny na biologickou aktivitu.

Podobný přístup aplikujeme na přípravu dusíkatých analog pětičlenných laktonů (**3**). Butenolidy odvozené od struktury antimykoticky aktivní přírodní látky inkrustoporinu byly již dříve připraveny v naší výzkumné skupině a vyznačují se dobrou antifungální aktivitou<sup>3</sup>. U těchto

látek by měla vhodná substituce na laktamovém dusíku zvýšit jejich rozpustnost ve vodě a tím umožnit vhodnější způsob podání do organismu.

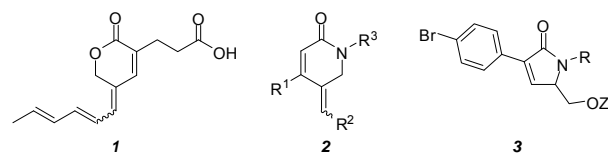


Schéma 1

Práce vznikla za podpory Grantové agentury ČR (projekt č. 120/50/105002) a Ministerstva školství ČR (projekt č. 1M0508).

## LITERATURA

1. Kim E. J., Ko S. Y.: *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 4103 (2005).
2. Pavlík J., Šnajdr I., Kuneš J., Špulák M., Pour M.: *J. Org. Chem.* **74**, 703 (2009).
3. Nobilis M., Pour M., Šenel P., Pavlík J., Kuneš J., Vopršalová M., Kolářová L., Holčapek M.: *J. Chromatogr., B* **853**, 10 (2007).

### DETEKCE ISOFLAVONOIDŮ V ČELEDI AMARYLLIDACEAE

**PETRA MIKŠÁTKOVÁ, PETRA LANKOVÁ, ELENA A. PROKUDINA, OLDŘICH LAPČÍK**

*Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
petra.miksatkova@vscht.cz*

Isoflavonoidy (3-fenylchromony) se od ostatních flavonoidů odlišují pozicí kruhu B. Jedná se o charakteristické metabolity čeledi Fabaceae, avšak byly detegovány v nejméně šedesáti dalších čeledích<sup>1</sup>. Mnohé isoflavonoidy vykazují důležité farmakologické vlastnosti, např. antibakteriální, antivirové, protizánětlivé a antioxidační účinky. Některé jsou estrogeně aktivní<sup>2,3</sup>.

Čeleď Amaryllidaceae (amarylkovité) patří mezi jednoděložné rostliny. Hlavními obsahovými látkami jsou specifické alkaloidy, např. cytotoxický lycorin a inhibitor acetylcholinesterasy galanthamin, používaný v terapii neurodegenerativních onemocnění, především při Alzheimerově chorobě<sup>4</sup>. Flavonoidy byly v této čeledi studovány pouze sporadicky a přítomnost isoflavonoidů zatím nebyla prokázána.

Analyzovali jsme následující zástupce čeledi Amaryllidaceae: *Amaryllis hippastrum* (cibule), *Clivia miniata* (list a kořen), *Crinum asiaticum* (list) a *Narcissus pseudonarcissus* (cibule a list). Lyofilizované vzorky rostlin byly extrahovány 70% etanolem. Po jeho odpaření byly odparky rozpuštěny ve 40% methanolu a analyzovány dvěma analytickými postupy: a) HPLC-ESI-MS a b) ELISA technikami po frakcionaci extraktu semipreparativní HPLC (HPLC-ELISA).

Oběma postupy byla ve vzorcích prokázána přítomnost iso flavonoidů daidzinu, daidzeinu, genistinu, genisteinu a biochaninu A. ELISA technikami byly nadto detegovány imunoreaktivní frakce, jejichž retenční čas a imunochemická reaktivita odpovídaly formononetinu, isoformononetinu a prunetinu.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 6046137305 a GACR 525/09/0994.

## LITERATURA

1. Harborne J.B., Williams C.A.: *Phytochemistry* 55, 481 (2000).
2. Lapčík O.: *Phytochemistry* 68, 2909 (2007).
3. Cornwell T., Cohick W., Raskin I.: *Phytochemistry* 65, 995 (2004).
4. Ghosal S., Saini K.S., Razdan S.: *Phytochemistry* 24, 2141 (1985).

### PREDIKCE SPEKTRÁLNÍCH VLASTNOSTÍ SACHARIDŮ S VYUŽITÍM HYBRIDNÍCH QM/MM VÝPOČTŮ

IVAN RAICH\*, VÍT NOVÁK

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Ivan.Raich@vscht.cz.

Je známo, že rozpouštědlo ovlivňuje prostorové uspořádání rozpuštěných látek a ovlivňuje i spektrální vlastnosti. Ověřili jsme v dřívějších výpočetních studiích<sup>1</sup>, že jeho reprezentace ve výpočtech podstatným způsobem rozhoduje o kvalitě shody vypočtených a experimentálních dat. Výpočetní studie používá hybridní QM/MM model ONIOM v Gaussianu 09W k zahrnutí explicitních molekul rozpouštědla do geometrických optimalizací a výpočtů IČ a NMR spektrálních vlastností studovaných sacharidů. Byly testovány různé kombinace ONIOM vrstev a různé teoretické úrovně v nich.

Výchozí počet molekul rozpouštědla a jejich přesné pozice jsou zjišťovány pomocí molekulové dynamiky. Byla vypracována metodika pro konstrukci rozpouštědlových boxů plněných prakticky libovolným rozpouštědlem včetně jejich směsí v libovolném složení a jejich následnou ekvilibraci i vnoření studované molekuly.

Vypočtené vlnočty i vibrační frekvence v IČ spektrech a chemické posuny a spin-spinové interakce v NMR spektrech jsou kvalitativně a kvantitativně porovnávány jak s experimentálními daty, tak s dřívějšími výsledky s vylepšeným CPCM solvatačním modelem v Gaussianu 09W.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR MSM6046137305.

## LITERATURA

1. Kaminský J., Raich I., Tomčáková K., Bouř P.: *J. Comput. Chem.* 31, 2213 (2010).

### pH SENZITIVNÍ FOTOSENZITIZÉRY

VERONIKA NOVÁKOVÁ, PETR ZIMČÍK

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze  
veronika.novakova@faf.cuni.cz

Fotodynamická terapie je moderní terapie především nádorových onemocnění založená na součinnosti fotosenzitizéru, světla a kyslíku. U fotosenzitizéru je důležitý vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku ( $\Phi_{\Delta}$ ) a případně i fluorescence ( $\Phi_F$ ) k detekci nádorů. Tyto vlastnosti lze u azaftalocyaninů (AzaPc) snadno ovlivnit periferní substitucí. AzaPc nesoucí substituenty vázané přes kyslík či síru mají poměrně vysoké  $\Phi_F$  a  $\Phi_{\Delta}$ . Je-li však na periférii alespoň jedna amino skupina, dochází k tzv. intramolekulárnímu přenosu náboje (ICT) a tím ke zhašení excitovaného stavu AzaPc<sup>1</sup>,  $\Phi_F$  a  $\Phi_{\Delta}$  se blíží nule. Protonizací tohoto dusíku se hodnoty kvantových výtěžků zvýší o dva řády<sup>2</sup>. Tohoto efektu by se dalo využít v terapii nádorů, kde je pH často nižší než fyziologické. Fotosenzitizér by se tak aktivoval až v místě účinku a zvýšil by výrazně selektivitu terapie.

Připravili jsme sérii nesymetrických AzaPc nesoucí substituenty umožňující ICT (viz Schéma, 1-5) a kontrolní AzaPc bez ICT (6). Sloučeniny 1-6 jsme inkorporovali do liposomů a studovali vliv pH na jejich fotofyzikální vlastnosti (viz Graf). Stanovili jsme jejich  $pK_a$ , dále pak  $\Phi_F$ ,  $\Phi_{\Delta}$  v neutrální a protonizované formě.

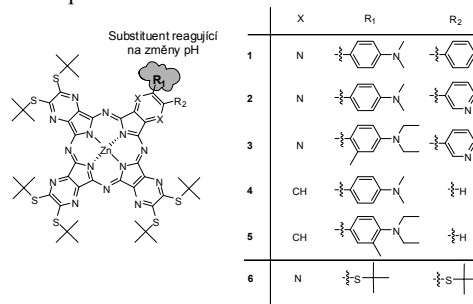
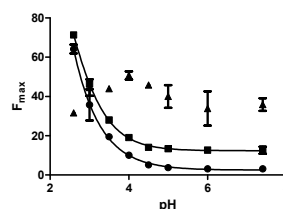


Schéma. Seznam připravených sloučenin



Obr. 1. Závislost intenzity fluorescence na pH (1■, 2●, 6▲)

Tato práce vznikla za podpory grantů GA UK 57810/2010 a SVV-2010-261-001.

## LITERATURA

1. Novakova V., Zimcik P., Miletin M., Vachova L., Kopecky K., Lang K., Chábera P., Polívka T.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 2555 (2010).

2. Novakova V., Mørkved EH., Miletin M., Zimcik P.: J. Porphyrin. Phthalocyanines (2010), v tisku.

## BISUBSTITUOVANÉ DERIVÁTY 1,10-FENANTHROLINU

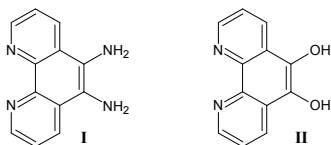
**ZDENA NOVÁKOVÁ<sup>a</sup>, JANA JAHODOVÁ<sup>a</sup>, PAVEL  
DRAŠAR<sup>a</sup>, ERKKI KOLEHMAINEN<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>VŠCHT Praha, Ústav chemie přírodních látek, Technická 5, CZ-166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Department of Chemistry, University of Jyväskylä, FI-40014, Jyväskylä Yliopisto  
zdena.novakova@vscht.cz

1,10-Fenanthrolin je často využíván v analytické a supra-molekulární chemii<sup>1</sup>, jeho deriváty mohou nalézt uplatnění m.j. jako molekulární přepínače<sup>2</sup>. Díky volným elektronovým pářím na dusíkových atomech může tvořit komplexy s kovy.

Spojení této fluorescentní molekuly s amfifilními žlučovými kyselinami by mohlo do budoucna umožnit inkorporaci do membránových liposomů.

Cílem práce je syntetizovat 5,6-diaminofenanthrolin **I** a také diol **II**, připravit jejich vhodné bisubstituované deriváty se žlučovými kyselinami. Tyto látky a jejich kovové komplexy jsou dále charakterizovány a testovány na možné zajímavé fyzikální vlastnosti<sup>3</sup>.



Tato práce vznikla za podpory NATO grant CBP.EAP.CLG.982972, MŠMT MSM6046137305, GA CR P304/10/1951, 2B06024 (SUPRAFYT), MSMT no. 21/2010 a CIMO Research Grant.

### LITERATURA

1. Lehn J.-M.: Science 295, 2400 (2002).
2. Conte G., Bortoluzzi A.J., Gallardo H.: Synthesis 23, 3945 (2006).
3. Valkonen A., Lahtinen M., Virtanen E., Kaikkonen S., Kolehmainen E.: Biosens. Bioelectron. 20, 1233 (2004).

## DERIVÁTY ESTERŮ CHOLESTEROLU/TERPENŮ JAKO NOVÁ POTENCIÁLNÍ ANTITUBERKULOTIKA

**EVA NOVOTNÁ<sup>a</sup>, KAREL WAISSER<sup>a</sup>, JARMILA  
KAUSTOVÁ<sup>b</sup>, JIRINA STOLAŘÍKOVÁ<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Univerzita Karlova v Praze, FarmF, Katedra anorganické a organické chemie, 500 05 Hradec Králové; <sup>b</sup>Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Národní referenční laboratoř pro M. kansasii, Partyzánské náměstí 7, 702 00 Ostrava  
Eva.Petrlikova@faf.cuni.cz

Návrat tuberkulózy a dalších infekčních onemocnění představuje závažný celosvětový problém. Nové deriváty esteru cholesterolu a kyseliny 6-bromhexanové substituované dusíkatými bázemi (pyridin, 4-methylpyridin, 3,4-lutidin a isochinolin) představují skupinu látek se slibnými biologickými účinky. U připravených sloučenin byla *in vitro* testována jejich biologická aktivita proti *Mycobacterium tuberculosis* (My 331/88), *M. avium* (My 330/88), *M. kansasii* (My 235/80) a kmenu *M. kansasii* (6 509/96), který byl izolován od pacienta z okresu Karviná.

Práce navazuje na výzkum Adamce<sup>1</sup>, který se zabýval komplexními deriváty obsahujícími estron. Ve spojení s biologickou aktivitou se u těchto sloučenin uvažuje o a) náboji na dusíkovém atomu, b) hydrofobní steroidní jednotce, která může interagovat s buněčnými membránami, c) délce alkylového řetězce. Naším cílem bylo připravit deriváty, které místo estronu obsahují cholesterol a terpeny a zjistit, zda právě steroidní jednotka je zodpovědná za biologickou aktivitu nebo zda je možná její náhrada za jinou lipofilní jednotku.

Předpokládáme, že díky tomu, že se jedná o kvartérní amoniové soli, je biologická aktivita těchto sloučenin obecná, vyvolaná lipofilním substituentem vázaným na kvartérním amoniovém dusíku.

Tato práce vznikla s podporou GAUK, grantu číslo 11809/2009/B-CH/FAF, výzkumného záměru MŠMT ČR (MSM 0021620822) a grantu Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV-2010-261-001).

### LITERATURA

1. Adamec J., Beckert R., Weiß D., Klimešová V., Waisser K., Möllmann U., Kaustová J., Buchta V.: Bioorg. Med. Chem. 8, 15 (2007).

## VAZEBNÝ MÓD ALKALOIDU PALMATINU V KOMPLEXU S OLIGONUKLEOTIDEM d(GGAATTGCG).d(CGCAATTCC)

**JAN NOVOTNÝ, RADOVAN FIALA, ZDENĚK KRŽÍŽ,  
RADEK MAREK\***

Národní centrum pro výzkum biomolekul, Masarykova univerzita, Kamenice 5/A4, 625 00 Brno  
giovanin@seznam.cz, rmarek@chemi.muni.cz

Schopnost protoberberinového alkaloidu palmatinu interagovat s DNA je považována za zásadní mechanismus jeho působení v buněčných systémech. Podrobnější strukturní aspekty této vazby však nejsou dosud přesně známy<sup>1</sup>.

Tato práce představuje další krok výzkumu vazebného módu a sekvenční selektivity palmatinu v komplexu s nepalindromickým DNA nonamerem za použití NOE a <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H korelační spektroskopie<sup>2</sup>. Výsledky jsou porovnány s molekulárně dynamickými simulacemi palmatinu umístěného v malém žlábků studovaného oligonukleotidu. NMR studie je doplněna termodynamickými daty získanými z isothermální kalorimetrické titrace.

Tato práce byla podpořena granty MŠMT (MSM0021622413 a LC06030).

## LITERATURA

1. Bhadra K., Maiti M., Kumar G. S.: DNA Cell Biol. 27, 675 (2008).
2. Searle M. S.: Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 25, 403 (1993).

### PŘÍPRAVA FLUOROVANÝCH LÁTEK POMOCÍ FLUORMETHYLENBISFOSFONÁTU

STANISLAV OPEKAR, PETR BEIER\*

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingova náměstí 2, 166 10 Praha  
beier@uochb.cas.cz

Současné metody přípravy<sup>1–3</sup>  $\alpha$ -fluor- $\alpha$ -alkylovaných bisfosfonátů **2** nejsou příliš efektivní. Těmto metodám schází především lepší dostupnost výchozích látek, vyšší výtěžky, nebo kratší reakční sekvence. Dále  $\alpha$ -fluor- $\alpha$ -alkylované bisfosfonové kyseliny **3** vykazují podobnou biologickou aktivitu jako  $\alpha$ -hydroxy- $\alpha$ -alkylované bisfosfonové kyseliny, které jsou v současné době používaná léčiva proti osteoporóze a jiným podobným onemocněním<sup>4</sup>.

Vyvinuli jsme novou metodiku pro přípravu  $\alpha$ -fluor- $\alpha$ -alkylovaných bisfosfonátů **2** z fluormethylenbisfosfonátu **1** a alkylhalogenidů. Tento postup je jednoduše uskutečnitelná reakce, která se odehrává za mírných podmínek (slabá báze a laboratorní teplota). Hydrolyzou bisfosfonátů **2** se dají získat biologicky aktivní bisfosfonové kyseliny **3**. Štěpení vazby uhlík-fosfor výchozího bisfosfonátu **2** pomocí etoxidu hořečnatého představuje nový přístup k  $\alpha$ -fluor-fosfonátům **4** (Schéma 1).

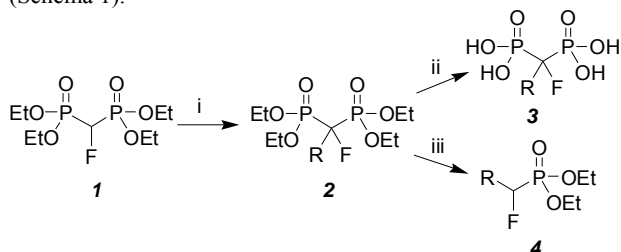


Schéma 1. i) RX, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 25 °C; ii) 1. TMSBr, 50 °C, 2. H<sub>2</sub>O, 25 °C; iii) (EtO)<sub>2</sub>Mg, EtOH, 100–150 °C.

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

## LITERATURA

1. Inoue S., Okauchi T., Mimami T.: Synthesis 2003, 1971.
2. Korba B., Eymery F., Savignac P.: Tetrahedron Lett. 39, 4477 (1998).
3. Martynov B. I., Sokolov V. B., Aksinenko A. Y., Goreva T. V., Epishina T. A., Pushin A. N.: Russian Chem. Bull. 47, 1983 (1998).

4. Marma M. S., Xia Z., Stewart Ch., Coxon F., Dunford J. E., Baron R., Kashemirov B. A., Ebetino F. H., Triffitt J. T., Russell R. G. G., McKenna Ch. E.: J. Med. Chem. 50, 5967 (2007).

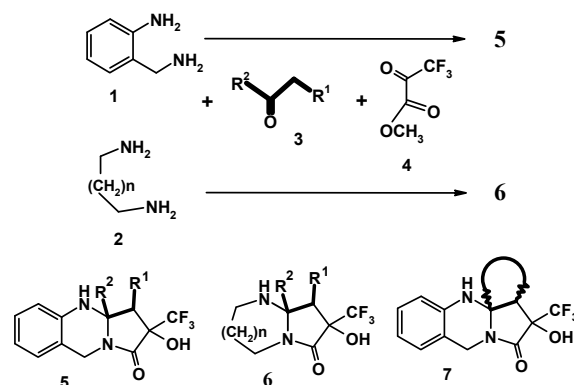
### NOVÁ TRÍSLOŽKOVÁ CYKLIZACE: VLIV STRUKTURY DIAMINU A CYKlickÉHO KETONU NA STEREOSELEKTIVITU CYKLIZACE

JIŘÍ PALEČEK, BOHUMIL DOLENSKÝ, JAROSLAV KVIČALA, OLDŘICH PALETA\*

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
oldrich.paleta@vscht.cz

Uvedená cyklizace<sup>1</sup> v původní verzi, kterou jsme objevili, probíhá mezi 2-aminobenzylaminem (**1**), ketonem nebo aldehydem (**3**) a 3,3,3-trifluor-2-oxopropanoátem (**4**). Jako hlavní produkt cyklizace vznikají pyrrolochinazoliny (**5**), jež jsou blízkými analogy alkaloidu vasicinu (peganinu)<sup>2,3</sup>.

V této práci jsme zjišťovali, zda cyklizace probíhá rovněž s alifatickými diaminy **2**. Ukázalo se, že produkty **6** vznikají v různém výtěžku v závislosti na délce řetězce diaminu, avšak zpravidla s horší diastereoselektivitou.



Diastereoselektivitu cyklizace lze rovněž ovlivnit velikostí kruhu cyklického ketonu, kdy obecnými produkty jsou struktury typu **7**. Nižší cykloalkanony jsou anelovány výhradně *syn*-připojením, zatímco vyšší ketony mohou být připojeny *anti*-anelací.

Výzkum byl podporován grantem MŠMT ČR MSM6046137601.

## LITERATURA

1. Dolenský B., Kvičala J., Paleta O., Lang J., Dvořáková H., Čejka J.: Magn. Reson. Chem. 48, 375 (2010).
2. Elks J., Ganellin C.R.(ed.), Dictionary of Drugs, Chemical Data, Structures and Bibliographies, s. 872. Chapman and Hall, London 1990.
3. Jindal D.P., Chattopadhyaya R.: Indian Drugs 35, 606 (1998).

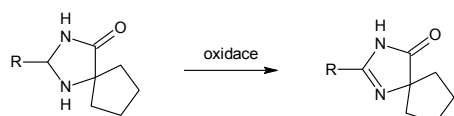
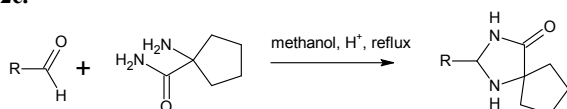
## OXIDACE SUBSTITUOVANÝCH IMIDAZOLIDIN-4- -ONŮ: NOVÁ ALTERNATIVNÍ PŘÍPRAVA 4,5-DIHYDRO-1H-IMIDAZOL-5-ONŮ

**ILLIA PANOV, PAVEL DRABINA, MILOŠ SEDLÁK**

Ústav organické chemie a technologie, FCHT, Univerzita  
Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice  
illia.panov@student.upce.cz

Rada substituovaných 4,5-dihydro-1H-imidazol-5-onů patří mezi dosud používané selektivní a netoxické herbicidy. Další možnosti aplikace 4,5-dihydro-1H-imidazol-5-onů spočívají v jejich uplatnění jako ligandů vytvářejících koordinační sloučeniny s vybranými ionty kovů.

Reakcí aldehydů (pentanal, benzaldehyd, 4-methoxybenzaldehyd, 4-nitrobenzaldehyd, salicylaldehyd, pyridin-2-karbaldehyd) s 1-aminocyklopentankarboxamidem byly připraveny substituované imidazolidin-4-ony **1a–f** (**a**: R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; **b**: R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; **c**: R = 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; **d**: R = 4-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; **e**: R = 2-HOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; **f**: R = 2-pyridyl) ve výtěžcích 53–83 %. Následnou oxidací při použití rozdílných činidel byly připraveny odpovídající 4,5-dihydro-1H-imidazol-5-ony **2a–f**: Pd/C (72–93 %), DDQ (25–80 %) a MnO<sub>2</sub> (30–77 %). Struktura připravených sloučenin **1a–f** a **2a–f** byla ověřena pomocí <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektroskopie, EI-MS a elementární analýzy. Rentgenostrukturální analýza byla provedena u látek **1e** a **2e**.



**1, 2a–f** **a**: R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; **b**: R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; **c**: R = 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; **d**: R = 4-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; **e**: R = 2-HOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; **f**: R = 2-pyridyl

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR č. 0002 162 7501 a projektu IGA SGFCHT 02 UPa.

### LITERATURA

- Panov I., Drabina P., Padělková Z., Hanusek J., Sedlák M.: J. Het. Chem. (2010), DOI 10.1002/jhet. 454.

### VÝPOČETNÍ STUDIE MIKROHYDRATAČE KOMPLEXNÍCH KATIONTŮ VZNIKAJÍCÍCH PŘI HMOTNOSTNÍ SPEKTROSKOPII

**JANA PATEROVÁ, JAN HEYDA, PAVEL JUNGWIRTH**

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
Jana.Paterova@uochb.cas.cz

Soli přítomné ve vodných roztocích významně ovlivňují rozpustnost a chování ostatních molekul<sup>1</sup>. Proto je studium jejich hydratace klíčové pro lepší porozumění dějům v živých organismech. Hořečnatý kationt patří mezi makroprvky lidského organismu a zároveň se ve značných koncentracích vyskytuje i v mořské vodě. Acetátový anion vzniká jako produkt metabolismu řady mikroorganismů.

Z hmotnostně spektroskopického studia mikrohydratace iontů, které vznikají použitím elektrospřeje octanu hořečnatého, lze usuzovat na chování těchto iontů ve vodných roztocích<sup>2</sup>. Zatímco o hořečnatém kationtu je známo, že se ve vodných roztocích koordinačně váže se 6 molekulami vody, u dalších vznikajících iontů (CH<sub>3</sub>COOMg<sup>+</sup>, (CH<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub>Mg<sup>+</sup>) není způsob a síla hydratace doposud probádána.

Pomocí *ab initio* výpočetních metod jsme modelovali mikrohydrataci výše uvedených hořečnatých kationtů. Naším cílem bylo zjistit, zda zůstává acetátový ligand bidentátní i při vzrůstajícím počtu koordinovaných vod ( $n = 0 - 6$ ), nebo se jeho dentacita snižuje. V neposlední řadě jsme studovali vazebnou energii nejslaběji vázané molekuly vody k již částečně hydratovanému hořečnatému kationtu, na jejímž základě je možné kvantifikovat jeho relativní zastoupení v hmotnostním spektru.

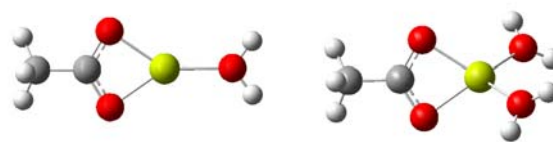


Schéma 1. CH<sub>3</sub>COOMg<sup>+</sup> hydratovaný 1 resp. 2 molekulami vody

Tato práce vznikla za podpory GA ČR (grant č. 203/08/0114) a MŠMT ČR (grant LC 512).

### LITERATURA

- Grossfield A., Ren P., Ponder J. W.: J. Am. Chem. Soc. 125, 15671 (2003).
- Tsierkezos N. G., Roithova J., Schroder D., Oncak M., Slavicek P.: Inorg. Chem. 48, 6287 (2009).

### PŘEDBĚŽNÁ KINETICKÁ STUDIE PŘESMYKU ESTERŮ SALICYLANILIDŮ

**KAREL PAUK<sup>a</sup>, ALEŠ IMRAMOVSKÝ<sup>a</sup>, VLADIMÍR  
PEJCHAL<sup>a</sup>, JIŘÍ HANUSEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, 532 10 Pardubice  
Karel.Pauk@seznam.cz

2-Hydroxy-*N*-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidy **III** jsou originální organické látky obsahující dvě amidické skupiny. Tyto látky mohou sloužit jako potenciální antimikrobiální léčiva proti kmenům tuberkulózy, jako je *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tbc*) a některým jiným, jako jsou např. *M. avium* nebo *M. kansasii*.

Substituované salicylanilidy **I** byly esterifikovány *N*-chráněnými amino kyselinami<sup>1</sup>. Připraveny byly odpovídající estery, jejichž deproteckce byla provedena roztokem 33% HBr v AcOH za vzniku odpovídajícího hydrobromidu **II**. Při snaze o uvolnění aminoskupiny pomocí báze došlo k neočekávanému přesmyku a vznikl hydroxy-*N*-(fenylamino)-oxoalkylbenzamid (diamid) **III** (Schéma 1)<sup>2</sup>.

Pro zjištění mechanismu této pozoruhodné reakce byly syntetizovány hydrobromidy s různými Hammettovskými R<sup>2</sup> substituenty, přičemž R<sup>1</sup> a příslušná aminokyselina zůstávaly stejné. Ze získaných kinetických křivek byly zjištěny pozorované rychlostní konstanty, které byly vynášeny do grafu. Při vyšetřování průběhu přesmyku byla izolována a identifikována (NMR a RTG) dehydratovaná forma reakčního intermediátu, která vedla k návrhu mechanismu přesmyku<sup>1</sup>.

Rychlost přesmyku v závislosti na R<sup>2</sup> substituentech a předběžné výsledky kinetické studie budou součástí prezentace.

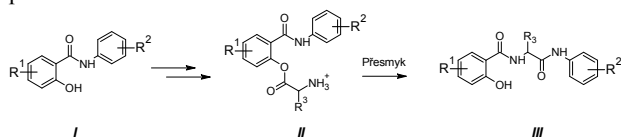


Schéma 1. Syntéza diamidu

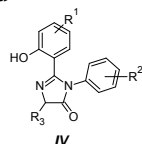


Schéma 2. Intermediát vznikající při přesmyku

Autoři děkují za finanční podporu Ministerstva školství, mládeže tělovýchovy České republiky (Projekt MSM 002 162 7501 a Projekt SGFChT 02 UPa).

## LITERATURA

1. Vinšová J., Imramovský A., Krátký M., Férriz J. M., Palát K., Lyčka A., Růžička A.: *Tetrahedron Lett.* 51, 23 (2010).
2. Imramovský A., Vinšová J., Férriz J. M., Kuneš J., Pour M., Doležal M.: *Tetrahedron Lett.* 47, 5007 (2006).

SYNTEZA MONOSUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ  
β-CYKLODEXTRINU PRO MEDICINÁLNÍ APLIKACE**MARTIN POPR, JINDŘICH JINDŘICH**

*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta  
Univerzity Karlovy v Praze, Praha  
xpoprm@seznam.cz*

Cyklodextriny<sup>1</sup> jsou cyklické oligosacharidy složené z D-glukopyranosových jednotek, které jsou spojené do kruhu pomocí α(1→4) glykosidických vazeb.

Tato práce se zabývá syntézou série derivátů β-cyklodextrinu, které jsou potenciálně využitelné pro konstrukci kontrastních látek MRI nové generace. Základní skelet β-CD je nejprve selektivně persubstituován v polohách 6

a vybaven azidovými skupinami<sup>2</sup>. V dalších krocích je per-6-azido-β-CD monosubstituován na sekundárním okraji makrocyclu. Jako vhodná činidla pro derivatizaci byly vybrány (*E*)-cinnamylbromid a propargylbromid. Monosubstituční reakce poskytují vždy dva regioisomery se substituentem v poloze 2<sup>1</sup>-O- a 3<sup>1</sup>-O-. Tyto se podařilo po následné peracetylaci zbylých hydroxylových skupin, od sebe úspěšně separovat pomocí sloupcové chromatografie. Deriváty s cinnamylovou skupinou byly následně oxidativně převedeny na 2<sup>1</sup>-O-, 3<sup>1</sup>-O-formylmethyl- a 3<sup>1</sup>-O-karboxymethyl-deriváty. Dále byla ověřena možnost spojení derivátu obsahujícího aldehydovou funkci s vhodným substrátem pomocí redukční aminace.

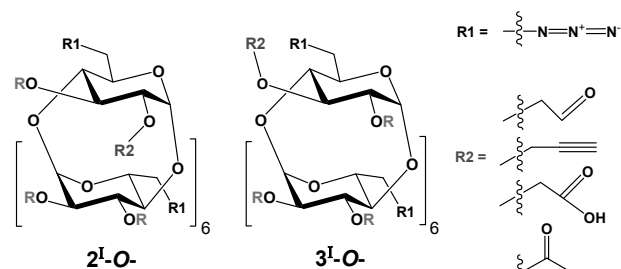


Schéma 1. Cílová série derivátů β-cyklodextrinu a vybavení funkčními skupinami

*Tato práce je podporována grantem MŠMT ČR MSM0021620857.*

## LITERATURA

1. Szejtli J.: *Chem. Rev.* 98, 1743 (1998).
2. Ashton P. R., Königer R., Stoddart J. F.: *J. Org. Chem.* 61, 903 (1996).

OBECNÉ ZÁSADY VÝVOJE SYNTHESY GENERICKE  
LÉKOVÉ SUBSTANCE**KAREL POSPÍŠILÍK, JINDŘICH BĚLUŠA**

*Teva Czech Industries s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava  
karel.pospisilik@tevapharm.cz*

Synthesa léčivé substance je synthesa konkrétní organické sloučeniny, která se stane komerčním produktem. Vývoj syntetického postupu tak musí respektovat legislativní normy, kterými se řídí ochrana duševního vlastnictví i výroba a registrace léčivých substancí. Cílem chemické vývojové studie je nalézt postup syntesy, který nebude v konfliktu s patentovými nároky platných patentů, poskytne produkt splňující požadavky registračního úřadu na kvalitu substance<sup>1</sup> a jednotlivé reakce vedoucí k intermediátům a finální substanci budou natolik prozkoumány, že je možný návrh technologie přípravy léčivé substance reprodukovatelným (validovatelným) postupem.



Po zadání úkolu je prvním krokem chemické vývojové studie patentová rešerše. Všechny patenty týkající se léčivé substance musí být nalezeny a roztříděny na patenty, které nárokují:

- konkrétní organické sloučeniny a její polymorfní formy (látkový, polymorfní patent);
- synthetický postup vedoucí k léčivé substance (procesní patenty);
- ochranu léčivé formulace (formulační patent);
- aplikaci substance (aplikační patent).

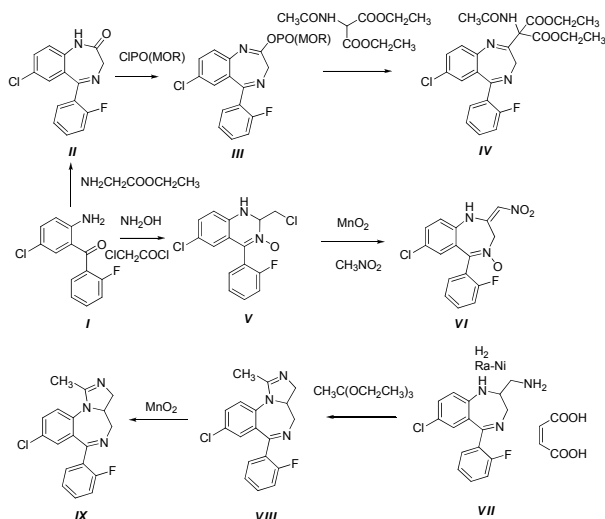
Na základě patentové studie se navrhne postup přípravy léčivé substance, který může být buď kopií postupu popsáném v základním patentu, který chrání tuto substance, nebo nový postup který není v konfliktu s později zveřejněnými procesními patenty. První postup přípravy není obvykle ten nejvhodnější, rovněž vývoj organické synthesy stále pokračuje a tak je 10 – 15 let po zveřejnění základního patentu možné navrhnout a vyvinout efektivnější synthetický postup založený na aktuálním stavu synthetické organické chemie.

Po navržení synthetických cest vedoucích k léčivé substance se ihned začne s jejich laboratorním odzkoušením a vedle vlivu reakčních podmínek na výtěžek preparací se od začátku sleduje též obsah organických nečistot v intermediech a finální léčivé substance. Nečistoty se klasifikují na nečistoty pocházející z:

- vedlejších reakcí;
- zbytků meziproduktů, reakčních činidel, ligandů katalysátorů;
- degračních pochodů.

Zvláštní pozornost se věnuje tvorbě enantiomerů, geometrických isomerů a genotoxických nečistot. Nečistoty, které se v léčivé substance a jejím prekursoru vyskytují s obsahem vyšším než 0,1 % (rel.) je třeba identifikovat a nalézt způsob eliminace těchto nečistot čistěním výchozích surovin, meziproduktů popř. léčivé substance. Spolu se studiem reakcí vedoucích k meziproduktům a finální léčivé substance se též zkoumá mechanismus tvorby nečistot a jejich přeměny. Vedle organických nečistot se musí ve finální substance sledovat obsah zbytkových rozpouštědel a anorganických nečistot (síranový popel, obsah těžkých kovů).

Výše uvedené zásady byly aplikovány na vývoj synthesy Midazolamu (**IX**). Synthetické cesty vychází z halogenovaného aminobenzofenonu (**I**), který se v prvně popsané cestě<sup>2</sup> převede reakcí s ethylglycinátem na benzodiazepinon (**II**), jenž reakcí s dimorfolinochlorophosphoramidátem poskytne intermediát (**III**) schopný reakce s diethyl acetamidomalonovou kyselinou. Z něj lze postavit imidazolový kruh a získat karboxylový derivát Midazolamu, z něhož dekarboxylací se uvolní Midazolam. Tato cesta zahrnuje více stupňů a poskytuje nízký výtěžek. Vhodnější se zdála být druhá popsaná cesta přes chlormethylidihydrochinazolin (**V**) k nitroaminoalkenu (**VI**), který redukcí poskytne amin (**VII**), izolovaný jako maleát. Cyklisací aminu (**VII**) triethylorthoacetátem a oxidací obdrženého imidazolinu (**VIII**) se získá Midazolam (**IX**).



Druhá cesta<sup>3</sup> je technicky schůdnější, poskytuje vyšší výtěžek, vyžaduje levnější suroviny, jejím problémem jsou nečistoty vzniklé hydrogenolýsou při hydrogenaci a při oxidaci oxidem manganičitým. Studium a úpravou reakčních podmínek těchto reakcí bylo navrženo řešení, které umožnilo výrobu Midazolamu požadované kvality.

#### LITERATURA

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q3A(R): Impurities in New Drug Substances. (February 2002). CPMP/ICH/2737/99.
2. Waltzer A., Fryer R.I.: US 4280957 (1976).
3. Waltzer A., Benjamin L.E., Flynn T., Mason C., Schwartz R., Fryer R.I.: J. Org. Chem. 43, 937 (1978).

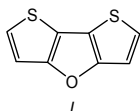
#### PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ DITHIENO[3,2-b:2',3'-d]-FURANU PRO MOLEKULÁRNÍ ELEKTRONIKU

MICHAL POZNÍK, VÁCLAV KOZMÍK, JIŘÍ SVOBODA

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Michal.Poznik@vscht.cz, Jiri.Svoboda@vscht.cz

Organické vodivé a polovodivé materiály nacházejí využití<sup>1,2</sup> jako fotovoltaické články, světlo emitující diody (LED), tenkovrstvé transistory (OFET), molekulární přepínače atd. Jejich molekulární struktura je nejčastěji založena na oligoacenech (tetracen, pentacen), derivátech thiofenu, oligo- a polythiofenech a výše kondenzovaných thiofenech. Nedávno bylo zjištěno, že v designu nových OFET se dá využít i derivátů furanu a thienofuranu<sup>3</sup>.

Cílem společného česko-francouzského projektu Barrande je příprava a studium nových OFET na bázi kondenzovaných derivátů thienothiofenu a thienofuranu. V jeho rámci jsme několikastupňovým postupem syntetizovali doposud v literatuře nepopsaný dithienofuran **I**.



Reaktivita nového základního heterocyklu *I* byla studována v elektrofilních substitučních i metalačních reakcích s cílem vypracovat syntetické cesty a připravit nové sloučeniny pro studium jejich elektronických vlastností.

Tento projekt byl finančně podporován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt Barrande MEB 020945).

#### LITERATURA

1. *Functional Organic Materials* (Eds.: T. J. J. Müller, U. H. F. Bunz), Wiley-VCH, Weinheim 2007.
2. *Organic Electronics* (Ed.: H. Klauk), Wiley-VCH, Weinheim 2006.
3. Hergue N., Mallet Ch., Touvron J., Allain M., Leriche P., Frère P.: *Tetrahedron Lett.* 49, 2425 (2008).
4. Mallet Ch., Alévêque O., Kozmík V., Svoboda J., Frère P.: *Int. Conference on Organic Electronics, ICOE 2010, June 22-25, Université Paris VII, France 2010.*

#### PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ NA BÁZI MODIFIKOVANÉHO HYALURONANU

**MARTIN PRAVDA, MARCELA FOGLAROVÁ, MIROSLAVA BERKOVÁ, JANA DVOŘÁKOVÁ, DANIELA ŠMEJKALOVÁ, RADOVAN BUFFA, VLADIMÍR VELEBNÝ**

CPN spol. s r.o. 561 02 Dolní Dobrouč 401  
pravda@contripro.cz

Hyaluronová kyselina (HA) je vysokomolekulární glykosaminoglykan, který je nezbytnou součástí extracelulární matrix tkání živočišných organismů<sup>1</sup>. Vysoká rozpustnost ve vodě a krátký biologický poločas omezuje využití nativní HA pro účely tkáňového inženýrství. Tyto problémy lze řešit přípravou hydrogelů ze zesílených derivátů HA<sup>2</sup>. Jedním ze způsobů přípravy takovýchto materiálů je zesílení fenolických derivátů HA<sup>3</sup>.

Cílem této práce byla syntéza tyraminem (Tyr) modikovaného derivátu HA sloužícího pro přípravu hydrogelů. Prvním krokem syntézy byla oxidace primární hydroxylové skupiny v poloze 6 *N*-acetylglukosaminu na aldehyd. Ten reagoval s aminoskupinou tyraminu za vzniku iminu, který byl stabilizován redukcí na sekundární amin. Syntéza byla provedena ve vodném prostředí bez izolace meziproductů („one pot“). Vzniklý derivát byl podroben síťovací reakcí, která byla katalyzována křenovou peroxidáasou (HRP). Jako iniciátor reakce byl využit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (viz schéma 1).

Struktura fenolického derivátu a hydrogelů byla potvrzena pomocí NMR spektroskopie. Chemická struktura hydrogelů byla studována po jejich enzymatické degradaci bovinní hyaluronidasou (BHT). Testy provedené na buňkách linie myších fibroblastů 3T3 prokázaly, že připravené deriváty

neovlivňují viabilitu sledovaných buněk a jsou vhodné pro vývoj nových materiálů s využitím v tkáňovém inženýrství.

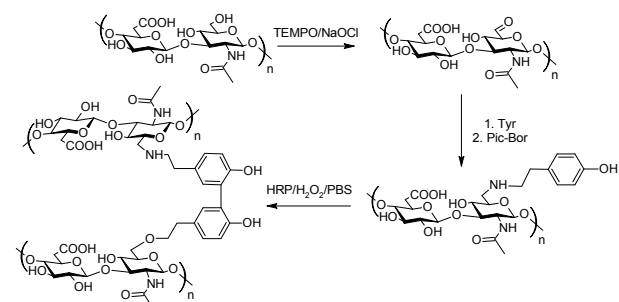


Schéma 1.

Tato práce vznikla za podpory MPO - Programový projekt výzkumu a vývoje TIP FR-TII/150.

#### LITERATURA

1. Scott J. E., Heatley F.: *Biomacromolecules* 3, 547 (2002).
2. Zheng Shu X., Liu Y., Palumbo F. S., Luo Y., Prestwich G. D.: *Biomaterials* 25, 1339 (2004).
3. Sakai S., Kawakami K.: *J. Biomed. Mater. Res., A* 85, 345 (2008).

#### SYNTÉZA PERFLUORALKYLOVANÝCH DERIVÁTŮ SFINGOSINU

**EVA PRCHALOVÁ, MARTIN KOTORA\***

<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
eva.prchalovamail.com, kotora@natur.cuni.cz

Sfingolipidy jsou nedílnou součástí buněčné membrány eukaryotických organismů a hrají klíčovou roli především v procesech přenosu nervového vzruchu a buněčné komunikace. Jejich struktura je odvozena od sfingosinu, nenasyceného aminoalkoholu s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. Naším cílem bylo připravit deriváty sfingosinu, nesoucí perfluoralkylované řetězce různých délek. Rozhodli jsme se využít metodu zkřížené metatéze (cross-metathesis) terminálních alkenů s perfluoralkylovanými propeny **4**, která byla vyvinuta v naší laboratoři<sup>1</sup>.

Vinylací chráněného L-serinu **1** byl připraven<sup>2</sup> keton **2**, jehož následná stereoselektivní redukce vedla k výchozímu alkenu **3a** (schéma 1). Zkřížená metatéze olefinů **3a** nebo **3b** s třemi různými perfluoralkylovanými propeny **4a-4c** byla katalyzována Hoveyda-Grubbsovým katalyzátorem druhé generace<sup>3</sup> a poskytla požadované deriváty sfingosinu **5** a **6** v izolovaných výtežcích v rozmezí 20-35 % (schéma 2). Zásadní pro výtěžek reakce se ukázal být vliv teploty a mikrovlnného záření.

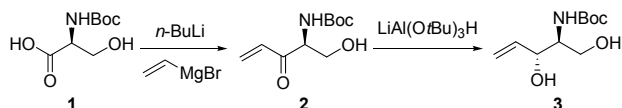


Schéma 1.

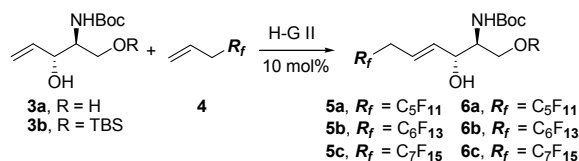


Schéma 2.

Tato práce vznikla za podpory grantu IAA400550609, Z40550506, LC06077, a MSM002162085.

## LITERATURA

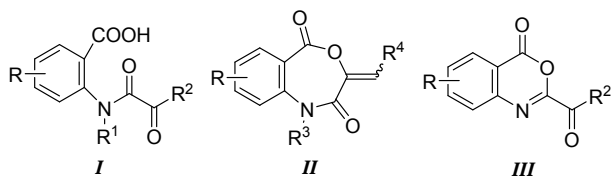
- (a) Eignerová B., Dračinský M., Kotora M.: Eur. J. Org. Chem. 2008, 4493. (b) Eignerová B., Slavíková B., Buděšínský M., Dračinský M., Klepetářová B., Šťastná E., Kotora M.: J. Med. Chem. 52, 5753 (2009). (c) Eignerová B., Janoušek Z., Dračinský M., Kotora M.: Synlett 2010, 885.
- Roemmele R. C., Rapoport H.: J. Org. Chem. 54, 1866 (1989).
- Yamamoto T., Hasegawa H., Hakogi T., Katsamura S.: Org. Lett. 8, 5569 (2006).

## SYNTHESES OF HETEROCYCLES VIA 2-(2-OXOALKANAMIDO)BENZOIC ACIDS

**KAREL PROISL<sup>a</sup>, LUCIE SLINTÁKOVÁ<sup>a</sup>, DAMIJANA URANKAR<sup>b</sup>, JANEZ KOŠMRLJ<sup>b</sup>, STANISLAV KAFKA<sup>a</sup>**

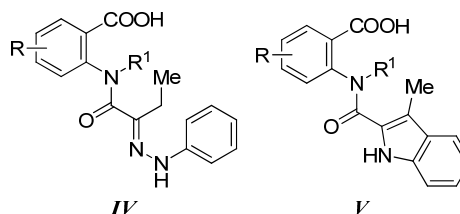
<sup>a</sup> Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, 762 72 Zlin, Czech Republic; <sup>b</sup> Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenia [kafka@ft.utb.cz](mailto:kafka@ft.utb.cz); [janez.kosmrlj@fkkt.uni-lj.si](mailto:janez.kosmrlj@fkkt.uni-lj.si)

*N*-( $\alpha$ -Ketoacyl)anthranilic acids **I**, which are easily available<sup>1-3</sup> by the oxidative pyridine ring cleavage of 3-hydroxyquinoline-2,4(1*H*,3*H*)-diones, can be cyclized under dehydration conditions to 4,1-benzoxazepine-2,5(1*H*,3*H*)-diones **II** or 4*H*-3,1-benzoxazin-4-ones **III** depending on substituents  $R^1$  and  $R^2$  as well as on dehydrating agent.



Phenylhydrazones **IV**, which were prepared from substrates **I** ( $R^2$  = ethyl) by usual manner, appear to be useful precursors for the Fischer synthesis of indole derivatives **V**.

The structures of compounds under investigation (**I–V**) were confirmed by NMR spectroscopy.



This study was supported by the internal grant of TBU in Zlin No. IGA/18/FT/10/A funded from the resources of specific university research.

## REFERENCES

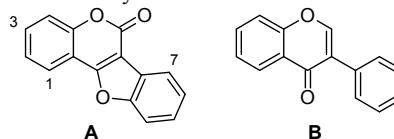
- Podesva C., Solomon C., Vagi K.: Can. J. Chem. 46, 435 (1968).
- Kafka S., Košmrlj J., Kašpárková V.: Chem. Listy 102, 690 (2008).
- Kafka S., Kašpárková V., Proisl K., Košmrlj J.: 13th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Bled, September 20 – 23, 2009.

## IMUNOAFINITNÍ SORBENT PRO STANOVENÍ KUMESTROLU V ROSTLINNÉM MATERIÁLU

**ELIŠKA CHYTILOVÁ<sup>a</sup>, ELENA A. PROKUDINA<sup>a</sup>, PETRA LANKOVÁ<sup>a</sup>, OLDRICH LAPČÍK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 [elena.prokudina@vscht.cz](mailto:elena.prokudina@vscht.cz)

Kumestany patří do skupiny isoflavonoidů, sekundárních metabolitů rostlin (Obr. 1). Významným zdrojem kumestanů jsou bobovité rostliny (*Leguminosae*), ale jejich přítomnost byla zjištěna v dalších čeledích (*Poaceae*, *Asteraceae* a *Chenopodiaceae*)<sup>1,2</sup>. Tato skupina polyfenolických látek je zajímavá z hlediska svých biologických účinků (estrogenních, antikancerogenních, antioxidačních, antivirových etc.). Rostlinný materiál má složitou matici, což komplikuje identifikaci analytů přítomných v nízkých koncentracích. Jednou z možností je specifické přečištění a zakoncentrování rostlinného extraktu před analýzou pomocí imunoafinitní chromatografie (IAC). Tato práce se věnuje vývoji imunosorbentu (IS) specifického pro kumestrol a jeho strukturální deriváty.



Obr. 1. Základní skelet (A) kumestanu a (B) isoflavonu

Sorbent byl připraven imobilizací imunoglobulinové frakce králíčího antiséra proti konjugátu 3-O-karboxymethyl-

kumestrolu s hovějším sérovým albuminem na nosič Affi-Gel 10 (BioRad). Vodno-ethanolové extrakty z bobů mungo (*Vigna mungo*), sojových bobů (*Glycine max*) a rýže seté (*Oryza sativa*) byly analyzovány HPLC-ESI-MS jednak přímo, po přečištění vzorku SPE a po IAC. Imunoafinitní extrakce se ukázala jako efektivnější metoda úpravy vzorku, poskytující dobře interpretovatelné chromatogramy i u velmi nízkých koncentrací analytu. Obsah kumestrolu v nenaklíčených bobech mungo byl 7,15 µg/g sušiny a v naklíčených 1,25 µg/g sušiny. Naklíčené sojové boby obsahovaly kumestrol ve množství 4,04 µg/g sušiny.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 525/09/0994 a MSM 6046137305.*

#### LITERATURA

- Lapčík O., Štursa J., Kleinová T., Vítková M., Dvořáková H., Klejdus B., Moravcová J.: *Steroids* 68, 1147 (2003).
- Lapčík O.: *Phytochemistry* 68, 2909 (2007).

#### METALLAKARBORANY: PŘÍPRAVA, STUDIUM INTERAKCÍ A POTLAČENÍ AGREGACE VE VODNÉM PROSTŘEDÍ

**JAKUB RAK<sup>a</sup>, MILAN JAKUBEK<sup>a</sup>, ROBERT KAPLÁNEK<sup>a</sup>, VLADIMÍR KRÁL<sup>a</sup>, PAVEL MATĚJÍČEK<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha; <sup>b</sup>Katedra Fyzikální a makromolekulární chemie, Univerzita Karlova, Praha [jakub.rak@gmail.com](mailto:jakub.rak@gmail.com)

Potenciální uplatnění metallakarbonů v medicíně je široké (např. pro boronovou neutronovou zachytovou terapii, jako modulátory enzymové aktivity HIV proteasy, protein kinasy C a syntetasy oxidu dusnatého či jako kontrastních látek pro MRI a PET)<sup>1,2</sup>, avšak zásadní komplikací pro jejich praktické využití je jejich nízká biodostupnost (podíl léčiva podaného pacientovi, které se dostane až k cílovému aktivnímu místu). Biodostupnost je ovlivněna především nízkou rozpustností a spontánní agregací ve vodném prostředí<sup>3</sup>, což následně vede k zanedbatelnému prostupu agregátů buněčnými membránami a limituje schopnost dostat se až aktivnímu místu.

Z tohoto důvodu jsme připravili deset derivátů metallakarbonu a systematicky studovali jejich rozpustnost a agregaci ve vodném prostředí. Dále jsme studovali interakce metallakarbonů s biokompatibilními excipienty (nosiče, bez farmaceutické aktivity, které však zvyšují biodostupnost jiných farmaceuticky aktivních látek) ve snaze o bližší pochopení principů interakce a nalezení univerzálně vhodných excipientů pro zvýšení biodostupnosti metallakarbonů a umožnění jejich farmaceutického využití.

Ukázali jsme, že jejich rozpustnost lze zvýšit použitím několika vhodných biokompatibilních pomocných látek, avšak pouze heptakis (2,6-di-O-methyl)-β-cyklohextrin vykazuje schopnost kompletně potlačit agregaci všech derivátů.

*Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (projekt LC512 a*

*MSM 0021620857), GAČR (grant 203/09/1311) a GAAV (grant KAN200100801).*

#### LITERATURA

- Řezáčová P., Pokorná J., Brynda J., Kožíšek M., Cígler P., Lepšík M., Fanfrlík J., Řezáč J., Grantz Šašková K., Siegllová I., Plešek J., Šícha V., Grüner B., Oberwinkler H., Sedláček J., Krausslich H. G., Hobza P., Král V., Konvalinka J.: *J. Med. Chem.* 52, 7132 (2009).
- Valliant J. F., Guenther K. J., King A. S., Morel P., Schaffer P., Sogbein O. O., Stephenson K. A.: *Coord. Chem. Rev.* 232, 173 (2002).
- Rak J., Kaplánek R., Král V.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 1045 (2010).

#### ORGANOKATALYTICKÁ SYNTÉZA PĚTICLENNÝCH KARBOCYKLIČKÝCH SLOUČENIN

**MAREK REMEŠ, JAN VESELÝ**

*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2 [mararemes@seznam.cz](mailto:mararemes@seznam.cz)*

Organokatalýza využívající aktivace sekundárními aminy nabízí kromě reakcí probíhajících výhradně iminiovým či enamiovým katalytickým mechanismem<sup>1</sup> reakční cesty vzniklé kombinací uvedených mechanismů a vytvoření kaskádových, tandemových či domino reakcí. Tento přístup odstraňuje jak časově náročnou manipulaci se zavedením a odstraněním chránících skupin, tak čištění a izolaci intermediátů. Reakce navíc často probíhají za mírných podmínek a pozorována je vysoká tolerance k funkčním skupinám<sup>2</sup>.

Zabývali jsme se přípravou pěticleenných karbocyklických sloučenin z derivátu β-diketonu a α,β-nenasycených aldehydů s využitím domino-reakce katalyzované komerčně dostupným derivátem prolinu. Reakce probíhala za velmi mírných podmínek s vysokou diastereoselektivitou.

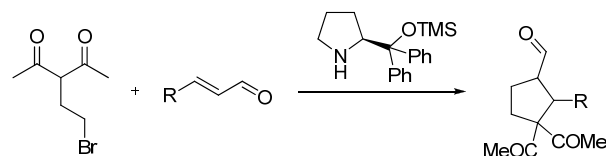


Schéma 1: Organokatalytická cyklizační domino-reakce

*Tato práce vznikla za podpory grantů MSM0021620857 a GAUK 2009/93109.*

#### LITERATURA:

- List B.: *Chem. Commun.* 2006, 819.
- Enders, D.; Jeanty, M.; Grondal, C.: *Nature Chem.* 2, 167 (2010).

## SYNTEZA MODIFIKOVANÉ DNA S NÁSLEDNÝM STUDIEM FLUORESCENČNÍCH A NMR VLASTOSTÍ

JAN RIEDL, MICHAL HOCEK

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6.  
riedl@uochb.cas.cz, hocek@uochb.cas.cz

Modifikované nukleové kyseliny získávají na významu z hlediska možných aplikací, jež mohou zasahovat do oblasti biosenzorů, terapie či katalýzy<sup>1</sup>. V naší skupině byla vyvinuta metodika přímé syntézy modifikovaných nukleosid trifosfátů Suzukiho kaplinkem ve vodné fázi za použití halogenovaných 2'-deoxynukleosid trifosfátů a boronových kyselin<sup>2</sup>. Tato práce je zaměřena na syntézu funkcionalizovaných oligonukleotidů, které nesou funkční molekuly, jež by umožnily detekci pomocí fluorescence či <sup>19</sup>F NMR spektrometrie.

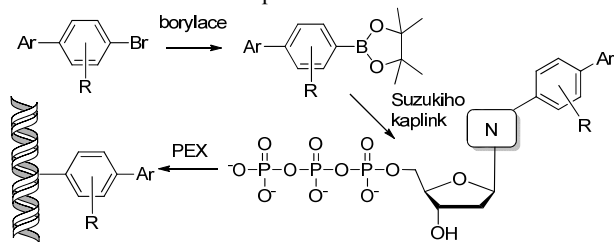


Schéma 1. Schéma enzymatického zavedení modifikace do DNA

Jako vhodní kandidáti z hlediska syntézy a aplikace byly vybrány deriváty obsahující biarylovou skupinu, jež jsou přímo navázány na nukleobázi, což umožňuje konjugaci celého systému a tím potenciální změnu fluorescence v závislosti na změnách struktury DNA. Byla připravena série bromidů biarylových derivátů, které byly následně borylovány a získané pinakolestery boronových kyselin byly za použití Suzukiho kaplinku ve vodné fázi přímo připojeny k 2'-deoxynukleosid trifosfátům. Absorpční maxima získaných fluorescenčních modifikovaných nukleosid trifosfátů se dostatečně liší od svých emisních maxim a zároveň od absorpčních maxim DNA, což umožňuje pohodlné měření. Fluorescenční modifikované nukleosid trifosfáty byly následně inkorporovány několika DNA polymerasami a vzniklé oligonukleotidy byly studovány fluorescenčními metodami a <sup>19</sup>F NMR spektroskopii

Tato práce vznikla za podpory grantu UOCHB AVČR (Z4 055 0506), MŠMT ČR (LC512), Grantovou agenturou ČR (203/09/0317) a AVČR (IAA400040901).

### LITERATURA

- Heller M. J.: *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 4, 129 (2002).
- Čapek P., Pohl R., Hocek M.: *Org. Biomol. Chem.* 4, 2278 (2006).
- Cahová H., Havran L., Brázdilová P., Pivoňková H., Pohl R., Fojta M., Hocek M.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 2059 (2008).

## NEW HETEROCYCLIC COMPOUNDS FOR MOLECULAR ELECTRONICS

LUCIE ŘEHOVÁ, VÁCLAV KOZMÍK, JIŘÍ SVOBODA

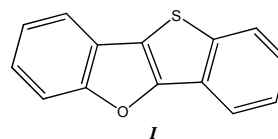
Department of Organic Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6  
rehova@uochb.cas.cz

Organic field-effect transistors (OFETs) have generated great interest in the past decade because of their technological potential as a cheap alternative for the current amorphous silicon-based thin film transistors<sup>1</sup>. To realize their commercial application, however, further improvements in device performance are required.  $\pi$ -Conjugated molecules such as thiophene oligomers<sup>2</sup> led to many modifications in their electronic properties. In this preliminary contribution we report synthesis of a new type fused heterocyclic system – benzothienobenzofuran (**I**) as the parent compound for synthesis of 2,7-disubstituted derivatives as potential candidates for novel OFETs.

Preparation of symmetrically substituted compounds was based on cross-coupling reactions of 2,7-diiodo[1]-benzothieno[3,2-*b*][1]benzofuran with the corresponding alkynyl or alkylaryl chains. Electrophilic acylation and subsequent reduction was also used for synthesis of dialkyl derivate.

S-oxides were obtained from dialkyl derivate and their spectral properties were studied. It was found that S-oxides, in contrast to starting material, exhibit fluorescent properties.

Finally, a new synthesis of 7-iodo[1]benzothieno[3,2-*b*][1]benzofuran as an intermediate for synthesis of non-symmetrically substituted compounds was developed.



We thank to the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project No. 6046137301) and bilateral project Barrande MEB 020945 for financial support of this project.

### REFERENCES

- (a) Katz H. E., Bao Z., Gilat S. L.: *Acc. Chem. Res.* 34, 359 (2001); (b) Sun Y., Liu Y., Zhu D.: *J. Mater. Chem.* 15, 53 (2005).; (c) Roncali J., Blanchard P., Frère P.: *J. Mater. Chem.* 15, 1589 (2005).
- Fichou D.: *Handbook of Oligo- and Polythiophenes*, Wiley-VCH, Weinheim 1999.

## REGIOSELEKTIVNĚ MONOSUBSTITUOVANÉ DERIVÁTY $\alpha$ -CYKLODEXTRINU

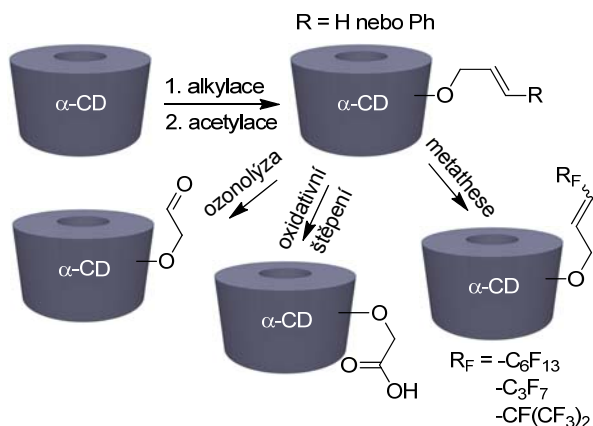
**MICHAL ŘEZANKA, JINDŘICH JINDŘICH**

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

Cyklodextriny<sup>1</sup> jsou cyklické oligosacharidy složené z D-glukopyranosových jednotek spojených  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidickou vazbou, které tvoří rigidní kavitu, která je schopná tvořit inkluzní komplexy s hostujícími molekulami vhodné velikosti, tvaru a lipofility. Této strukturní vlastnosti cyklodextrinů i jejich derivátů je hojně využíváno v chemické praxi. Aby bylo možné rozšířit využití cyklodextrinů, je nezbytné připravit jejich vhodné deriváty.

Naše skupina se zabývá převážně syntézou monosubstituovaných derivátů cyklodextrinů. Velmi výhodnými skupinami pro tuto monoderivatizaci jsou allylová nebo cinnamylová skupina<sup>2</sup>, jelikož obsahují dvojnou vazbu, která je široce modifikovatelná.

Náš výzkum je zaměřen na přípravu sady monosubstituovaných 2-O, 3-O a 6-O allyl nebo cinnamyl derivátů  $\alpha$ -cyklodextrinu a jejich štěpení na formylmethyl nebo karboxymethyl deriváty. Tyto deriváty jsou vhodnými intermediáty pro další syntézu. Jako například pro syntézu derivátů  $\alpha$ -cyklodextrinu s fluorovanými postranními řetězci<sup>3</sup> pro biomedicinské aplikace<sup>4</sup>.



*Tento projekt je podporován granty MSM0021620857, IAA 400550609 a KAN 200200651.*

### LITERATURA

1. Szejtli J.: Chem. Rev. 98, 1743 (1998).
2. Jindřich, J., Tišlerová I.: J. Org. Chem. 70, 9054 (2005).
3. Řezanka, M., Eignerová, B., Jindřich, J., Kotora, M.: Eur. J. Org. Chem. v tisku.
4. Abila M., Durand G., Pucci B. J.: Org. Chem. 73, 8142 (2008).

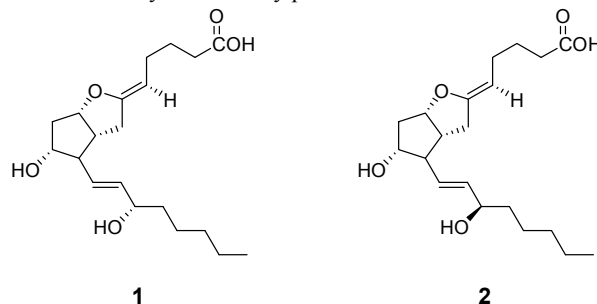
## SYNTEZA 15-EPI-PROSTACYKLINU

**MICHAL SEDLÁK, IVAN VESELÝ**

*CaymanPharma s. r. o., ul. Práce 657, 277 11 Neratovice  
michal.sedlak@caymanpharma.cz*

Při registraci našeho výrobku epoprostenol sodná sůl byl u japonského a norského úřadu vznesen požadavek, abychom prokázali přítomnost 15-epimeru jakožto potenciální nečistoty při syntéze prostacyklinu.

V sedmi krocích byl syntetizován 15-epimer prostacyklinu (**2**), který je potenciálním kontaminantem námi vyráběného léčiva (API) Epoprostenolu (**1**). Referenční standard nečistoty ve formě sodné soli byl použit pro kvalifikaci analytické metody pro kontrolu API.



### LITERATURA

1. Bowman P. B., Hartman P. A.: J. Chromatogr. 291, 283 (1984).

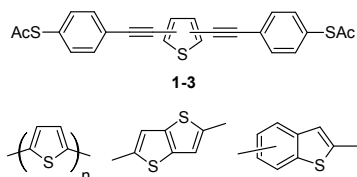
## PŘÍPRAVA NOVÝCH HETEROAROMATICKÝCH SLOUČENIN A JEJICH CHARAKTERIZACE Z HLEDISKA MOLEKULÁRNÍ VODIVOSTI

**ARNOŠT SEIDLER<sup>a,b</sup>, IVO STARÝ<sup>a</sup>, JIŘÍ SVOBODA<sup>b</sup>**

*<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6; <sup>b</sup>Ústav organické chemie, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Arnost.Seidler@vscht.cz*

Současný trend elektronické technologie křemíkových čipů se dostává do oblasti navrhování funkčních prvků molekulární velikosti<sup>1</sup>. V této oblasti elektrotechnologie jsme omezeni určitou minimální limitní velikostí funkčních prvků využívajících křemíkových materiálů. Nehledě na vodivé organické polymery a organické tenkovrstvé tranzistory<sup>2</sup> se zde objevuje novodobá myšlenka využití jednomolekulové elektrotechniky<sup>3</sup>, která je založena na principu použití jedné molekuly jako elektrického vodiče. Elektrická vodivost jedné molekuly se dá měřit koordinací této molekuly mezi dva ostré hroty kovového mechanicky kontrolovatelně přetrženého vodiče (MCBs = mechanically controllable break-junction)<sup>4,5</sup>. Jako kovový vodič se využívá zlato a pro koordinaci molekuly ke kovu se nejčastěji zavádějí do molekuly dvě thiolové funkční skupiny.

V rámci projektu připravujeme nové typy vodivých materiálů, které obsahují různorodě substituované heteroaromatické jádro se dvěma thiolovými terminálními funkčními skupinami (Obr. 1). Důležitou podstatou připravovaných látek je to, aby kotvící atomy síry byly propojeny konjugovaným systémem vazeb.



Obr. 1. Modelové materiály 1-3 na bázi disubstituovaného thiofenu a další centrální jádra

Molekulární vodivost připravených materiálů bude studována metodou MCBs.

Projekt byl financován z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21/2010) a projektu GAČR 202/09/0047.

#### LITERATURA

1. *Functional Organic Materials* (Eds.: T. J. J. Müller, U. H. F. Bunz), Wiley-VCH, Weinheim 2007.
2. *Organic Electronics* (Ed.: H. Klauk), Wiley-VCH, Weinheim 2006.
3. Joachim C., Gimzewski J. K., Aviram A.: *Nature* 408, 541 (2000).
4. Scheer E., Agraït N., Cuevas J., Yeyati A. L., Ludophk B., Martín-Rodero A., Bollinger G. R., van Ruitenbeek J. M., Urbina C.: *Nature* 394, 154 (1998).
5. Reichert J., Ochs R., Beckmann D., Weber H. B., Mayor M., van Löhneysen H.: *Phys. Rev. Lett.* 88, 176804 (2002).

#### SADDLEQUAT: HELQUAT PŘISTIŽENÝ NA RACEMIZAČNÍ CESTĚ

**LUKÁŠ SEVERA, LOUIS ADRIAENSSENS, JAN VÁVRA, IVANA CÍSAŘOVÁ, DUŠAN KOVAL, VÁCLAV KAŠIČKA, FILIP TEPLÝ\***

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
severa@uochb.cas.cz

V naší skupině byla nedávno vyvinuta robustní syntéza nové skupiny helikálních dikationů, tzv. helquatů<sup>1,2</sup>, která je založena na [2+2+2] cykloisomeraci dikationických triynů.

V tomto příspěvku se budu zabývat jednou anomálií, kdy při [2+2+2] cykloisomeraci triynu **1** nevzniká pouze helquat **2**, ale i jeho diastereoisomer **3** (Schéma 1). Kapilární elektroforéza s chirálním selektorem<sup>3</sup> ukázala, že se jedná o dvě chirální látky. Tyto dvě látky, z nichž helquat **2** je termodynamickým produktem, byly od sebe separovány.

Pomocí NMR analýzy byla se značnou jistotou potvrzena hypotéza, že se jedná o isomery v helikální (helquat **2**) a sedlové konformaci (saddlequat **3**). Saddlequat **3** se podařilo rozštěpit na enantiomery<sup>3</sup> a rentgenostrukturní analýza jednoznačně potvrdila jeho totožnost a absolutní konfiguraci. Opticky čistý saddlequat **3** byl při 100 °C v DMSO konvertován na opticky čistý helquat **2**. Absolutní konfigurace takto vzniklého helquatu **2** byla potvrzena pomocí rentgenostrukturní analýzy.

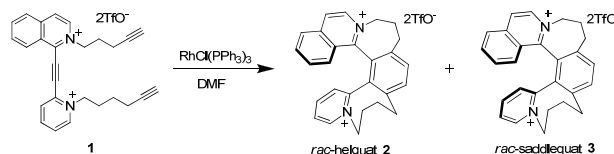


Schéma 1. [2+2+2] Cykloisomerace triynu za vzniku směsi sedla a helixu

Na závěr lze říci, že byl charakterizován saddlequat **3** jako unikátní chirální sedlový intermediát na racemizační cestě mezi pravotočivým a levotočivým helquatem **2**.

Tato práce vznikla za podpory GAČR 203/09/1614 a UOCHB AVČR v.v.i. (ZA 055 0506).

#### LITERATURA

1. Adriaenssens L., Severa L., Šalová T., Císařová I., Pohl R., Šaman D., Rocha S.V., Finney N.S., Pospíšil L., Slaviček P., Teplý F.: *Chem. Eur. J.* 15, 1072 (2009).
2. Severa L., Adriaenssens L., Vávra J., Šaman D., Císařová I., Fiedler P., Teplý F.: *Tetrahedron* 66, 3537 (2010).
3. Severa L., Koval D., Novotná P., Ončák M., Sázelová P., Šaman D., Slaviček P., Urbanová M., Kašička V., Teplý F.: *New J. Chem.* 34, 1063 (2010).

#### SYNTÉZA, STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE A ELEKTROCHEMICKÉ CHOVÁNÍ ANIONTOVÉHO HEXAVANADIČNANU MODIFIKOVANÉHO FERROCENOVÝMI SKUPINAMI

**JIŘÍ SCHULZ, RÓBERT GYEPES, IVANA CÍSAŘOVÁ, PETR ŠTĚPNIČKA\***

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2  
stepnic@natur.cuni.cz

Polyoxometaláty přechodných kovů tvoří skupinu strukturně různorodých molekulových oxidů<sup>1</sup>. Obrovské množství jejich proměnlivých strukturních motivů, složení a velikostí klastrů vede k celé řadě zajímavých vlastností, které mohou být dále cíleně modifikovány prostřednictvím inzerce heteroatomů. Některé polyoxometaláty tak mohou vykazovat luminiscenci, neobvyklé magnetické chování či redoxní vlastnosti<sup>2</sup>. Atomy kyslíku ve struktuře klastrů mohou být navíc nahrazeny celou řadou kyslíkatých, dusíkatých či sirmých donorů<sup>3</sup>. Do molekul polyoxometalátů tak lze poměrně snadno zavádět nové fragmenty<sup>4</sup>.

Tento příspěvek se zaměřuje na syntézu a charakterizaci nového hexavanadičnanového aniontu se složením  $[V_6O_{13}\{(OCH_2)_3C(CONHFc)\}]^{2-}$  (schéma 1; Fc = ferrocenyl), který je modifikován dvěma elektrochemicky aktivními ferrocenovými jádry<sup>5</sup>. Příprava, strukturální charakterizace a studie elektrochemického chování této sloučeniny je prezentována společně s výsledky teoretických výpočtů.

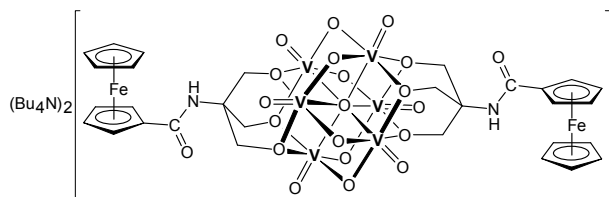


Schéma 1

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR (projekt LC 06070) a Grantové agentury UK (projekt 69309).

#### LITERATURA

1. Long D.-L., Burkholder E., Cronin L.: Chem. Soc. Rev. 36, 105 (2007).
2. (a) Ito T., Yashiro H., Yamase T.: Langmuir 22, 2806 (2006). (b) Muller A., Sessoli R., Krickmeyer E., Bolgge H., Meyer J., Gatteschi D., Pardi L., Westphal J., Hovemeier K., Rohlfing R., Dolring J., Hellweg F., Baugholt C., Schmidtman M.: Inorg. Chem. 36, 5239 (1997).
3. Chen Q., Goshorn D. P., Scholes C. P., Tan X.-L., Zubieta J.: J. Am. Chem. Soc. 114, 14667 (1992).
4. Han J. W., Hardcastle K. I., Hill C. L.: Eur. J. Inorg. Chem. 2006, 2598.
5. Schulz J., Gyepes R., Císařová I., Štěpnička P.: New. J. Chem., doi: 10.1039/C0NJ00421A (2010).

#### FLUOROVÉ TRIPYRAZOLYLMETHANOVÉ LIGANDY A JEJICH KOMPLEXY

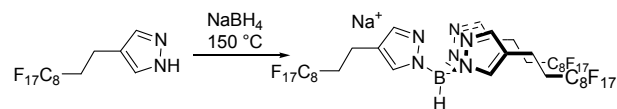
**VERONIKA SKALICKÁ, MARIE DYMIČOVÁ, MARTIN SKALICKÝ, JAROSLAV KVÍČALA**

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
veronika.skalicka@vscht.cz

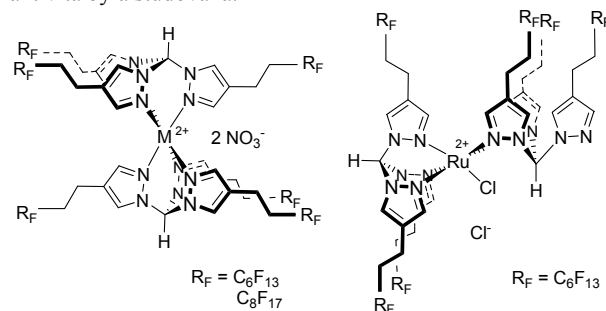
Tripyrazolylmethany jsou neutrální uhlíkatá analoga tripyrazolylborátů. Tyto ligandy komplexují téměř všechny kationty kovů<sup>1,2</sup> a hrají tak důležitou roli v koordinační chemii. S cílem získat nové komplexy s fluorovými vlastnostmi jsme studovali připojení polyfluoralkylovaného řetězce do polohy 4 pyrazolových jader tripyrazolylmethanu a tripyrazolylborátu.

Klíčovou reakcí v syntéze byla Heckova reakce (perfluoralkyl)ethenu s tritylovou skupinou chráněným 4-jodpyrazolem, která byla optimalizována s využitím různých bází a fosfanových ligandů. Následná deprotektace a hydrogenace vedla ke klíčovému intermediátu, využitému k syntéze tris {4-[2-(perfluoralkyl)ethyl]pyrazol-1-yl}methanu. Reakcí

fluorovaného intermediátu v tavenině s  $NaBH_4$  jsme získali tris {4-[2-(perfluoralkyl)ethyl]pyrazol-1-yl}borát.



Ligandy byly použity pro modelové komplexační reakce s dusičnany kovů. Úspěšně tak byly připraveny sendvičové komplexy s mědí, kobaltem a niklem. Dále byl reakcí s chloridem ruthenitým získán komplex, jehož katalytická aktivita byla studována.



Děkujeme Ministerstvu školství, mádeže a tělovýchovy (projekt KONTAKT ME09114-ME857, Výzkumné centrum LC 06070, Výzkumný záměr číslo 6046137301) za finanční podporu.

#### LITERATURA

1. Pettinari C., Pettinari R: Coord. Chem. Rev. 249, 525 (2005).
2. Trofimenko S.: Chem. Rev. 93, 943 (1983).

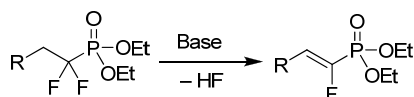
#### STEREOSELECTIVE PREPARATION OF (E)-1-FLUOROVINYLPHOSPHONATES FROM 1,1-DIFLUOROPHOSPHONATES

**PETR BEIER\*, ANTON SLAZHNEV, PRABHAKAR CHERKUPALLY**

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

Formation of 1-fluorovinylphosphonates was achieved from 1,1-difluorophosphonates by hydrogen fluoride elimination using different bases. In cases of EtONa and  $CF_3CH_2ONa$  good results were obtained. It was discovered that only *E*-isomer of 1-fluorovinylphosphonates is formed after elimination with any base (Scheme 1). The method is superior to that published in literature based on addition of carbanion derived from fluorobisphosphonate to aldehydes or ketones followed by Horner elimination<sup>1-3</sup>.





Scheme 1

## LITERATURE

- Blackburn M. G., Parrat J.K.: J. Chem.Soc., Chem. Commun. 1982, 1270.
- Blackburn M. G., Parrat J.K.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. I 1986, 1417.
- Jorga B., Eymery F., Savignac F.: Tetrahedron Lett. 39, 4477 (1998).

## FOTOCHEMIE 2-METHYL-4-HYDROXYFENACYLŮ

**PETER ŠEBEJ<sup>a,b</sup>, RICHARD S. GIVENS<sup>b</sup>, PETER KLÁN<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup>Ústav chemie, PFF, Masarykova Univerzita, 625 00 Brno-Bohunice, a RECETOX, MU, 625 00 Brno-Bohunice, <sup>b</sup>Dept Chem., Univ. Kansas, 1251 Wescoe Hall Dr., 66045 Lawrence, USA  
klan@sci.muni.cz, sebej@mail.muni.cz

Fenacylové fotolabilní chránící skupiny<sup>1</sup> náležejí široké uplatnění v chemii a biochemii<sup>2</sup>. 2,5-Dimethylfenacylové<sup>3</sup> a 4-hydroxyfenacylové<sup>4</sup> skupiny byly intenzivně zkoumány v posledním desetiletí, jelikož odštěpují různé odstupující skupiny s velmi dobrým chemickým i kvantovým výtěžkem.

V této práci byla připravena série 2-methyl-4-hydroxyfenacyl esterů **1**. V závislosti na vlastnostech prostředí (např. na přítomnosti vody v rozpouštědle) vede jejich fotolýza, vedle kvantitativního odštěpení volné kyseliny (HX), buď k přesmyku na fenylactovou kyselinu **2** nebo ke tvorbě cyklizačního produktu **3** (Schéma). Mechanismus pozorované dichotomie fotochemické transformace 2-methyl-4-hydroxyfenacylového chromoforu se nyní studuje pomocí laserové zábleskové spektroskopie.

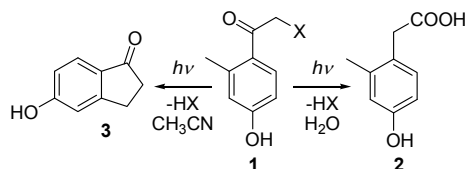


Schéma. V závislosti na prostředí může fotoiniciovaná reakce 2-methyl-4-hydroxyfenacylu poskytovat různé produkty.

Tato práce vznikla za podpory grantů GA ČR 203/09/0748, AMVIS (ME09021) a EU ((CETOCOEN, CZ.1.05/2.1.00/01.0001; administrován MŠMT ČR).

## LITERATURA

- Greene T.W., Wuts P.G.M.: *Protective groups in organic synthesis*, 3. vyd., John Wiley & Sons, New York 1999.
- Klán P., Wirz J.: *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*, 1. vyd.; John Wiley & Sons., Chichester 2009.

- (a) Klán P., Zabadal M., Heger D.: Org. Lett. 2, 1569 (2000); (b) Pelliccioli A. P., Klán P., Zabadal M., Wirz J.: J. Am. Chem. Soc. 123, 7931 (2001).
- (a) Park C. H., Givens R. S.: J. Am. Chem. Soc. 119, 2453 (1997); (b) Stensrud K., Noh J., Kandler K., Wirz J., Heger D., Givens R. S.: J. Org. Chem. 74, 5219 (2009)

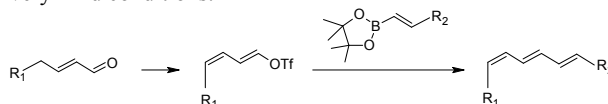
## NEW METHODS FOR THE PREPARATION OF INSECT SEX PHEROMONES

**PETR ŠEBESTA, ULLRICH JAHN**

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6  
sebesta@uochb.cas.cz

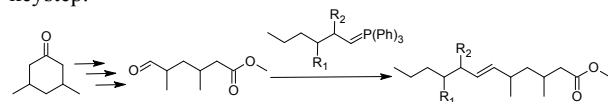
Synthetically prepared sex pheromones are important as reference samples to analyze natural sex pheromones, help to study insect behaviour, and facilitate to explain biosynthetic pathways.

One essential component of *Manduca sexta* sex pheromone was determined as (10*E*,12*E*,14*Z*)-hexadeca-10,12,14-trienal. We developed a new one-pot method for the synthesis *E,E,Z*-trienes using new *E,Z*-dienyl triflates from *trans*- $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes. Palladium-catalyzed cross-coupling with pinacol *trans*-vinylboronates proceeds under very mild conditions.



Many other *E,E,Z*-trienes and *E,Z*-dienes were synthesized in reasonable yield and good stereoselectivity using this method.

Only very scarce information is available about the sex pheromone of *Strepsiptera*. The pheromonal activity was assigned to a double or triple methyl-branched saturated C<sub>15</sub>-aldehyde, no further information except that two of the branches are in 3 and 5 position is available. For a most modular approach the Wittig reaction was chosen as the keystep.



R<sub>1</sub> = H, Me

R<sub>2</sub> = H, Me

This approach allows us to synthesize all possible enantiomers, which can be used for biological activity tests.

## REFERENCES

- Doolittle R.E., Braham A., Tumlinson J.H.: J. Chem. Ecol. 16, 1131 (1990).
- Cahiez G., Habiak V., Gager O.: J. Org. Chem. 73, 6871 (2008).

3. Chow S., Fletcher M. T., Lambert L. K., Gallagher O. P., Moore C. J., Cribb B. W., Allsopp P. G., Kitching W.: J. Org. Chem. 70, 1808 (2005).

### POUŽITÍ DERIVÁTŮ THIAZOLIDINKARBOXYLOVÉ KYSELINY PŘI SYNTÉZE PROBLÉMOVÝCH SEKVENCÍ Z PRIONOVÉHO PROTEINU

JAROSLAV ŠEBESTÍK, ZBIGNIEW ZAWADA, MARTIN ŠAFAŘÍK, JAN HLAVÁČEK

Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, vvi, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha  
jsebestik@seznam.cz

Prionové proteiny jsou považovány za původce neurodegenerativních onemocnění, jako je srbivka ovčí, nemoc šílených krav, Creutzfeldt-Jakobova nemoc, její nová varianta aj<sup>1</sup>. Peptid odvozený od sekvence lidského proteinu 106-126, je považován za jednu z nejobtížnějších sekvencí pro syntézu peptidů s využitím Fmoc/tBu strategie<sup>2</sup>. L-4-thiazolidin karboxylová kyselina se používá k syntéze peptidů a proteinů jako chráněný derivát N-terminálního cysteinu<sup>3</sup> a je komerčně dostupná. V naší práci jsem srovnali přístup k syntéze výše zmíněného peptidu s využitím nativní chemické ligace a desulfurizace s přístupem nahrazujícím každé reziduum alaninu v peptidové sekvenci za L-4-thiazolidin karboxylovou kyselinu (H-Thz-OH). Syntetizovaný peptid obsahoval 6 reziduí Thz, které byly otevřeny pomocí NH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> a následně desulfurizovány. Tato syntéza využila H-Thz-OH jako prolinový synthon H-Ala-OH. O prolinových reziduích je známo, že indukci polyprolin II helixu zabraňují vodíkovým interakcím rostoucích peptidů a tím potlačují nežádoucí agregaci během syntézy. Omezení agregace amyloidních sekvencí vede k hydrofilnějším peptidům, které lze snadno separovat s využitím HPLC.

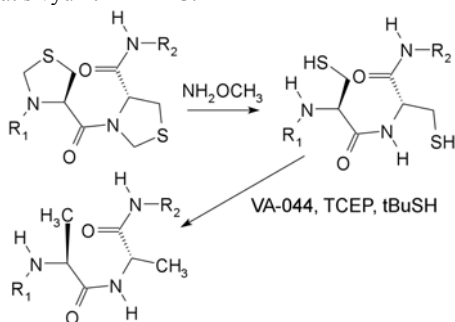


Schéma 1. Thiazolidinkarboxylová kyselina jako synthon alaninu.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 203-07-1517 a výzkumného záměru Z40550506.

#### LITERATURA

1. Prusiner S. B.: PNAS USA 95, 13363 (1998).
2. Jobling M., Barrow C., White A., Masters C., Collins S., Cappai R.: Lett. Pept. Sci. 6, 129 (1999).

3. Bang D., Kent S. B. H.: Angew. Chem. Int. Ed. 43, 2534 (2004).

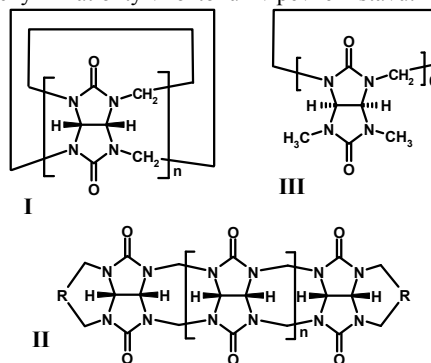
### SUPRAMOLEKULÁRNÍ HOSTITELSKÉ MOLEKULY VYCHÁZEJÍCÍ Z GLYKOLURILU

VLADIMÍR ŠINDELÁŘ\*, MAREK ŠTANCL, JAN ŠVEC, VÁCLAV HAVEL

Ústav chemie, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, Brno 625 00  
sindelar@chemi.muni.cz

Glykolurily a jejich deriváty jsou základními kameny pro stavbu supramolekulárních hostitelských molekul, jako jsou molekulární klipsy a sférické objekty. Nejznámějšími hostitelskými molekulami vycházejícími z glykolurilu jsou však cucurbit[*n*]urily (I)<sup>1</sup>. Jedná se o makrocyclické molekuly, ve kterých je *n* glykolurilových jednotek propojeno 2*n* methylenovými můstky. Cucurbit[*n*]urily tvoří stabilní komplexy s organickými kationty, jako jsou amoniové a pyridiniové soli. Je zkoumáno jejich použití v řadě oborů zahrnujících čištění odpadních vod, dopravování léčiv, katalýzu, chromatografii či nanotechnologie. Hlavní limity použití cucurbit[*n*]urilů jsou: (i) nerozpustnost v organických rozpouštědlech a nízká rozpustnost ve vodě; (ii) obtížná modifikace struktury makrocycklů.

V jednom z našich projektů se proto zabýváme kontrolovanou přípravou glykolurilových oligomerů (II) a jejich transformací do makrocyclické struktury. Tento postup nám umožní zavést funkční skupiny na povrch makrocycklů a zároveň zvýšit jejich rozpustnost. V přednášce bude prezentována selektivní příprava glykolurilových dimerů<sup>2</sup> a trimerů<sup>3</sup>. Budou také diskutovány jejich schopnosti chovat se jako supramolekulární hostitelské molekuly a tvořit komplexy s organickými kationty v roztoku i v pevném stavu.



Dalším tématem naší výzkumné skupiny je příprava nových makrocyclických molekul vycházejících z glykolurilu. Druhá část přednášky bude proto věnována prezentaci zcela nové sloučeniny - bambus[6]urilu (III)<sup>4</sup>, kterou jsme v nedávné době připravili. Tato sloučenina je unikátní nejen svou strukturou významně se lišící od cucurbit[*n*]urilů, ale také svými vlastnostmi. Chová se totiž jako receptor aniontů, které

váže s vysokou afinitou a selektivitou. Široký aplikační potenciál této sloučeniny bude také diskutován.

Tato práce vznikla za podpory GAČR (grant P207/10/0695) a Evropské unie (CETOCOEN, CZ.1.05/2.1.00/01.0001; spravovaný MŠMT ČR).

## LITERATURA

1. Lagona J., Mukhopadhyay P., Chakrabarti S., Isaacs L.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 4844 (2005).
2. Stancl M., Necas M., Taraba J., Sindelar V.: *J. Org. Chem.* 73, 4671 (2008).
3. Stancl M., Hodan M., Sindelar V.: *Org. Lett.* 11, 4184 (2009).
4. Svec J., Necas M., Sindelar V.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 2378 (2010).

### CROSS-METATHESE ALLYL-KARBORANŮ S ALLYL- $\beta$ -CYKLODEXTRINŮ

IVAN ŠNAJDR<sup>a</sup>, ZBYNĚK JANOUŠEK<sup>b</sup>,  
JINDŘICH JINDŘICH<sup>a</sup>, MARTIN KOTORA<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav anorganické chemie AV ČR, v.v.i., Husinec-Řež 1001, 250 68 Řež; <sup>c</sup>ÚOCHB AV ČR, v.v.i., 166 10 Praha 6 snaji0aa@natur.cuni.cz, kotora@natur.cuni.cz

Cyklodextriny jsou látky přírodního původu široce používané ve farmaceutickém průmyslu například jako solubilizátory pro lipofilní látky, stabilizátory pro fotosenzitivní léčiva a také jako nosiče pro řízené uvolňování léčiv<sup>1</sup>. Karborany jsou sloučeniny obsahující velké množství atomů boru, a proto jsou používány jako nosiče atomu <sup>10</sup>B při protinádorové terapii (borová neutronová záchyťová terapie, BNCT)<sup>2</sup>. Náš cílem je spojení těchto dvou sloučenin pomocí cross-metateze alkenů<sup>3</sup> katalyzované karbenovými komplexy ruthenia (Schéma 1).

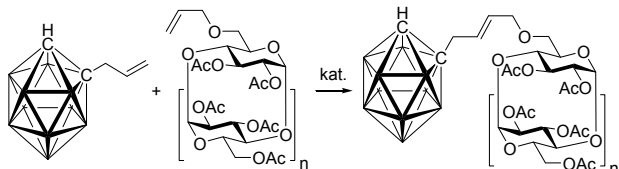


Schéma 1.

Jako modelové látky byly použity různé druhy per-Ac-monoallyl- $\beta$ -cyklodextrinů a různé allyl-karborany. Jako katalyzátor se osvědčil Hoveyda-Grubbsův katalyzátor druhé generace. Reakce probíhaly s uspojitými výtežky.

Tato práce vznikla za podpory Centra pro nová antivirotika a antineoplastika MŠMT (projekt č. 1M0508) a grantové agentury AVČR (projekt č. IAA 400 550 609).

## LITERATURA

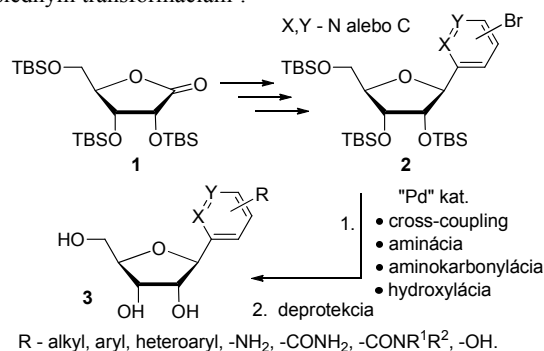
1. Hirayama F., Usami M., Komara K., Uekama K.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 5, 23 (1997).
2. Hawthorne M. F., Madema A.: *Chem. Rev.* 99, 3421 (1999).
3. Chatterjee, A. K., Choi, T.-L., Sanders, D. P., Grubbs, R. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 11360 (2003).

### MODULÁRNA SYNTÉZA FENYL- A PYRIDÍN-C-RIBONULKEOZIDŮV

MARTIN ŠTEFKO, MICHAL HOCEK\*

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Gilead Sciences & UOCHB Výzkumné Centrum, 166 10 Praha 6 stefko@uochb.cas.cz, hocek@uochb.cas.cz

C-nukleozidy představují potenciálně zajímavou skupinu látek charakterizovanou nahrazením labilní C-N vazby, chemicky a enzymaticky stabilnější C-C vazbou. Súčasně syntetické přístupy sa vo väčšine prípadov vyznačujú nedostatočnou anomerickou selektivitou, nízkymi výťažkami a nutnosťou optimalizovať syntézu každého nového C-nukleozidu<sup>1</sup>. Z uvedených dôvodov sa v súčasnej dobe zaoberáme vývojom modulárnej syntézy, založenej na príprave multigramového množstva univerzálneho intermediátu a jeho následným transformáciam<sup>2</sup>.



Adícia príslušne lítiovaného brómfenylu alebo brómpyridínu na TBS-chránený ribonolaktón **1** a následná redukcia vzniknutého hemiketálu poskytne 1- $\beta$ -brómfenyl- alebo 1- $\beta$ -brómpyridín-C-ribonukleozidy **2**. Tieto boli pomocou paládiom katalyzovaných aminácií, hydroxylácií, aminokarbonylácií a cross-coupling reakcií a následným štiepením chrániacich funkčných skupín prevedené na sériu voľných 1- $\beta$ -(alkyl-, aryl-, amino-, hydroxyl-, karbamoyl- a heteroarylfenyl<sup>2c,2d</sup> alebo -pyridín<sup>2e</sup>)-C-ribonukleozidov **3**.

Táto práca je súčasťou výskumného projektu Z4 055 905, podporovaná centrom pre biomolekuly a komplexné molekulárne systémy (LC 512), Grantovou agentúrou AVCR (IAA400550902) a Gilead science, Inc. (Foster City, CA).

## LITERATÚRA

1. Štambaský J., Hocek M., Kočovský P.: *Chem. Rev.* 109, 6729 (2009).

2. (a) Urban M., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: *J. Org. Chem.* 71, 7322 (2006); (b) Joubert N., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: *J. Org. Chem.* 72, 6797 (2007); (c) Štefko M., Pohl R., Klepetářová B., Hocek M.: *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 1689. (d) Štefko M., Pohl R., Hocek M.: *Tetrahedron* 65, 4471 (2009); (e) Štefko M., Slavětinská L., Klepetářová B., Hocek M.: *J. Org. Chem.* 75, 442 (2010).

### DIELSOVA-ALDEROVA REAKCE CHIRÁLNÍCH NITROAKRYLÁTŮ S 1-ALKOXYDIENY

**ONDŘEJ ŠTĚPÁNEK<sup>a,b</sup>, MARTIN DRAČÍNSKÝ<sup>b</sup>, BARBARA EIGNEROVÁ<sup>a,b</sup>, MARTIN KOTORA<sup>a,b,\*</sup>**

<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6 dravec@mail.com, kotora@natur.cuni.cz

Dielsova-Alderova reakce nitropropenoátů s dieny představuje jeden z přístupů k syntéze regioselektivně substituovaných cyklohexenů. Kupodivu enantioselektivní varianta této reakce, která otevírá cestu k asymetricky substituovaným cyklohexenům, zůstává i dnes spíše neprobádanou oblastí. Vzhledem k množství sloučenin, strukturně odvozených od chirálních cyklohexenů (např. Tamiflu<sup>1</sup>, karbaanalogy sacharidů atd.) je tato metoda synteticky velmi zajímavá.

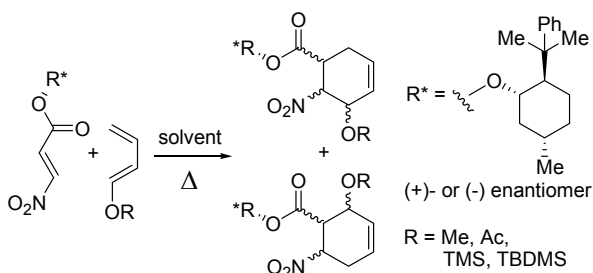


Schéma 1

Zaměřili jsme se na asymetrickou Dielsovu-Alderovu reakci nitroakrylátu, nesoucího pomocnou chirální skupinu, s 1-alkoxydiény. Přestože je možný vznik celkem až osmi stereoisomerů při takovémto typu reakce (Schéma 1), je vzhledem k strukturním rysům obou reaktantů (sterickým a elektronickým) preferován vznik pouze dvou z nich<sup>2</sup>. Dále bude diskutován vliv reakčních podmínek na poměr stereoisomerních produktů a asymetrickou indukci.

Tato práce vznikla za podpory grantu MSM0021620857, Z40550506 a SVV 261205/2010.

#### LITERATURA

1. Farina V.; Brown J. D.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 7330 (2006).

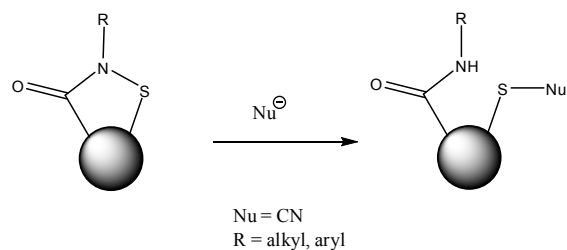
2. Kakushima M.; Scott D. J.: *Can. J. Chem.* 57, 1399 (1979).

### FUNCTIONAL POLYMERS. PREPARATION AND REACTIVITY

**IVA ŠTIBINGEROVÁ<sup>a</sup>, ADAM HENKE<sup>a</sup>, ALI EVREN OZCAM<sup>b</sup> a JIRÍ ŠROGL<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, ASCR, 166 10 Prague 6, <sup>b</sup>North Carolina State University, Dept Chem. & Biomol. Eng, 911 Partners Way, Campus Box 7905, Raleigh, NC 27695-7905 jsrogl@uochb.cas.cz

The ability of benzoisothiazolones to remove ions from water has been research topic of our group. After experimental proving the effect we focused on chemistry of sulfur containing units immobilized on the polymer matrix. Poly (*N,N'*-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) (PDMAEMA) is suitable for these experiments due to its ability to form polycationic species. PDMAEMA was synthesized via free radical polymerization. Quaternary PDMAEMA salt was obtained by the reaction of tertiary amine group with benzoisothiazolone agent, which is able to scavenge cyanide ions from water.



Scheme 1.

This work was supported by the Czech Academy of Sciences (M200550908).

#### REFERENCE

1. Wagner E. S., Davis E.D.: *J. Am. Chem. Soc.* 88, 7 (1966).

### PHYTOSTEROLS: UNITS FOR THE SYNTHESIS OF SUPRAMOLECULES

**JANA ŠUSTEKOVÁ<sup>a,b</sup>, ZDENĚK WIMMER<sup>a</sup>, PAVEL DRAŠAR<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Institute of Experimental Botany AS CR, Isotope Laboratory, Videňská 1083, 142 20 Praha 4; <sup>b</sup>Institute of Chemical Technology, Technická 5, 160 28, Praha 6 wimmer@biomed.cas.cz; Jana.Sustekova@vscht.cz

In my work I have dealt with the synthesis of phytosterol conjugates with substances that contain nitrogen in their molecules. The physico-chemical properties of the prepared conjugates were subsequently studied. Stigmasterol was chosen for its commercial availability as a representative of phytosterols. To prepare synthetic intermediates, hemiesters of stigmasterol, anhydrides of selected short dicarboxylic acid were employed as convenient reagents. Reactions were conducted in pyridine and were catalyzed by DMAP (obtained yields of the products up to 93 %). Prepared hemiesters reacted with both respective enantiomerically pure forms of phenylalanine methyl ester. The incurred bond in the prepared conjugates was the amide bond. Dichloromethane was used as solvent and DMAP and DCC were employed as catalysts (obtained yields of the products more than 90 %)<sup>1</sup>.

Another possibility to design conjugates of phytosterols with nitrogen containing compounds is to use  $\omega$ -haloesters. In such a case, the target conjugate does not bear any ester functionality. This arrangement is favorable for subsequent easy reduction of the amide bond in the conjugate into the secondary amine, which functionality may be important for potential pharmacological effect of the target compound.

The physico-chemical properties of the prepared conjugates of stigmasterol with methyl esters of selected amino acids have been studied by measuring the UV spectra in acetonitrile / water or ethanol / water. The concentration of both solvents ranged from 100 % to 100 % acetonitrile / water and ethanol from 100 % to 100 % water. The compounds proved their potential for self-assembly. Changes in the position and intensity of the UV maxima were observed. Even two of the prepared compounds proved their potential in forming gels.

*A financial support through the project 2B06024 (SUPRAFYT) from the Ministry of Education of the Czech Republic is gratefully acknowledged.*

#### REFERENCE

- Šusteková J.: *Bakalářská práce*, VŠCHT v Praze (2009).

#### SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE BAMBUS[6]JURILU

**JAN ŠVEC, VLADIMÍR ŠINDELÁŘ**

*Ústav chemie, Masarykova Univerzita, Kamenice 5,  
625 00 Brno  
sindelar@chemi.muni.cz*

Bambus[6]juril se skládá ze šesti glykolurilových jednotek, které jsou vzájemně propojeny řadou methylenových můstků<sup>1</sup>. Glykolurilové jednotky zaujímají alternující konformaci. Vzniklý makrocyklus má tvar trubičky, kterou lze připodobnit k části bambusového stvolu, odtud vznikl název bambus[6]juril.

Bambus[6]juril jsme připravili reakcí 2,4-dimethylglykolurilu s formaldehydem v 5,4 M-HCl při laboratorní teplotě. Chloridový aniont slouží při makrocyclické reakci jako templát. Po izolaci makrocyklu zůstává aniont uvnitř

makrocyklu a vzniká tak vysoce stabilní 1:1 komplex. Komplex bambus[6]jurilu s interně vázaným chloridovým aniontem (nebo s řadou dalších aniontů) je dobře rozpustný ve vybraných rozpouštědlech a je v nich stabilní. Naopak prázdný bambus[6]juril, připravený z komplexu vyvázáním aniontu, se nerozpouští v žádném ze studovaných rozpouštědel. Bambus[6]juril se rozpustí až po přidání aniontu do roztoku. Tyto vlastnosti jsme využili pro stanovení asociačních konstant mezi bambus[6]jurilem a vybranými anionty.

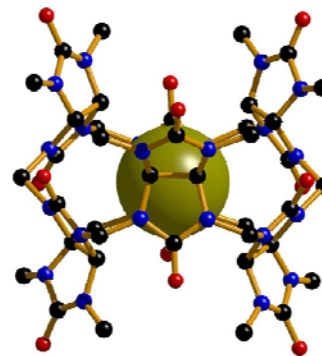


Schéma 1. Bambusuril s interně vázaným Br<sup>-</sup>

*Tato práce vznikla za podpory GAČR (grant P207/10/0695) a Evropské unie (CETOCOEN, CZ.1.05/2.1.00/01.0001; spravovaný MŠMT ČR).*

#### LITERATURA

- Svec J., Necas M., Sindelar V.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 2378 (2010).

#### FOSFINO FERROCENOVÉ AMIDY ODVOZENÉ OD AMINOKYSELIN: SYNTÉZA A POUŽITÍ V ENANTIOSELEKTIVNÍ KONJUGOVANÉ ADICI

**JIŘÍ TAUCHMAN, IVANA CÍSAŘOVÁ,  
PETR ŠTĚPNIČKA\***

*Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta  
Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2  
stepnic@natur.cuni.cz*

Organokovové sloučeniny se staly nedílnou součástí moderní organické syntézy. Téměř žádná totální syntéza se dnes neobejde bez kroku zahrnujícího nukleofilní organokovové činidlo. Mědi katalyzovaná konjugovaná adice organokovových sloučenin (organozinečnatých nebo Grignardových) na  $\alpha,\beta$ -nenasycené karbonylové sloučeniny<sup>1,2</sup> dnes patří mezi nejrozšířenější syntetické metody pro tvorbu C–C vazby. Použití chirálního komplexu mědi umožňuje provést katalytickou enantioselektivní verzi této reakce.

Nové chirální fosfinoferrocenové amidy nesoucí aminokyselinové pendantní skupiny prezentované v této práci<sup>3</sup> (schéma 1) navazují na předchozí úspěšné využití podobných ligandů v katalýze a koordinační chemii<sup>4</sup>. Porovnání strukturních a katalytických vlastností takových hybridních

ligandů umožňují zhodnotit vliv jednotlivých molekulárních částí na průběh katalytických reakcí.

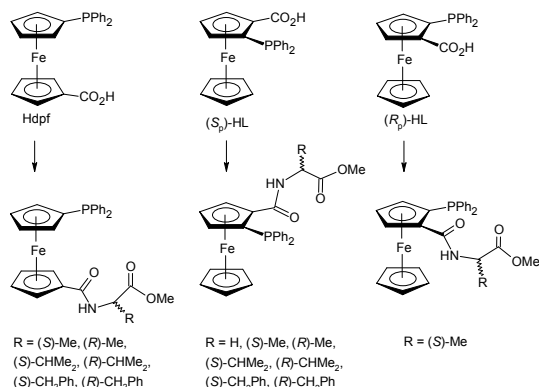


Schéma 1

Práce vznikla za podpory Grantové agentury UK (projekt č. 58009) a MŠMT (projekt LC06070).

#### LITERATURA

- Harutyunyan S. R., den Hartog T., Geurts K., Minnaard A. J., Feringa B. L.: *Chem. Rev.* 108, 2824 (2008).
- Jerphagnon T., Pizzuti M. G., Minnaard A. J., Feringa B. L.: *Chem. Soc. Rev.* 38, 1039 (2009).
- Tauchman J., Císařová I., Štěpnička P.: *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 4276.
- (a) Lamač M., Tauchman J., Císařová I., Štěpnička P.: *Organometallics* 26, 5042 (2007); (b) Lamač M., Císařová I., Štěpnička P.: *New J. Chem.* 33, 1549 (2009); (c) Tauchman J., Císařová I., Štěpnička P.: *Organometallics* 28, 3288 (2009).

### HALOMETALACE ALKYNŮ: NEPOSTRADATELNÝ NÁSTROJ PŘI STEREOSELEKTIVNÍCH SYNTÉZÁCH ALKENŮ

#### TOMÁŠ TOBRMAN

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

Substituované alkeny, zejména pak tri- *I* nebo tetrasubstituované, představují zajímavý strukturální motiv, který lze najít v celé řadě přírodních látek, např. tamoxifen, ratjadon, mycolacton A atd. Dále nacházejí uplatnění jako výchozí látky např. pro hydrogenace, epoxidace a celé řady dalších procesů, nebo materiály vykazující zajímavé fyzikálně-elektronické vlastnosti.

Není proto překvapující, že značná pozornost chemické veřejnosti je věnována stereoselektivním syntézám zejména trisubstituovaných alkenů<sup>1</sup>. V zásadě lze využít několik postupů pro jejich přípravu (Schéma 1). Snad nejznámější variantou je Wittigova, respektive Horner-Wadsworth-Emmons reakce. Nevýhodou této reakce je v některých

případech nízká selektivita<sup>2</sup>. Teprve s rozvojem chemie přechodných kovů byl zaznamenán bouřlivý vývoj v syntéze trisubstituovaných alkenů. Například karbometalace alkyňů, regioselektivní „cross-coupling“ reakce 1,1-dihalogenalkenů nebo cross-metathesa alkenů a jiné umožnily snadný přístup k celé řadě trisubstituovaných alkenů s různorodým stupněm stereoselektivity. Další metodiku představuje reakce terminálních alkyňů s haloborany (haloborace), která byla poprvé publikována<sup>3</sup> v roce 1964. Obdobně jako hydroborace, haloborace alkyňů probíhá stereoselektivně jako *syn*-adice. Vzniklé intermediáty **2** lze následně v kombinaci především s Pd-katalyzovanými „cross-coupling“ reakcemi převést na pestrou škálu (*Z*)- nebo (*E*)-trisubstituovaných alkenů.

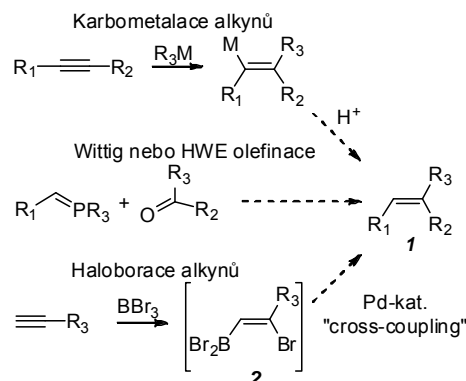


Schéma 1. Vybrané přístupy pro syntézu trisubstituovaných alkenů

Přednáška uvede přehled současného stavu problematiky syntézy trisubstituovaných alkenů včetně vlastních výsledků na poli haloborace a její aplikace v syntézách přírodních látek.

Tato práce vznikla za podpory grantu MSM 6046137301.

#### LITERATURA

- (a) Reiser O.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 2838 (2006); (b) Negishi E.-i., Huang Z., Wang G., Mohan S., Wang C., Hattori H.: *Acc. Chem. Res.* 41, 1474 (2008).
- Marzanoff B. E., Reitz A. B.: *Chem. Rev.* 89, 863 (1989).
- Lappert M. F., Prokai B.: *J. Organomet. Chem.* 1, 384 (1964).

### PREDIKCE CHIROPTICKÝCH A SPEKTRÁLNÍCH VLASTNOSTÍ MONOSACHARIDŮ

IVAN RAICH<sup>\*a</sup>, KATEŘINA TOMČÁKOVÁ<sup>a</sup>, JAKUB KAMINSKÝ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
Ivan.Raich@vscht.cz.

Práce se zabývá *ab initio*/DFT výpočty optických otáčivostí, ORD, IČ a NMR spekter na řadě jednoduchých, různě flexibilních monosacharidů.

Ve všech případech se zaměřuje na lepší reprezentaci rozpouštědla, ať už vylepšený CPCM implicitní solvatační model v Gaussianu 09, nebo kombinovaný QM/MM model s explicitními molekulami rozpouštědla, vycházející z MD simulací.

V případě optických otáčivostí a ORD se znovu zaměřuje<sup>1</sup> na vliv úrovně metody, vibračních příspěvků a vlnové délky. Zvýšená pozornost byla věnována přesnějšímu zjištění zastoupených konformerů. U IČ spekter se zabývá detailním kvalitativním a kvantitativním porovnáním vypočtených a experimentálních dat a tvorbě intramolekulárních vodíkových vazeb. V případě NMR spekter byly vyzkoušeny některé nové funkcionály a báze.

Bylo zjištěno, že rozpouštědlo hraje při výpočtech optické otáčivosti podstatnou roli a musí být zahrnuto jak ve stadiu geometrických optimalizací, tak ve vlastních výpočtech otáčivostí. Nepodařilo se však prokázat, že se rozpouštědlo kolem studovaných látek specificky strukturuje a ovlivňuje výslednou optickou otáčivost.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR MSM6046137305 a GA AV IAA400550702.*

#### LITERATURA

1. Kaminský J., Raich I., Tomčáková K., Bouř P.: *J. Comput. Chem.* 31, 2213 (2010).

### NOVÉ TYPY LOMENÝCH KAPALNÝCH KRYSTALŮ NA BÁZI KYSELINY 3-HYDROXYSKOŘICOVÉ

**JIŘÍ TŮMA<sup>a</sup>, MICHAL KOHOUT<sup>a</sup>, VÁCLAV KOZMÍK<sup>a</sup>, JIŘÍ SVOBODA<sup>a</sup>, VLADIMÍRA NOVOTNÁ<sup>b</sup>, MILADA GLOGAROVÁ<sup>b</sup>, DAMIAN POCIECHA<sup>c</sup>**

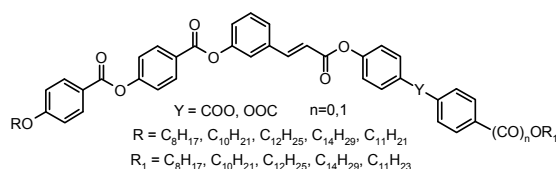
<sup>a</sup>Ústav organické chemie, VŠCHT Praha, 166 28 Praha 6;

<sup>b</sup>Fyzikální ústav AVČR, 182 21 Praha 8; <sup>c</sup>Chemistry department, Warsaw University, Al. Zwirky i Wigury 101, 02-089 Warsaw, Poland  
tumaa@vscht.cz

Kapalné krystaly jsou materiály nacházející uplatnění v mnoha oborech lidské činnosti, například v zobrazovací technice či jako součást fotovodičů a elektrických senzorů. V posledních letech jsou předmětem pozorování především lomené materiály s aromatickými jádry substituovanými v polohách 1 a 3, které jeví unikátní mezomorfni chování.

V našich předchozích studiích jsme se zaměřovali na látky odvozené od 3-hydroxybenzoové a 7-hydroxynaftalen-2-karboxylové kyseliny. Nyní prezentujeme sérii nových materiálů s jádrem obsahujícím vinylovou spojku – kyselinu 3-hydroxyskořicovou (*I*).

V práci jsme se zaměřili na studium změny mezomorfniho chování s ohledem na délku terminálního alkylu, změny orientace esterové spojky *Y* a zavedení páté esterové spojky namísto etherové.



*I*

Vlastnosti připravených materiálů byly studovány optickou polarizační mikroskopií, diferenční skenovací kalorimetrií a rentgenostrukturní analýzou.

*Tato práce byla podporována granty GAČR (grant č. 202/09/0047), GAAV (grant č. IAA100100911), MŠMT (projekt č. MSM6046137301) a ERDF (project No: WKP 1/1.4.3./1/2004/72/72/165/2005/U).*

#### LITERATURA

1. Reddy R. A., Tschierske C.: *J. Mater. Chem.* 16, 907 (2006).
2. Kohout M., Svoboda J., Novotná V., Pocięcha D., Glogarová M., Gorecka E.: *J. Mater. Chem.* 19, 3153 (2009).
3. Kohout M., Svoboda J., Novotná V., Glogarová M., Baumeister U., Pocięcha D.: *Liq. Cryst.* 37, 987 (2010).

### KOVALENTNÁ FUNKCIONALIZÁCIA POVRCHU NANODIAMANTOV

**MONIKA TVRDOŇOVÁ, PETR CÍGLER, MIROSLAV LEDVINA**

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
tvrdonova@gmail.com

Nanodiamanty (ND) predstavujú veľmi zaujímavý syntetický materiál, z dôvodu ich potenciálnych biologických aplikácií. Kovalentná funkcionalizácia povrchu nanodiamantov organickými molekulami zlepšuje ich biokompaktibilitu, zvyšuje ich rozpustnosť v rôznych rozpúšťadlách a zabraňuje aglomerácii<sup>1</sup>.

Povrch komerčne dostupných nanodiamantov je pokrytý amorfným a grafitickým uhlíkom, ktorý je možné odstrániť oxidáciou ND vzduchom<sup>2</sup> pri 425 °C. Povrch takto spracovaných nanodiamantov obsahuje rôzne funkčné skupiny obsahujúce kyslík (-OH, =CO, -COOH, -CO-O-CO-, laktóny), ktoré sme monofunkcionalizovali dvoma spôsobmi (Schéma 1). Prvým je hydroxylácia povrchu pomocou Fentonovej reakcie (FeSO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)<sup>3</sup>. Vzniknuté hydroxylové skupiny sme následne modifikovali reakciou s rôznymi trietoxysilánmi. Druhým spôsobom je oxidácia ND silnými minerálnymi kyselinami (HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)<sup>4</sup>. Reakciou ND, obsahujúcich prevažne karboxylové skupiny, s amínmi sme pripravili povrch pokrytý rozlične dlhými hydrofilnými reťazcami.



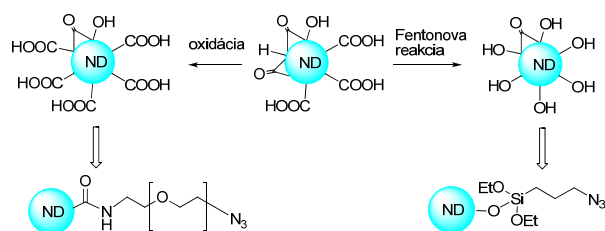


Schéma 1

Povrchovými modifikáciami sme pripravili nanodiamanty so zvýšenou hydrofilitou, obsahujúce koncovú azido skupinu, ktorú je možné ďalej funkcionalizovať pomocou klik-chemie.

Tato práca vznikla za podpory grantov GAAS ČR KAN 200100801 a 7FP DINAMO 245122.

#### LITERATÚRA

- Holt K. B.: Philos. Trans. R. Soc., A 365, 2845 (2007).
- Osswald S., Yushin G., Mochalin V., Kucheyev S. O., Gogotsi Y.: J. Am. Chem. Soc. 128, 11 635 (2006).
- Martín R., Álvaro M., Herance J. R., García H.: ACS Nano 4, 65 (2010).
- Chi-Cheng F., Hsu-Yang L., Kowa Ch., Tsong-Shin L., Hsiao-Yun W., Po-Keng L., Pei-Kuen W., Pei-Hsi T., Huan-Cheng Ch., Fann W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 727 (2007).

#### ANALÝZA SILIC ČELEDI *Ranunculaceae*, ZÍSKANÝCH ZE SEMEN DRUHŮ *Delphinium consolida*, *D. elatum*, *Nigella arvensis*, *N. hispanica* A *N. nigellastrum*

IRENA VALTEROVÁ<sup>a</sup>, KLÁRA URBANOVÁ<sup>a</sup>, LENKA NEDOROSTOVÁ<sup>b</sup>, LADISLAV KOKOŠKA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organickej chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>Česká zemědělská universita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 - Suchbát

Silice (esenciální či éterické oleje) jsou směsí těkavých látek obsažených v rostlinách. Čeleď *Ranunculaceae* zahrnuje 50 až 60 rodů a okolo 2500 druhů jednoletých až po vytrvalé rostliny, rozšířených po celém světě, zejména pak v severním mírném pásu. Některé druhy čeledi *Ranunculaceae* jsou pěstovány jako okrasné, jiné jsou známé svými léčivými účinky. Z chemického hlediska tyto druhy obsahují především alkaloidy a glykosidy, mnoho z nich je jedovatých.

V taxonomické literatuře je tato čeleď popisována jako taxon neobsahující silice<sup>1</sup>, přestože existují práce o jejich výskytu v rodu *Nigella*<sup>2-5</sup>. Cílem práce bylo ověření přítomnosti a složení silic v semenech vybraných druhů čeledi *Ranunculaceae* (*Delphinium consolida*, *D. elatum*, *Nigella arvensis*, *N. hispanica* a *N. nigellastrum*). Silice, získané hydrodestilací semen těchto rostlin, byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (GC/MS).

Bylo zjištěno, že hlavní součástí silice *N. nigellastrum* jsou monoterpeny, zejména  $\alpha$ -pinen (43 %) a  $\beta$ -pinen (46 %). Oba pineny byly přítomny ve vysoké enantiomerní čistotě: (-)- $\alpha$ -pinen, 90 % ee a (-)- $\beta$ -pinen, 96 % ee. Stejně tak silice druhu *N. arvensis* obsahovala značné množství monoterpenů ( $\alpha$ -pinen, 6 %, a  $\beta$ -pinen, 21 %), jejich enantiomerní čistota však byla nižší. Analýzou silice druhu *N. hispanica* nebyly zjištěny žádné terpenické látky, hlavní složkou byly mastné kyseliny (84 %) a jejich estery (4 %). Podobné složení měla i silice dvou druhů rodu *Delphinium* s převahou mastných kyselin (89 % v *D. elatum* a 87% v *D. consolida*).

Tato práce vznikla za podpory GAČR (#525/08/1179).

#### LITERATURA

- Watson L., Dallwitz M. J.: *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval* Canberra 1992; <http://delta-intkey.com/angio/> (staženo 21. 9. 2010).
- Moretti A., D'Antuono L. F., Elementi S.: J. Essent. Oil Res. 16, 182 (2004).
- Fico G., Bader A., Flamini G., Cioni P. L., Morelli L.: J. Essent. Oil Res. 15, 57 (2003).
- Kokoška L., Havlík J., Valterová I., Nepovím A., Rada V., Vaněk T.: Flavour Frag. J. 20, 419 (2005).
- Havlík J., Kokoška L., Vašíčková, S., Valterová I.: Flavour Frag. J. 21, 713 (2006).

#### VLIV INTRAMOLEKULÁRNÍHO PŘENOSU NÁBOJE NA FLUORESCENCI FTALOCYANINŮ A AZAFTALOCYANINŮ

LENKA VÁCHOVÁ, PETR ZIMČÍK, VERONIKA NOVÁKOVÁ, KAMIL KOPECKÝ

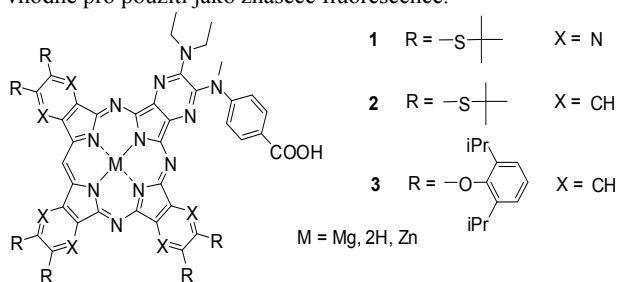
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové [lenka.vachova@faf.cuni.cz](mailto:lenka.vachova@faf.cuni.cz)

Ftalocyaniny (Pc) a jejich aza- analogy (AzaPc) jsou pro své výhodné fotofyzikální vlastnosti již řadu let zkoumány na našem pracovišti. Bylo potvrzeno, že u derivátů AzaPc s periferními *N,N*-diethylaminoskupinami dochází vlivem intramolekulárního přenosu náboje (ICT) z excitovaného stavu S1 ke snížení celkové fluorescence na minimum<sup>1</sup>. Z tohoto důvodu lze tyto látky využít pro zhašení fluorescence na oligonukleotidových sondách používaných v moderní biochemii a molekulární genetice<sup>2</sup>.

Naše pozornost se obrátila k derivátům Pc, u nichž dosud ICT popsán nebyl. Byly syntetizovány deriváty Pc a AzaPc nesoucí terminální karboxylovou skupinou potenciálně vhodnou k vazbě na oligonukleotid a dva periferní donorové atomy dusíku zodpovědné za vlastní zhašení fluorescence. Zbylé periferní substituenty jsou vázány k makrocyklu přes síru (*tert*-butylsulfanylová skupina, **1** a **2**) resp. kyslík (2,6-diisopropylfenoxylová skupina, **3**). Z naměřených kvantových výtěžků fluorescence bylo zjištěno, že ICT probíhá efektivněji u AzaPc derivátů **1** (fluorescence poklesla až 80krát), naproti



tomu u Pc **2** a **3** se snížila pouze 2-3krát. Důvodem může být vliv pyrazinových dusíků v makrocyclickém jádře na ICT. Z tohoto důvodu se zdají být připravené Pc deriváty nepřilíhší vhodně pro použití jako zhašeče fluorescence.



Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK 68110/B-CH/2010 a SVV-2010-261-001.

#### LITERATURA

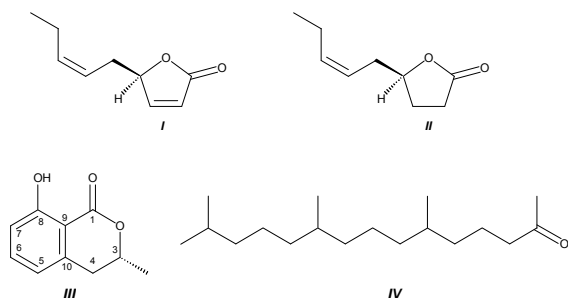
- Novakova V., Zimcik P., Miletin M., Vachova L., Kopecky K., Lang K., Chabera P., Polivka T.: Phys. Chem. Chem. Phys. 12, 2555 (2010).
- Kopecky K., Novakova V., Miletin M., Kučera R., Zimcik P.: Bioconjugate Chem., v tisku.

### ROLE CHEMICKÉ A AKUSTICKÉ KOMUNIKACE V NÁMLUVÁCH ZAVÍJEČE CIZOPASNÉHO, *Aphomia sociella*

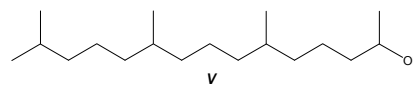
IRENA VALTEROVÁ<sup>a</sup>, BLANKA KALINOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ KINDL<sup>a</sup>, PAVEL JIROŠ<sup>a,b</sup>, PETR ŽÁČEK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6  
 irena@uochb.cas.cz

Zavíječ cizopasný, *Aphomia sociella* L., je parazitem čmeláků. Napadá hnízda, larvy se živí dílem, zásobami i plodem hostitele a v krátké době jsou schopny hnízdo zcela zničit. Námluvy začínají voláním sameček, kteří produkují sexuální feromon v křídelních žlázách. Elektroantenograficky aktivními složkami jsou hexan-1-ol, 2-fenylethanol, (*R*)-(*Z,Z*)-nona-2,6-dien-4-olid (*I*), (*S*)-(*Z*)-non-6-en-4-olid (*II*), mellein (*III*, hlavní složka), fyton (*IV*) a dále nerozdělitelná směs C-18 mastných kyselin<sup>1,2</sup>. Absolutní konfigurace chirálních látek byla stanovena enantioselektivní plynovou chromatografií.



Volající sameček rozptyluje feromon intenzivním máváním křídel, což přiláká samicu z velké vzdálenosti. Přiblížení samičky vyvolá u samečka produkci ultrazvuku. Zpěv samečka podnítl víření křídel také u samičky, která tak rozptyluje svůj sexuální feromon a dává najevo receptivitu.



Samičí feromon se skládá ze 3 složek: hexan-1-olu, fytonu (*IV*) a odpovídajícího alkoholu *V*. Z biologických testů vyplývá, že alkohol *V* je hlavním sexuálním atraktantem, zatímco další 2 složky působí synergicky.

Zavíječ cizopasný je tak příkladem užití kombinace akustických a chemických signálů v reprodukčním chování.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR 2B06007.

#### LITERATURA

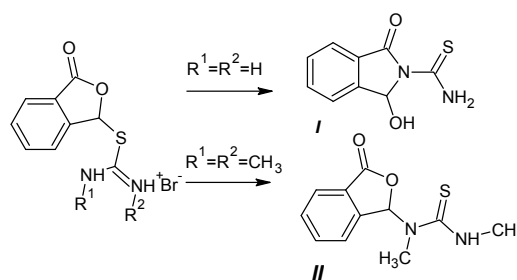
- Kunesch G., Zagatti P., Pouvreau A., Cassini R.: Z. Naturforsch. C: Biosci. 42, 657 (1987).
- Kalinová B., Kindl J., Jiroš P., Žáček P., Vašíčková S., Buděšínský M., Valterová I.: J. Nat. Prod. 72, 8 (2009).

### MECHANISMY UPLATŇUJÍCÍ SE PŘI TRANSFORMACI *S*-FTALID-3-YL ISOTHIURONIOVÝCH SOLÍ

JIŘÍ VÁŇA, JIŘÍ HANUSEK, MILOŠ SEDLÁK

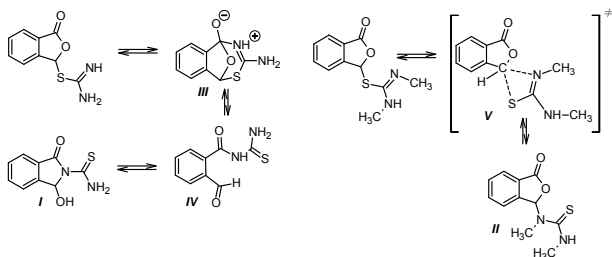
Ústav organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice  
 jiri.vana@student.upce.cz

Produkty transformace *S*-ftalid-3-yl isothiuroniových solí v prostředí vodného amoniaku se liší v závislosti na substituci dusíkových atomů výchozí thiomocoviny. V případě thiomocovin s jednou volnou aminoskupinou je produktem substituovaný isoindol *I*, v případě *N,N*-substituovaných thiomocovin dochází ke vzniku směsi *N*-ftalid-3-yl thiomocovin *II* a produktů rozpadu.



U solí odvozených od nesubstituovaných či mono substituovaných thiomocovin dochází intramolekulárním atakem iminoskupiny<sup>1</sup> ke vzniku tricyklického teraedralního intermediátu *III*, který se následně rozpadá na aldehyd *IV* a ten

opět intramolekulárně cyklizuje na produkt *I*. U soli připravených z *N,N'* disubstituovaných thiomocovin je takováto reakční cesta vyloučena a uplatňují se dvě odlišné reakční cesty. V první, analogické s předchozím případem, dochází k ataku molekuly amoniaku použité jako báze, tvorbě bicyklického tetraedrálního intermediátu, vzniku aldehydu a dále produktu rozpadu. Druhou je intramolekulární *S*→*N* migrace probíhající pravděpodobně přes čtyřčlenný tranzitní stav *V* a vedoucí ke vzniku produktu *II*.



*Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR č. 0002 162 7501 a projektu IGA SGFCHT 02 UPa.*

#### LITERATURA

1. Váňa J., Sedlák M., Hanusek J.: *J. Org. Chem.* 75, 3729 (2010).

### AMONIUM-KARBAMÁTY: VYSOCE ÚČINNÉ AKCELERANTY TRANSDERMÁLNÍ PERMEACE S DUÁLNÍM MECHANISMEM ÚČINKU

MICHAL NOVOTNÝ, JANA KLIMENTOVÁ, ALEXANDR HRABÁLEK, KATEŘINA VÁVROVÁ

*Výzkumné centrum Nová antivirotika a antineoplastika, Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
katerina.vavrova@faf.cuni.cz*

Akceleranty transdermální permeace jsou látky reverzibilně zvyšující přístup léčiva přes kůži<sup>1</sup>. Transkarbam 12 (T12) je velmi aktivní, širokospektrý a biodegradabilní akcelerant s nízkou toxicitou a dermální dráždivostí<sup>2</sup>. V této práci jsme prokázali, že T12 působí duálním mechanismem. První část jeho účinku je spojena se strukturou amonium-karbamátu, což bylo prokázáno jeho pH-dependentním účinkem na permeaci modelových léčiv. Jakmile se tento amonium-karbamát dostane mezi intercelulární lipidové lamely *stratum corneum*, dojde k jeho rozkladu na protonizovaný DDEAC (dodecyl-6-aminoheksanoát) a oxid uhličitý, což bylo prokázáno pomocí termogravimetrické analýzy a infračervené spektroskopie. Tento první krok v účinku T12 má vliv pouze na lipidické cesty prostupu léčiva kůží. Uvolněný DDEAC je také aktivní akcelerant, prodlužuje účinek T12 a především rozšiřuje spektrum jeho účinku o hydrofilní léčiva, která preferují tzv. polární cestu permeace přes kožní bariéru. Tento duální mechanismus účinku je zřejmě zodpovědný za zcela

ojedinelé vlastnosti T12, které z něj činí velmi nadějný akcelerant pro klinické použití.

*Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (Výzkumné centrum Nová antivirotika a antineoplastika IM0508 a Výzkumný záměr MSM0021620822).*

#### LITERATURA

1. Vávrová K., Zbytovská J., Hrabálek A.: *Curr. Med. Chem.* 12, 2273 (2005).
2. Hrabálek A., Doležal P., Vávrová K., Zbytovská J., Holas T., Klimentová J., Novotný J.: *Pharm. Res.* 23, 912 (2006).

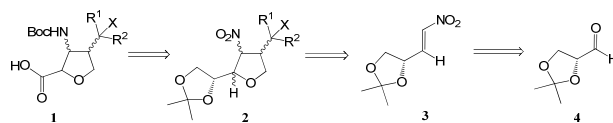
### SYNTHESIS OF TETRAHYDROFUR-DERIVED $\beta$ -AMINO ACIDS VIA A TANDEM MICHAEL ADDITION/OXIDATIVE CYCLIZATION

AUDE VIBERT\*, ULLRICH JAHN

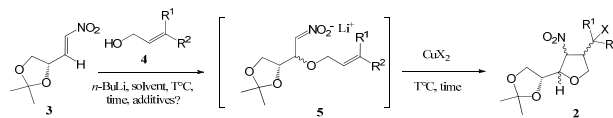
*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS ČR, v.v.i. Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6  
vibert@uochb.cas.cz*

Non-natural amino acids are a very interesting class of molecules. They are much more resistant to enzymatic hydrolysis and when they are incorporated in peptides they modify the secondary and tertiary structures and consequently the biological properties of such peptides and proteins. This work focused on the preparation of 3-nitrotetrahydrofurans as peptide building blocks.

The desired tetrahydrofurans **1** are dissected according to the following retrosynthesis.



Key step of this synthesis is the tandem oxa-Michael addition/oxidative radical 5-*exo* cyclization of the D-glyceraldehyde derived nitroalkene **3** and allylic alcohols **4** mediated by cupric halides<sup>2</sup>.



Further steps towards target amino acids **1** were evaluated.

#### REFERENCES

1. Hübner J., Liebscher J., Pätzelt M.: *Tetrahedron* 58, 10485 (2002).
2. Jahn U., Rudakov D.: *Synlett* 2004, 1207.

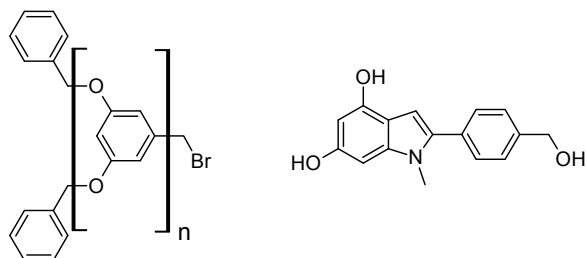
## PŘÍPRAVA DENDRIMERŮ S FLUORESCENTNÍM INDOLOVÝM JÁDREM

PETR VINS<sup>Š\*</sup>a, PAVEL DRAŠAR<sup>a</sup>, FERNANDO COSSÍO<sup>b</sup>

<sup>a</sup>VŠCHT Praha, Technická 5, CZ-16628 Praha 6; <sup>b</sup>UPV/EHU, Avenida de Tolosa 72, ES-20018 San Sebastián petr.vins@vscht.cz

Indoly jsou širokou skupinou heterocyklických sloučenin jevících fluorescence, jejíž charakter je ovlivněn strukturou a funkčními skupinami na indolovém skeletu. V této práci je popsána příprava nového derivátu *N*-methylindolu, strukturou vhodného jako stavební jednotka pro získání dendrimeru s jím tvořeným jádrem a polyaromatickými dendrony Fréchetova typu. Hlavním záměrem této práce je připravit sérii dendrimerů se stejným jádrem a různými „dendritickými větvemi“, lišícími se jejich generačním číslem<sup>1</sup>. Taková sada látek by byla vhodná pro studium fluorescence v závislosti na struktuře a jejich spektrálních vlastnostech.

Fréchetovy dendrony byly připraveny postupem shodným s původní literaturou<sup>2</sup> až do čtvrté generace. Jedná se o disubstituované polyaromatické ethery, nesoucí bromidovou skupinu vhodnou pro další připojení přes ether na indolové jádro. Dendrony této a příbuzné struktury jsou používány jako „anténové systémy“ zachytávající elektrony a lze se domnívat, že indol s nimi konjugovaný bude měnit své fluorescence vlastnosti.



Obr. 1. Připravené dendrony a indolové jádro

První krok přípravy vybraného indolu spočíval v Bichlerově konjugaci<sup>3</sup> derivátů anilinu a bromoacetofenonu a byl následován odstraněním chránících skupin a postupnou redukcí nitrilu na alkohol. Tímto způsobem byl cílový produkt získán, leč s malým výtěžkem v posledním kroku. Momentálně jsou prozkoumávány další metody přípravy této látky.

Tato práce byla finančně podpořena grantem IGA VŠCHT A1 FPBT 2010 00 a grantem MŠMT MSM 6046137305.

### LITERATURA

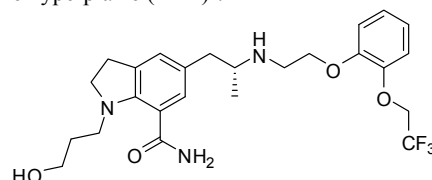
- Zubia A., Cossío F. P., Morao I., Rieumont M., Lopez X.: J. Am. Chem. Soc. 126, 5243 (2004).
- Hawker C. J., Fréchet J. M. J.: J. Am. Chem. Soc. 112, 7638 (1990).
- Vara Y., Aldaba E., Arrieta A., Pizzaro J. L., Arriortua M. I., Cossío F. P.: Org. Biomol. Chem. 6, 1763 (2008).

## NOVÁ SYNTEZA (-)-SILODOSINU

RŮŽENA VLASÁKOVÁ, MARKÉTA SLAVÍKOVÁ, JOSEF HÁJÍČEK

Zentiva, k.s., U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10 Růžena.Vlasáková@zentiva.cz, Markéta.Slavíková@zentiva.cz, Josef.Hajicek@zentiva.cz

Silodosin je vysoce selektivní antagonistou  $\alpha 1$ -adrenoreceptorů potlačující kontrakce močového a zároveň vykazující minimální pokles krevního tlaku. Byl vyvinut japonskou společností Kissei Pharmaceutical pro léčbu benigní prostatické hyperplazie (BPH)<sup>1</sup>.



Původní postupy přípravy (-)-silodosinu řeší chiralitu molekuly v různém stupni syntézy, vždy však štěpením racemátu. Náš přístup využívá k zavedení chiralit do molekuly reduktivní aminaci s opticky čistým (+)-fenylethylaminem. Přítomnost této fenylethylové skupiny je zároveň zárukou, že v dalším stupni při *N*-alkylaci nedochází ke vzniku vedlejšího produktu, vzhledem k sterickému bránění.

### LITERATURA

- Kitazawa M., Ban M., Okazaki K., Ozawa M., Yazaki T., Yamagishi R.: Eur. Pat. Appl. EP 600675 A1 (1994).

## ENANTIOSELEKTIVNÍ ALLYLACE KARBONYLOVÝCH SLOUČENIN KATALYZOVANÁ LEWISOVOU BAZÍ

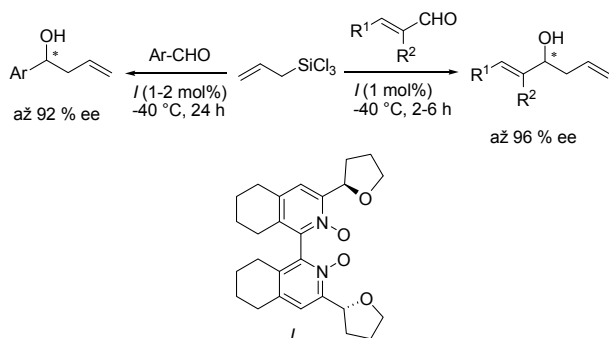
KLÁRA VLAŠANÁ<sup>a</sup>, RADIM HRDINA<sup>a</sup>, MARTIN KOTORA<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Katedra organické a jaderné chemie, PŘF UK v Praze, Hlavova 8, 128 43 Praha 2; <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6 vlasanaklara@seznam.cz, kotora@natur.cuni.cz

Je známo, že chirální bipyridin *N,N'*-dioxidy (Lewisovy zásady) mohou aktivovat různé sloučeniny (Lewisovy kyseliny) a tím zprostředkovat řadu enantioselektivních reakcí jako allylace<sup>1,2</sup>, konjugovaná adice, s vysokou enantioselektivitou.

Chirální bis(tetrahydroisochinoly)-*N,N'*-dioxidy (*R,R*<sub>exo</sub>-*R*)-**I** a (*R,S*<sub>exo</sub>-*R*)-**I** byly testovány jako katalyzátory v enantioselektivních allylacích aromatických a  $\alpha,\beta$ -nenasycených aldehydů allyltrichlorosilanem. Oba diastereoizomery vykazovaly vysokou katalytickou aktivitu a asymetrickou indukci (až 92 % pro aromatické a až 96 % pro  $\alpha,\beta$ -nenasycené

aldehydy). Pro úspěšný průběh reakce byla také klíčová volba rozpouštědla jako reakčního média<sup>3</sup>.



Tato práce vznikla za podpory grantů LC06070 a GAČR 203/08/0360.

#### LITERATURA

- Hrdina R., Dračinský M., Valterová I., Hodačová J., Čisárová I., Kotora M.: *Adv. Synth. Catal.* **350**, 1449 (2008).
- Kadlčíková A., Hrdina R., Valterová I., Kotora M.: *Adv. Synth. Catal.* **351**, 1279 (2009).
- Hrdina R., Opekar F., Roithová J., Kotora M.: *Chem. Commun.* **2009**, 2314.

#### PŘÍPRAVA TRITERPENOIDNÍCH DIMERŮ S CHELATAČNÍMI VLASTNOSTMI.

**MARTIN VLK<sup>a,b</sup>, JAN ŠAREK<sup>b</sup>, TOMÁŠ ELBERT<sup>c</sup>, MARIÁN HAJDÚCH<sup>d</sup>**

<sup>a</sup>Katedra jaderné chemie, FJFI, ČVUT, 115 19 Praha 1;

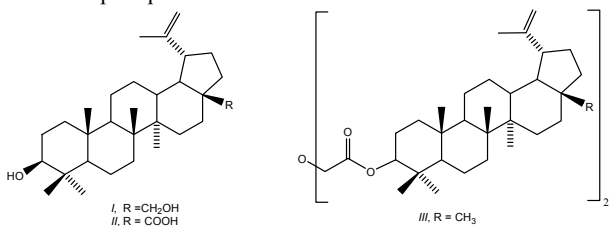
<sup>b</sup>Katedra organické chemie, PřF UP, 772 07 Olomouc;

<sup>c</sup>Laboratoř radioizotopů, ÚOCHB AV ČR, 166 10 Praha 6;

<sup>d</sup>Lab. experiment. medicíny, Dětská a onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc, 775 20 Olomouc

*martin.vlk@fjfi.cvut.cz*

Semisyntetické deriváty pentacyklických triterpenů, zvláště betulinu (*I*) a kyseliny betulinové (*II*), jsou předmětem výzkumu již řadu let. Jejich biologické účinky, speciálně protivirové a cytostatické, jsou velmi dobře známy a studovány v naší skupině po dlouhou dobu<sup>1,2</sup>.



V poslední době je syntetická pozornost mimo jiné upřena na přípravu dimerních triterpenoidních derivátů

spojených typickým můstkem viz *III*. Toto uskupení vykazuje silné chelatační vlastnosti hlavně vůči trans-aktinoidům (III+), což je využíváno v extrakčních procesech při separaci americia<sup>3</sup>. Pro studium komplexace byly syntetizovány prekurzory obecného typu *III*.

Činidla a rozpouštědla byla financována z grantových prostředků: A/CZ 0046/1/0022 of FM EEA NORSKA, GAČR 305/09/1216, MSM 6840770040 a SGS 10/212/OHK4/2T/14.

#### LITERATURA

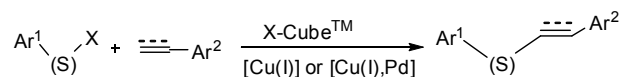
- Dzubak P., Hajduch M., Gazak R., Svobodova A., Psotova J., Walterova D., Sedmera P., Kren V.: *Nat. Prod. Rep.* **23**, 394 (2006).
- Sarek J., Kvasnica M., Vlk M., Biedermann D.: *Semisynthetic Lupane triterpenoids with cytotoxic activity*, v knize *Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer*, kap. 6, s. 349, NovaPublishing, New York 2010.
- Ansari S.A., Pathak P.N., Husain M., Prasad A.K., Parmar V.S., Manchanda V.K.: *Radiochim. Acta* **94**, 307 (2006).

#### FLOW CHEMISTRY: CROSS-COUPLING REACTIONS UNDER NON-BASIC CONDITIONS

**SVATAVA VOLTROVÁ, JIŘÍ ŠROGL\***

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

Cross-coupling reactions leading to a new carbon-carbon and carbon-sulfur bond formation were performed and optimized in continuous-flow mode (ThalesNano X-Cube<sup>®</sup> system setting). Formation of substituted ethylenes (Heck coupling), acetylenes (Sonogashira coupling), or Cu(I) catalyzed arylthiation of terminal acetylenes<sup>1</sup> (C-S coupling) proceeds under mild conditions, without the requirement of base. The scope and limitations of the present chemistry has been investigated.



Scheme 1.

The work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (203/08/1318), and the Czech Academy of Sciences (M200550907).

#### REFERENCE

- Henke A., Šrogl J.: *Chem. Commun. (London)* **46**, 6819 (2010).

## SYNTHESIS OF NEW CUCURBITURIL DERIVATIVES

**MARKÉTA ZAJICOVÁ, JAN BUDKA,  
PAVEL LHOTÁK**

Department of Organic Chemistry, ICT Prague, Technická 5,  
166 28, Praha 6  
zajicovm@vscht.cz

Cucurbiturils are class of macrocyclic compounds based on condensation reaction of glycoluril units with formaldehyde under acidic conditions (Fig. 1). The crucial problem of these molecules is poor solubility in common solvents.

To increase the solubility it is necessary to modify the cucurbituril skeleton. One way is direct functionalization (Fig. 1b) – typically by introducing of hydroxyl groups and subsequent alkylation<sup>1</sup>. Another way can lead via modification of glycoluril unit before condensation with formaldehyde (Fig. 1a).

Cucurbiturils can easily form complexes with amines and can be also used in complexation of drugs (for example the complexation of cisplatin<sup>2</sup>).

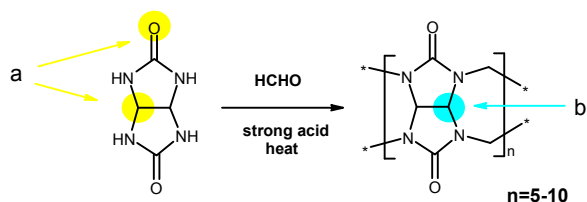


Fig. 1. Synthesis of cucurbituril and possible modification of skeleton before (a) and/or after (b) cyclisation

This research is supported by the Czech Science Foundation (203/09/0691) and by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (IAAX082901).

## REFERENCES

1. Jon S.Y., Selvapalam N., Oh D. H., Kang J.-K., Kim S. Y., Jeon Y. J., Lee J. W., Kim K.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 10186 (2003).
2. Wheate, N. J., Day, A. I., Blanch, R. J., Arnold, A. P., Cullinane, C., Collins, J. G.: *Chem. Commun.* 2004, 1424.

**REACTION OF QUINACRINE WITH PRION PROTEIN: TREATMENT FOR CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE?**

**ZBIGNIEW ZAWADA<sup>a,b</sup>, JAROSLAV ŠEBESTÍK<sup>a</sup>,  
MARTIN ŠAFAŘÍK<sup>a</sup>, ANNA BŘEZINOVÁ<sup>a</sup>, PETR  
BOUR<sup>a</sup>, JAN HLAVÁČEK<sup>a</sup>, IVAN STIBOR<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences CR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6; <sup>b</sup>Institute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6

Prion diseases are most probably caused by a conversion of normal cellular form of prion protein (PrP<sup>C</sup>) to a toxic one (PrP<sup>Sc</sup>)<sup>1</sup>. This transformation can be prevented, at least in vitro, by quinacrine<sup>2</sup>. The acridine moiety of the quinacrine can undergo nucleophilic substitution with primary amines<sup>3</sup> and thiols<sup>4</sup> to afford acridine analogs, what was utilized in our investigation of acridinylation of prion protein free thiol groups.

We studied quinacrine reactivity towards the thiol groups of mouse prion protein. Firstly we prepared a few peptides containing cysteine residue (short fragments of prion protein) on which we were trying the acridinylation reaction. Then we extended the study to acridinylation of both cysteine residues of recombinant mouse prion protein.

To rationalize the reaction conditions, we also modeled acridinylation theoretically on simpler systems, such as *N*-methyl-4-aminopyridine and SH<sup>-</sup> anion. The B3LYP functional with the 6-31+G\*\* basis set provided realistic activation energies. The calculated influence of different acridine substituents on activation energy of acridinylation, as well as the facilitating effect of *N*-protonation on the reaction was consistent with experimental experience.

Comparing a few possible pathways, the most probable multi-step mechanism of the acridinylation reaction was suggested according to calculations of a model reaction of SH<sup>-</sup> anion with *N*-methyl-4-aminopyridine.

Since the quinacrine is potential treatment for the Creutzfeldt-Jakob disease, which is believed to be caused by prion, we suggest that covalent bonding of acridine moiety to the prion protein free thiol groups may be crucial for quinacrine action in the disease treatment. Moreover, the understanding of the acridinylation mechanism might play very important role in the design of new acridine drugs.

This work was supported by the Czech Science Foundation (GA CR) grant no. 203/07/1517 and Research Project Z40550506.

## REFERENCES

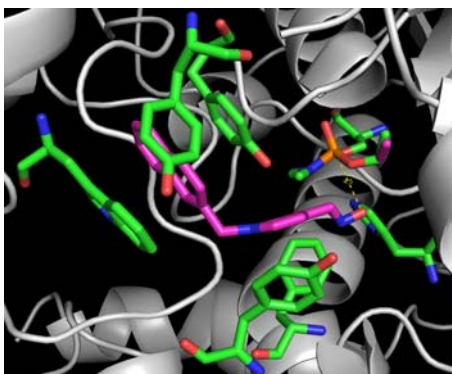
1. Prusiner S. B.: *PNAS* 95, 13363 (1998).
2. Doh-Ura K., Iwaki T., Caughey B.: *J. Virol.* 74, 4894 (2000).
3. Šebestík J., Šafařík M., Stibor I., Hlaváček J.: *Biopolymers* 84, 605 (2006).
4. Wild F., Young J.M.: *J. Chem. Soc.* 1965, 7261.

**PŘÍPRAVA A IN VITRO TESTOVÁNÍ REAKTIVÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERASY S MODIFIKOVANÝM BOČNÍM ŘETĚZCEM**

**FILIP ZEMEK<sup>a</sup>, ANNA HOROVÁ<sup>a</sup>, ONDŘEJ HOLAS<sup>b</sup>,  
JANA ŽDÁROVÁ-KARASOVÁ<sup>a</sup>, KAMIL KUČA<sup>a</sup>,  
KAMIL MUSÍLEK<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>Katedra toxikologie, FVZ, Univerzita obrany Hradec Králové, 500 01 Hradec Králové; <sup>b</sup>Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, FarmF UK, 500 01 Hradec Králové  
kamil.musilek@gmail.com

Organofosforové sloučeniny (OF) byly v minulosti používány pro vojenské účely jako nervově paralytické látky (NPL, např. tabun, sarin, soman, VX), ačkoli byly původně vyvinuty pro zemědělské účely jako pesticidy (např. paraoxon, chlorpyrifos, diazinon)<sup>1</sup>. Mechanismus jejich účinku spočívá v ireverzibilní inhibici enzymu acetylcholinesterasy AChE, EC 3.1.1.7). Léčba OF je založena na podání reaktivátoru AChE oximového typu společně s parasympatolytikem atropinem a antikonvulzivem diazepamem. Mezi nejčastěji používané reaktivátory AChE patří obidoxim, trimesoxim, pralidoxim, methoxim a asoxim (HI-6). Žádný z dosud známých reaktivátorů není schopen uspokojivě reaktivovat AChE inhibovanou všemi typy OF<sup>2</sup>.



Obrázek 1. Predikce interakcí připravovaných sloučenin s AChE

Cílem práce byla příprava nových reaktivátorů AChE s modifikací bočního řetězce naftylem vycházející z predikce molekulárně modelovací studie (Obrázek 1). Bylo připraveno 12 sloučenin s rozdílnou polohou oximových skupin na pyridiniovém jádru a rozdílným můstkem mezi pyridiniovým jádrem a 1-/2-naftylem (Schéma 1). Připravené sloučeniny byly testovány na modelu tabunem, paraoxonem, methylparaoxonem a DFP inhibované AChE *in vitro*.

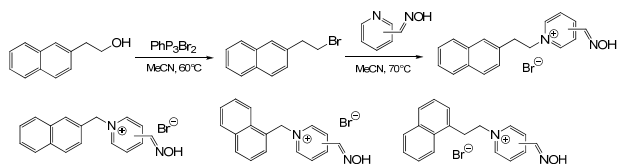


Schéma 1. Oximové reaktivátory AChE s modifikovaným bočním řetězcem

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru FVZ0000501.

#### LITERATURA

- Musilek K., Kuca K., Jun D., Dolezal M.: *Curr. Org. Chem.* 11, 229 (2007).
- Musilek K., Jun D., Cabal J., Kassa J., Gunn-Moore F., Kuca K.: *J. Med. Chem.* 50, 5514 (2007).

## AZAFTALOCYANINY – OD SYNTÉZ PŘES FOTOCHEMICKÉ A FOTOFYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI K APLIKACÍM

Abstrakt přednášky k ceně Alfreda Badera za bioorganickou a bioorganickou chemii za rok 2010

### PETR ZIMČÍK

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
petr.zimcik@faf.cuni.cz.

Ftalocyaniny (Pc) díky svým zajímavým vlastnostem nacházejí uplatnění nejen mezi barvivy, ale také v medicíně, elektrochemii a katalýze<sup>1</sup>. Azaftalocyaniny (AzaPc) patří mezi dusíkaté analogy Pc, kde některé CH skupiny v makrocyclickém systému jsou isosterně nahrazeny dusíky. Právě přítomností dusíkových atomů se mění výrazně jak reaktivita, tak i některé fotochemické a fotofyzikální vlastnosti AzaPc makrocyclů v porovnání s Pc.

Syntézy AzaPc jsou prováděny tetramerizací substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů. Využití lithných nebo hořečnatých alkoholátů jako iniciátorů může během tetramerizace vést k nežádoucím nukleofilním substitucím na elektrondeficitních uhlících v polohách 5 a 6 pyrazinového jádra<sup>2</sup>. V těchto případech je nutné využít alternativních tetramerizačních postupů (viz Schéma 1)<sup>3</sup>.

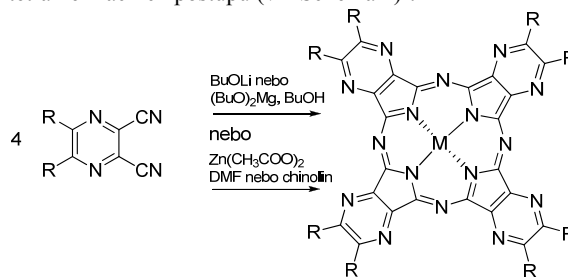


Schéma 1.

Častým požadavkem v jednotlivých aplikacích je syntéza nesymetrických AzaPc nesoucích různé funkční skupiny. Nejjednodušší metodou je statistická kondenzace dvou různých prekurzorů s následnou izolací požadovaných produktů ze směsi šesti různých AzaPc<sup>4,5</sup>. V některých případech jsou nutné i „postmodifikace“ na hotovém makrocyclu – zde lze využít např. vysoce efektivní azid-alkyn cykloadice<sup>6</sup>.

Pc a samozřejmě i AzaPc se vyznačují výrazným absorpčním spektrem zasahujícím až k 700 nm. Po absorpci světelného kvanta pak energii vyzáří buď opět ve formě fotonu (fluorescence), nebo po přechodu do tripletového stavu předají kyslíku a vytvoří z něj silně reaktivní singletový kyslík. Jeho produkce je pak základem medicínské aplikace, tzv. fotodynamické terapie (PDT). Singletový kyslík produkovaný po ozáření fotosensitizeru účinně ničí nádorové buňky. Na několika rozsáhlých sériích různě periferně substituovaných derivátů AzaPc bylo zjištěno, že pro podporu tvorby singletového kyslíku je vhodné substituovat látky nejlépe alkylsulfanyl substituenty a chelátovat centrálně zinečnatý

kationt<sup>2</sup>. Z celkové analýzy výsledků vyplynulo, že fotochemické parametry lze snadno predikovat a vypočítat jako součet příspěvků vlastního makrocyklu a jednotlivých substituentů (podobně jako např. logP)<sup>7</sup>. Velice specifickou cestou deaktivace excitovaných stavů (di)alkylamino AzaPc je pak intramolekulární přenos náboje (ICT), který „zháší“ excitovaný singletový stav a dělá molekuly inaktivní jak fotochemicky, tak z hlediska fluorescence<sup>4</sup>.

Pro aplikaci v PDT byly u hydrofobních AzaPc s optimálními fotochemickými vlastnostmi zkoumány možnosti inkorporace do liposomů jakožto nosičů lipofilních fotosensitizerů a jednoduchých modelů biologické membrány<sup>8</sup>. Jinou možností aplikace AzaPc do biologického prostředí je syntéza ve vodě rozpustných derivátů obsahujících kvarterní ammoniové soli. U těchto derivátů byla zjištěna vysoká fotodynamická aktivita po ozáření (IC<sub>50</sub> ~ 100 nM) na Hep2 buňkách při velice nízké toxicitě (IC<sub>50</sub> > 200 μM)<sup>9</sup>.

Unikátní deaktivaci excitovaných stavů<sup>4</sup> AzaPc procesem ICT lze využít při vývoji nových zhášečů fluorescence v DNA sondách např. pro detekci a kvantifikaci DNA nebo při monitorování real-time PCR. Při těchto metodách genetické analýzy dochází po přiblížení zhášeče a fluoroforu (po hybridizaci komplementárních sekvencí) k předání energie zhášeči, který se jí zbaví nezářivým procesem např. právě ICT. Alkylamino AzaPc se v hybridizačních testech ukázaly jako prakticky univerzální zhášeče pro jakýkoliv fluorofor v současné době používaný v DNA sondách<sup>10</sup>.

*Tato práce vznikla za podpory Výzkumného záměru MŠMT číslo MSM0021620822.*

#### LITERATURA

1. Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R. (Eds.): *Handbook of Porphyrin Science (vols. 1-5)*, World Scientific Publishing, Singapore 2010.
2. Zimcik P., Miletin M., Kostka M., Schwarz J., Musil Z., Kopecky K.: *J. Photochem. Photobiol., A* 163, 21 (2004).
3. Novakova V., Zimcik P., Miletin M., Vůjtěch P., Franzová Š.: *Dyes Pigment* 87, 173 (2010).
4. Novakova V., Zimcik P., Miletin M., Vachova L., Kopecky K., Lang K., Chábera P., Polívka T.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 2555 (2010).
5. Musil Z., Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Lenco J.: *Eur. J. Org. Chem.* 2007, 4535.
6. Novakova V., Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Ivincova J.: *Tetrahedron Lett.* 51, 1016 (2010).
7. Mørkved E. H., Andreassen T., Novakova V., Zimcik P.: *Dyes Pigment* 82, 276 (2009).
8. Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Musil Z., Berka P., Horakova V., Kucerova H., Zbytovska J., Brault D.: *Photochem. Photobiol.* 83, 1497 (2007).
9. Zimcik P., Miletin M., Radilova H., Novakova V., Kopecky K., Svec J., Rudolf E.: *Photochem. Photobiol.* 86, 168 (2010).
10. Kopecky K., Novakova V., Miletin M., Kučera R., Zimcik P.: *Bioconjugate Chem.*, v tisku.

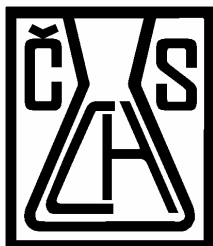
## REJSTŘÍK AUTORŮ

Abdulmanea Khaled	1100	Holas Ondřej	1129
Adriaenssens Louis	1115	Holas Tomáš	1081
Amatov Tynchtyk	1068	Holec Jan	1082
Babinský Martin	1068	Holík Josef	1080
Babuněk Mario	1068, 1092, 1098	Holub Jan	1082
Bárta Jan	1069	Holubářová Lenka	1083
Bartůnek Vilém	1069	Holý Petr	1071, 1082
Bednaříková Tereza	1070	Horová Anna	1129
Beier Petr	1106, 1116	Hrabálek Alexandr	1091, 1126
Bělohradský Martin	1101	Hrdina Radim	1127
Běluša Jindřich	1108	Hrdlička Jan	1095
Bendová Petra	1083	Hrušková Kateřina	1083
Bennetová Blanka	1080	Chadim Martin	1083
Berková Miroslava	1110	Cherkupally Prabhakar	1116
Bertolasi Valerio	1086	Chodounská Hana	1073
Betik Robert	1070	Chudíková Naděžda	1084
Böhm Stanislav	1102	Chytilová Eliška	1111
Bourderioux Aurelie	1081	Imramovský Aleš	1084, 1107
Bouř Petr	1090, 1129	Jagtap Pratap	1085
Brito Alexandra M.	1084	Jahn Ullrich	1068, 1081, 1085, 1088, 1100, 1117, 1126
Brychtová Kateřina	1087	Jahodová Jana	1105
Březinová Anna	1129	Jakubek Milan	1086, 1112
Bříza Tomáš	1092	Jampilek Josef	1084, 1087
Buděšinský Miloš	1073, 1080, 1082	Janková Štěpánka	1086
Budka Jan	1129	Janoušek Zbyněk	1089, 1119
Buffa Radovan	1110	Jegorov Alexandr	1081
Buchta Michal	1071	Jelínek Ivan	1074
Buchta Vladimír	1097	Jindřich Jindřich	1070, 1074, 1079, 1108, 1114, 1119
Bürglová Kristýna	1071	Jiroš Pavel	1125
Buřičová Lucie	1072	Josefík František	1086
Cardová Lenka	1072	Jungwirth Pavel	1107
Cattoen Xavier	1071	Jurášek Michal	1087
Cigler Petr	1123	Jurček Ondřej	1072
Cisařová Ivana	1071, 1073, 1115, 1115, 1121	Káčerová Sandra	1087
Cossio Fernando	1127	Kadlčíková Aneta	1088
Cvak Ladislav	1081	Kafka František	1085, 1088
Černý Bohuslav	1080	Kafka Stanislav	1101, 1111
Černý Ivan	1073	Kaleta Jiří	1089
Číhalová Sylva	1074	Kalinová Blanka	1125
Čížková Martina	1073	Kaminská Kateřina	1089
Čmolík Václav	1102	Kaminský Jakub	1090, 1122
Dian Juraj	1074	Kamlar Martin	1090
Diviš Martin	1074	Kaplánek Robert	1091, 1112
Dolenský Bohumil	1077, 1086, 1093, 1106	Karabanovich Galina	1091
Doležal Martin	1094	Kašička Václav	1115
Doležalová Jana	1074	Kaustová Jarmila	1105
Drabina Pavel	1107	Kejčík Zdeněk	1092
Dračinský Martin	1120	Kelbichová Vendula	1092, 1098
Drašar Lukáš	1075	Kessler Jiří	1093
Drašar Pavel	1072, 1087, 1105, 1127, 1120	Kimmel Roman	1101
Dvořák Dalimil	1084, 1094	Kindl Jiří	1125
Dvořáková Jana	1110	Klán Petr	1117
Dymířová Marie	1116	Klimentová Jana	1126
Eignerová Barbara	1120	Kohout Michal	1093, 1123
Elbert Tomáš	1128	Kokoška Ladislav	1124
Farsa Oldřich	1083	Kolehmainen Erkki	1072, 1105
Fiala Radovan	1105	Kolman Viktor	1068
Foglarová Marcela	1110	Kopecký Kamil	1094, 1124
Forczek Sándor T.	1074	Korotvička Aleš	1094
Givens Richard S.	1117	Korvasová Zina	1075
Glogarová Milada	1093, 1096, 1123	Košmrlj Janez	1111
Grüner Bohumír	1099	Kotek Vladislav	1094
Gyepes Róbert	1115	Kotora Martin	1070, 1078, 1086, 1088, 1094, 1095, 1110, 1119, 1120, 1127
Hajdúch Marián	1128	Koťuha Jan	2095
Hájíček Josef	1075, 1089, 1127	Koval Dušan	1115
Hanusek Jiří	1076, 1107, 1125	Kovářiková Petra	1083
Hanzlová Eva	1102	Kovářová Anna	1096
Hašková Pavlína	1083	Kozmík Václav	1096, 1109, 1113, 1123
Havel Václav	1077, 1118	Král Vladimír	1077, 1091, 1092, 1112
Havlik Martin	1077, 1093	Kralová Jarmila	1092
Henke Adam	1078, 1120	Krátký Martin	1097
Hessler Filip	1078	Krenk Ondřej	1097, 1103
Heyda Jan	1107	Kříž Zdeněk	1105
Hezký Petr	1079	Kubelka Jan	1090
Hidasová Denisa	1095	Kubelka Tomáš	1098
Hlaváč Jan	1079	Kubicová Lenka	1102
Hlaváček Jan	1080, 1118, 1129	Kuča Kamil	1129
Hocek Michal	1069, 1081, 1095, 1098, 1113, 1119	Kulhánek Petr	1068
Hodačová Jana	1071, 1082	Kurfürst Milan	1096
Holan Martin	1081, 1085		



Kvasnička František	1072	Shea Tom	1091
Kvičala Jaroslav	1068, 1092, 1098, 1106, 1116	Schulz Jiří	1115
Kvičalová Magdalena	1099	Skála Pavel	1102
Lanková Petra	1100, 1103, 1111	Skalická Veronika	1068, 1098, 1116
Lapčík Oldřich	1100, 1103, 1111	Skalický Martin	1116
Lau Tanja	1100	Slabochová Markéta	1096
Ledvína Miroslav	1075, 1123	Slaninová Jiřina	1080
Lhoták Pavel	1082, 1129	Slavětinská Lenka	1098
Lipnická Šárka	1101	Slaviková Markéta	1127
Lúčaníková Maria	1099	Slazhnev Anton	1116
Lyčka Antonín	1101	Slintáková Lucie	1111
Macková Eliška	1083	Smrčková Olga	1069
Macková Zuzana	1101	Soural Miroslav	1079
Macků Irena	1083	Stariat Jan	1083
Macháček Miloš	1102	Starý Ivo	1101, 114
Man Michel Wong Chi	1071	Stibor Ivan	1129
Marek Radek	1068, 1105	Stolaříková Jiřina	1105
Martásek Pavel	1091, 1092	Svoboda Jiří	1093, 1096, 1109, 1113, 1123, 1114
Martínek Marek	1102	Svobodová Markéta	1086
Martinů Tomáš	1102	Šafařík Martin	1118, 1129
Masters Bettie Sue	1091	Šaman David	1073
Matějček Pavel	1112	Šarek Jan	1128
Matoušová Eliška	1103	Šekej Peter	1117
Mazal Ctibor	1089	Šebesta Petr	1117
Michl Josef	1089	Šebestík Jaroslav	1118, 1129
Mikšátková Petra	1103	Šimůnek Petr	1086
Musilek Kamil	1129	Šimůnek Tomáš	1083
Nauš Petr	1081	Šindelář Vladimír	1068, 1077, 1118, 1121
Nečas David	1095	Šmejkalová Daniela	1110
Nečas Marek	1089, 1101	Šnajdr Ivan	1119
Nedorostová Lenka	1124	Šrogl Jiří	1078, 1102, 1120, 1128
Němcová Alena	1101	Štancl Marek	1118
Novák Vít	1104	Štefko Martin	1119
Nováková Veronika	1094, 1104, 1124	Štěpánek Ondřej	1120
Nováková Zdena	1105	Štěpánková Hana	1089
Novotná Eva	1105	Štěpnička Petr	1115, 1121
Novotná Vladimíra	1093, 1096, 1123	Štíbingerová Iva	1120
Novotný Jan	1105	Šusteková Jana	1120
Novotný Michal	1126	Švec Jan	1118, 1121
Oktábec Zbyněk	1084	Tauchman Jiří	1121
Opekar Stanislav	1106	Teplý Filip	1073, 1115
Ozcam Evren Ali	1120	Tobman Tomáš	1122
Paleček Jiří	1106	Tomčáková Kateřina	1122
Paleta Oldřich	1106	Tůma Jiří	1123
Panda Markandeswar	1091	Turánek Jaroslav	1075
Panda Satya	1091	Tvrdoňová Monika	1123
Panov Illia	1107	Tykva Richard	1080
Parchaňský Václav	1086, 1093	Urankar Damijana	1111
Paterová Jana	1068, 1107	Urbanová Klára	1124
Pauk Karel	1107	Váchová Lenka	1124
Pavlík Jan	1083	Valterová Irena	1124, 1125
Pejchal Vladimír	1084, 1107	Vaňa Jiří	1076, 1125
Pociecha Damian	1123	Vávra Jan	1115
Popr Martin	1108	Vávrová Anna	1083
Pospíšil Lubomír	1101	Vávrová Kateřina	1083, 1091, 1126
Pospíšilík Karel	1108	Vejsová Marcela	1102
Poučková Pavla	1092	Velebný Vladimír	1110
Pour Milan	1097, 1103	Veselý Ivan	1090, 1114
Pouzar Vladimír	1073	Veselý Jan	1073, 1112
Pozník Michal	1109	Vibert Aude	1085, 1126
Pravda Martin	1110	Vícha Robert	1101
Prchalová Eva	1110	Vinš Petr	1127
Proisl Karel	1111	Vinšová Jarmila	1097
Prokudina Elena A.	1100, 1103, 1111	Vlasáková Růžena	1127
Raich Ivan	1087, 1104, 1122	Vlasáková Věra	1080
Rais Jiří	1099	Vlašaná Klára	1127
Rak Jakub	1091, 1112	Vlk Martin	1128
Rěblová Zuzana	1072	Voltrůvá Svatava	1128
Remeš Marek	1112	Vrbková Eva	1068
Riedl Jan	1113	Waisser Karel	1105
Richtr Václav	1095	Wimmer Zdeněk	1074, 1120
Roh Jaroslav	1091	Wolfbeis Otto S.	1074
Rouchal Michal	1101	Zajícová Markéta	1129
Rudakov Dmytro	1085	Zawada Zbigniew	1118, 1129
Rybáček Jiří	1071, 1082	Zelený Václav	1100
Řehová Lucie	1113	Zemek Filip	1129
Řezanka Michal	1114	Zimčík Petr	1094, 1104, 1124, 1130
Sedlák Michal	1114	Žáček Petr	1125
Sedlák Miloš	1076, 1107, 1125	Ždárová-Karasová Jana	1129
Seidler Arnošt	1114		
Selucký Pavel	1099		
Severa Lukáš	1115		

ORBIFACHOS



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	997	EDITORIAL	997
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
<b>Pokroky ve vývoji antituberkulotik působících na multilékově rezistentní kmeny</b>	998	<b>Advances in the Development of Antitubercu- lotics Acting on Multidrug-Resistant Strains</b>	998
M. Krátký a J. Vinšová		M. Krátký and J. Vinšová	
<b>Pokroky ve vývoji vakcín proti HIV, tuberkulóze a malárii</b>	1006	<b>Advances in Development of Vaccines Against HIV, Tuberculosis and Malaria</b>	1006
P. Grznárová a J. Lipov		P. Grznárová and J. Lipov	
<b>Úprava vody s obsahem huminových látek</b>	1015	<b>Treatment of Water Containing Humic Matter</b>	1015
M. Pivokonský, L. Pivokonská, P. Bubáková a V. Janda		M. Pivokonský, L. Pivokonská, P. Bubáková, and V. Janda	
<b>Deriváty paklitaxelu pro cílený transport cytostatika</b>	1023	<b>Paclitaxel Derivatives for Targeted Delivery to Cancer Cells</b>	1023
M. Příbylová, M. Dvořáková a T. Vaněk		M. Příbylová, M. Dvořáková, and T. Vaněk	
<b>Interpretácia chemických vzorcov pomocou webovej služby</b>	1029	<b>Interpretation of Chemical Formulae Using Web Service</b>	1029
P. Horovčák, D. Dugáček a P. Čirbes		P. Horovčák, D. Dugáček, and P. Čirbes	
<b>Možnosti přípravy makromolekulárních antidegradantů pro polymery</b>	1034	<b>Preparation of Macromolecular Antidegradants for Application in Polymers</b>	1034
J. Podešva a J. Kovářová		J. Podešva and J. Kovářová	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
<b>Štúdium laktázy v imobilizovaných bunkách a kultivačnom médiu <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	1040	<b>Study of Immobilized and Extracellular Lactase in Mouse-ear Cress</b>	1040
J. Stano, K. Neubert, W. Roos, K. Mičieta, M. Koreňová a V. Blanáriková		J. Stano, K. Neubert, W. Roos, K. Mičieta, M. Koreňová, and V. Blanáriková	
<b>Vývoj analytickej metódy pre stanovenie hlavných prvkov metódou ED XRF spektrometrie</b>	1047	<b>Development of an Analytical Method for Determination of Major Elements by Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry</b>	1047
V. Vojteková, A. Majchrák, D. Mackových a J. Blašková		V. Vojteková, A. Majchrák, D. Mackových, and J. Blašková	
<b>Porovnání chromatografických metod pro stanovení ergosterolu a jejich využití při analýze půdy podhorské pastviny</b>	1053	<b>The Comparison of Chromatographic Methods for Ergosterol Determination and Their Application in Analysis of Upland Pasture Soil</b>	1053
J. Jirout, J. Tříška, K. Růžičková, N. Vrchotová, M. Šimek a D. Elhottová		J. Jirout, J. Tříška, K. Růžičková, N. Vrchotová, M. Šimek, and D. Elhottová	
<b>Mikrobiální kontaminace respiračních okruhů</b>	1060	<b>Reduction of Microbial Contamination of Respiration Circuits under Hazardous Working Conditions</b>	1060
K. Lehmert		K. Lehmert	
RECENZE	1064	BOOK REVIEWS	1064
LIBLICE 2010	1065	LIBLICE 2010	1065

**CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 104 (2010), čís./no. 11 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 134, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 120 • 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. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/ FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (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: M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, M. Koman, J. Koubek, T. Míšek, 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: Rodomax s.r.o., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2010 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plně předplatné 2010 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2010 (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: P. Holý • Dáno do tisku 27.10.2010.**