

## Jak dál v chemii?

*Končí jedno století a začíná další a nejen to, končí současně i jedno tisíciletí a chystáme se vkročit do nového. Jak se při této příležitosti dívají chemici na budoucnost chemie?*

*Nedávno skončený 52. sjezd chemických společností v Českých Budějovicích si vzal za motto „Chemie pro třetí tisíciletí a trvale udržitelný rozvoj“; my v Brně jsme skromnější ve svých úvahách: pro sjezd, který uspořádáme v roce 2002 se chceme zaměřit „jen“ na příští století. Za téma jsme si zvolili „Chemie nových materiálů pro 21. století“. Domníváme se, že nové materiály jsou to, na co se chemici zaměří v příštích letech. Vycházíme totiž z vývoje v několika uplynulých letech – vznikla zcela nová oblast supramolekulární chemie, kde jednotlivé molekuly, jako díly dětské stavebnice, slouží ke konstrukci složitých molekulárních skeletů, nebo oblast „míčovitých“ molekul fullerenů nebo „drátových“ a „rourovňových“ polymerů. Při konstrukci a výzkumu použití nových materiálů je nezbytná spolupráce chemiků s biologii, fyzikou a matematikou; proto očekáváme bouřlivý rozvoj interdisciplinárních oborů.*

*Jednou z cest, kterou se moderní materiály spojují na jedné straně s chemií, na druhé se živými systémy, je biomolekulární chemie. Ta na začátku nového tisíciletí vstupuje do nové éry, v níž znalost struktury a dynamiky a jejich vztahu k vnějším makroskopickým projevům zejména makromolekul umožní navrhovat nové materiály s novými a překvapujícími vlastnostmi. K nim budou patřit látky se speciálními elektrickými a optickými vlastnostmi, ale také materiály použitelné přímo v humánní medicíně ať již jako podpůrné prostředky anebo přímo při náhradě některých orgánů. Klíčové místo při návrhu takových materiálů bude hrát znalost atomární struktury a výzkum její vazby na vlastnosti. Biomolekulární chemie se tak stává jednou z bran, jimiž chemie vstupuje do živých systémů. A to jednak modifikací vlastních biologických materiálů, přes přípravu materiálů využitelných v živých systémech, až po*

*vývoj léčiv. Tady se propojuje syntetická chemie s biochemií, fyzikální chemií a molekulární biologii v rovině výzkumu. V průmyslové praxi pak nachází uplatnění např. ve farmacii či výrobě vhodných materiálů.*

*Spolupráce s fyzikou se týká zejména termodynamiky a chemie nových materiálů. Termodynamika materiálů je vědní disciplinou, jejíž základy leží zejména ve fyzikální chemii. Jedním z hlavních předmětů, kterými se zabývá, jsou fázové transformace a fázové diagramy čistých látek a jejich směsí. Tato disciplína se též dotýká dějů spojených s nukleací fází, kinetikou a difúzí. Bez výpočtů a predikcí fázových diagramů se neobejde řada oborů včetně materiálového inženýrství při navrhování nových progresivních materiálů a technologií.*

*Mezi nové materiály patří i speciální keramika; její konstrukční využití (vysokoteplotní aplikace, letecký průmysl, úpravy povrchů) zasahuje do oblasti fyziky, její biomedicínské aplikace (např. skeletální implantáty v lékařství) hraničí s vědami o životě. Do oblasti výzkumu nových materiálů patří také syntéza tenkých organických vrstev (ochrana materiálu, medicínální kompatibilita, membrány, plynulý přechod vlastností v kompozitech) a příprava již zmíněných nanostrukturních drátů a trub.*

*Od nanotechnologií je jen malý krůček k femtochemii, ke studiu velmi krátkodobých jevů na molekulární úrovni a ke studiu vlastností jednotlivých izolovaných molekul. Zde se uplatní hlavně nové přístrojové techniky a matematické postupy, jejichž rozvoj a rozšíření se dá také předpokládat.*

*Doufáme, že v příštím století bude pojem „chemie“ spojován s těmito přínosy pro lidstvo a ne jak dosud jen s některými negativními dopady zastaralých chemických výrobních životní prostředí.*

Miroslav Holík  
za přípravný výbor  
54. sjezdu chemiků v Brně

# SYNTÉZA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA 2- A 6-C-SUBSTITUOVANÝCH PURINOVÝCH BÁZÍ, NUKLEOSIDŮ A ACYKlickÝCH ANALOGŮ NUKLEOTIDŮ\*

MICHAL HOCEK

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6  
e-mail: hocek@uochb.cas.cz

Došlo dne 19.VI.2000

Klíčová slova: C-substituované puriny, acyklické nukleotidy, acyklické nukleosidy, cytostatika

## Obsah

1. Úvod
2. Acyklické analogy nukleotidů odvozené od 2- a 6-(aminoalkyl)purinů
  - 2.1. Syntéza acyklických nukleotidů odvozených od 2-(aminomethyl)purinů
  - 2.2. Syntéza acyklických nukleotidů odvozených od 6-(aminomethyl)purinů a purin-6-karboxamidinů
  - 2.3. Syntéza acyklických analogů odvozených od 6-(1-aminoethyl)purinů a 6-hetarylpurinů
  - 2.4. Syntéza acyklických analogů nukleotidů odvozených od 2-amino-6-C-substituovaných purinů
  - 2.5. Biologická aktivita připravených látek
3. Rozvoj metodiky cross-coupling reakcí purinů a syntéza 6-C-substituovaných purinových bází a nukleosidů
  - 3.1. Syntéza 6-(perfluoralkyl)purinů a jejich alkylace a glykosidace
  - 3.2. Suzuki-Miyauraova reakce 6-halogenpurinů s boronovými kyselinami a syntéza a biologická aktivita 6-fenylpurinů
4. Závěr

## 1. Úvod

Biogenní purinové báze a jejich nukleosidy jsou v polohách 2 a 6 substituovány amino- nebo oxoskupinou, která se účastní tvorby vodíkových vazeb s komplementární bází například s aktivním místem enzymu nebo receptoru. Substitucí těchto skupin je možno připravit látky se širokým spektrem biologické aktivity; např. 6-(alkylamino)puriny (jako analogy cytokininů) vykazují antineoplastickou aktivitu, jejich nukleosidy zase interagují s adenosinovými receptory atd.

Významnou skupinou biologicky aktivních purinových derivátů jsou *N*-(fosfonomethoxyalkyl)puriny, tzv. acyklické analogy nukleotidů<sup>1-3</sup>, vyvinuté v osmdesátých letech týmem A. Holého. Tyto látky se vyznačují protivirovou, cytostatic-

kou, antiparazitickou a imunomodulační aktivitou. Strukturálně-aktivitní studie těchto látek ukázala<sup>4,5</sup>, že pro zachování biologické aktivity je nutná přítomnost aminoskupiny v poloze 2 nebo 6. Později se zjistilo, že vysoce biologicky aktivní jsou<sup>6-9</sup> i některé 6-((di)alkylamino)purinové deriváty.

Nahrazení amino či (alkylamino)skupiny u obou těchto skupin látek *C*-substituentem může vést k vyřazení z vodíkových vazeb v případě nefunkcionalizovaného *C*-substituentu, popř. k možné tvorbě vodíkových vazeb jiného typu v případě funkcionalizovaného substituentu. Kromě toho takovéto *C*-substituované puriny nemohou být katabolizovány deaminasami a lze tudíž předpokládat jejich větší biologickou stabilitu.

2- a 6-*C*-substituované puriny byly dříve obvykle připravovány heterocyklizací z pyrimidinů či imidazolů nebo fotochemickou radikálovou substitucí purinů<sup>10,11</sup>. Heterocyklizační metody byly obvykle mnohastupňové syntézy s nízkými celkovými výtěžky, zatímco fotochemické metody byly značně neselektivní. Až v posledních dvou dekádech se s rozvojem „cross-coupling“<sup>\*\*</sup> reakcí katalyzovaných komplexy přechodných kovů začaly vyvíjet efektivní metody přímé *C*-substituce halogenpurinů organokovy. Pro zavedení různých typů *C*-substituentů bývá výhodné použití různých typů organokovových činidel: arylmagnesiumhalogenidy<sup>12,13</sup> jsou vhodné pro zavedení některých jednoduchých arylů, stannany a organozinečnatá činidla<sup>14-17</sup> se používají zejména pro zavedení arylů, hetarylů a alkenylů, zatímco kupráty<sup>18-20</sup> a trialkylhliníky<sup>21</sup> pro zavedení alkylových substituentů. K rozvoji této metodologie výrazně přispěla i naše laboratoř.

## 2. Acyklické analogy nukleotidů odvozené od 2- a 6-(aminoalkyl)purinů

Jak již bylo zmíněno v úvodu, přítomnost 2- nebo 6-amino-, popř. ((di)alkylamino)skupiny na purinovém jádře má důležitou úlohu v biologické aktivitě acyklických analogů nukleotidů. Informace o této úloze by mohly přispět k porozumění mechanismu účinku těchto látek. Pro studium tohoto fenoménu bylo navrženo několik typů modifikovaných analogů těchto látek, které jsou charakterizovány nahrazením (alkylamino)skupiny (*a*) (aminomethyl)skupinou, která může tvořit analogické H-vazby, ale je bazičtější; (*b*) izosterní *N*-substituovanou 1-(aminoethyl)skupinou; (*c*) silně bazičnou karboxamidinovou funkcí; a konečně (*d*) různými typy dusíkatých heterocyklů.

### 2.1. Syntéza acyklických nukleotidů odvozených od 2-(aminomethyl)purinů

Byla vyvinuta originální metoda<sup>22</sup> přípravy benzyloxykarbonylem (Cbz) chráněných 2-(aminomethyl)purinových bází

\* Přednáška nositele Baderovy ceny za rok 1999, Liblice, 16. 11. 1999

\*\* Nemá český ekvivalent; jde o tvorbu C-C vazby mezi dvěma různými organickými zbytky; běžně se tento termín používá pro reakce organického elektrofilu s organokovem

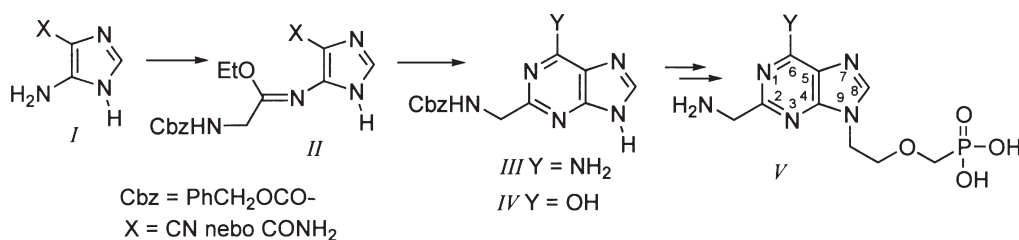


Schéma 1

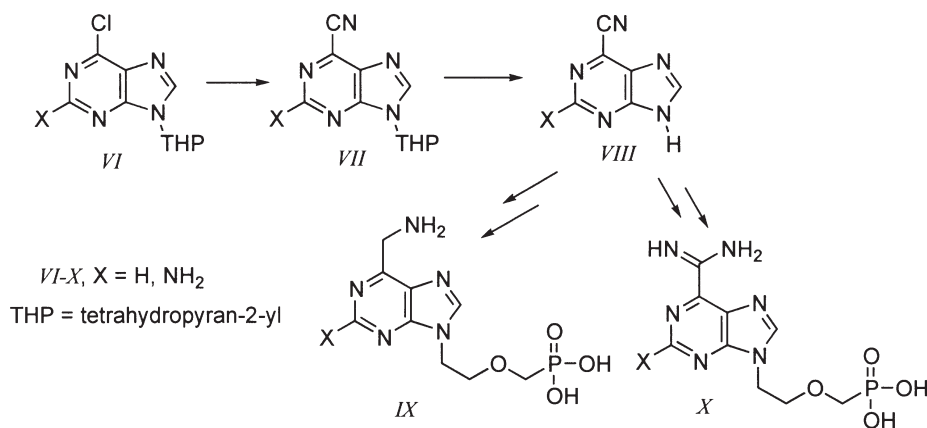


Schéma 2

*III* heterocyklizací derivátů 4-aminoimidazol-5-karboxylové kyseliny *I* s Cbz-chráněným aminoorthoacetátem vedoucí kvantitativně k imidátovým intermediátům *II*, které byly bazicky cyklizovány na puriny (schéma 1). Tato metoda umožnila efektivní přípravu chráněných 2-(aminomethyl)adeninu a 2-(aminomethyl)hypoxanthinu v multigramovém měřítku. Alkylace<sup>23</sup> 2-(Cbz-aminomethyl)adeninu *IV* fosfonomethoxyalkylačními činidly za přítomnosti NaH probíhala regioselectivně za vzniku žádaných N-9 substituovaných derivátů. Analogická alkylace 2-(aminomethyl)hypoxanthinu však byla neúspěšná. Příslušné hypoxanthinové deriváty byly tedy připraveny oxodeaminací derivátů adeninových. Použitím jod(trimethyl)silanu byly současně odštěpeny isopropylesterové skupiny fosfonátu a Cbz skupina za vzniku požadovaných volných fosfonátů *V*.

## 2.2. Syntéza acyklických nukleotidů odvozených od 6-(aminomethyl)purinů a purin-6-karboxamidinů

K přípravě cílových sloučenin byl navržen postup vycházející z 6-kyanopurinových bází *VIII*. Tyto klíčové látky byly získány zlepšenou metodou<sup>24</sup> spočívající v reakci tetrahydropyran-2-yl (THP) chráněných 6-chlorpurinů *VI* s tetraethylamonium kyanidem za přítomnosti 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]oktanu (DABCO) v acetonitrilu za pokojové teploty. Příslušné chráněné 6-kyanopuriny *VII* byly získány ve vysokých výtěžcích (schéma 2). THP skupiny těchto intermediátů byly kvantitativně odštěpeny za mírných podmínek ionexem v  $\text{H}^+$  cyklu (Dowex 50X8) v methanolu. Takto byl snadno získán 6-kyanopurin a 2-amino-6-kyanopurin v multigramových množstvích. Oba 6-kyanopuriny *VIII* byly potom selektivně alkylovány<sup>25,26</sup> fosfonomethoxyalkylačními činidly za přítomnosti uhličitanu cesného za vzniku žádaných N-9 sub-

stituovaných 6-kyanopurinových derivátů. Ty pak byly podrobeny katalytické hydrogenaci následované reakcí s brom-(trimethyl)silanem (TMSBr) a poskytly cílové fosfonáty 6-(aminomethyl)purinů *IX*. Získané chráněné 6-kyanopurinové intermediáty byly také využity k přípravě 6-karboxamidinopurinových derivátů *X* sledem reakcí s methoxidem sodným, chloridem amonným a TMSBr.

## 2.3. Syntéza acyklických analogů odvozených od 6-(1-aminoethyl)purinů a 6-hetarylpurinů

Stilleho reakce příslušných 6-chlorpurinových fosfonátů *XIa* a *XIc* s (1-ethoxyvinyl)tributylstannanem poskytla 6-(1-ethoxyvinyl)puriny *XII*, které byly následně hydrolyzovány na 6-acetylpuriny *XIII* (schéma 3). Reduktivní aminace těchto látek působením  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  za přítomnosti primárních a sekundárních amin hydrochloridů následovaná odchráněním umožnila přípravu<sup>27</sup> série *N*-substituovaných 6-(1-aminoethyl)purinových acyklických nukleosidů *XIV*. Cross-coupling reakce 6-jod-9-[2-(diethoxyfosforylmetoxy)ethyl]purinu *XIb* s různými heteroarylstannany a heteroarylzinečnatými činidly za katalýzy  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  poskytly<sup>28</sup> sérii 6-hetarylpurinových derivátů v dobrých výtěžcích. Výsledné chráněné 6-hetarylpurinové meziproducty byly standardním způsobem deblokovány na volné fosfonáty *XV*.

## 2.4. Syntéza acyklických analogů nukleotidů odvozených od 2-amino-6-C-substituovaných purinů

Vzhledem k již zmiňované důležité úloze aminoskupiny v biologické aktivitě této skupiny látek, byla dalším logickým

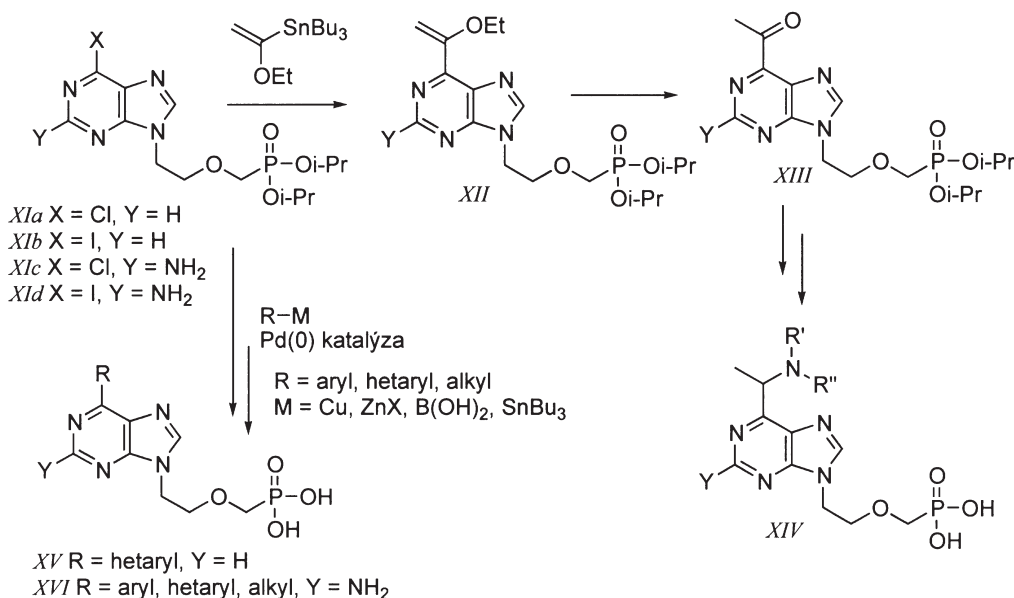


Schéma 3

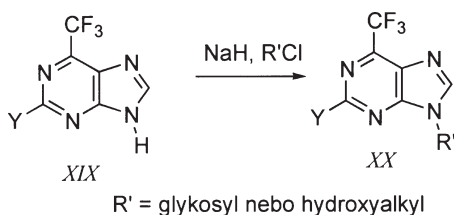
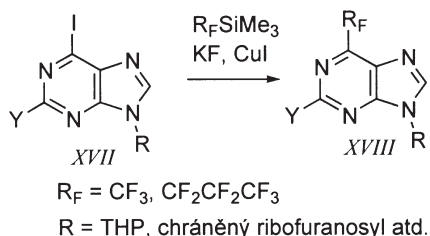


Schéma 4

pokračováním projektu systematická příprava a studium protivirové aktivity 2-amino-6-*C*-substituovaných purinových derivátů<sup>29</sup>. Byly studovány cross-coupling reakce 6-chlor- a 6-jodpurinových derivátů *XIc* a *XI d* s různými typy organokovů (schéma 3). Chlorpurinový derivát *XIc* reagoval s trialkylhliníky a arylboronovými kyselinami za vzniku příslušných 6-*C*-substituovaných produktů *XVI*, zatímco pro reakce s hetarylzinečnatými činidly a hetarylstannany bylo nutno použít reaktivnější 6-jodpurinový derivát *XI d*. Perfluoralkylkupráty generované *in situ* z perfluoralkylsilanů pomocí KF a CuI reagovaly s 6-jodpurinovým derivátem *XI d* za vzniku 6-perfluoralkylpurinů v nízkých výtěžcích.

## 2.5. Biologická aktivita připravených látek

Všechny výše uvedené acyklické nukleotidy byly testovány na protivirovou aktivitu. Ukázalo se, že pouze látky nesoucí funkcionalizovaný *C*-substituent (aminomethyl, hyd-

roxyethyl, heptafluorpropyl) v poloze 6 a současně aminoskupinu v poloze 2 si částečně zachovávají biologickou aktivitu. Definitivní strukturně aktivní závěry z tohoto stále ještě probíhajícího projektu však bude možno učinit až v budoucnu v kontextu s rozsáhlými sériemi biologicky aktivních acyklických analogů nukleotidů připravených ve skupině A. Holého.

## 3. Rozvoj metodiky cross-coupling reakcí purinů a syntéza 6-*C*-substituovaných purinových bází a nukleosidů

Kromě výše uvedených metod, zaměřených na syntézu acyklických analogů nukleotidů jako potenciálních protivirových látek, byl naším cílem také obecný rozvoj metodiky cross-coupling reakcí halogenpurinů s organokovy a použití této metodiky pro syntézu 6-*C*-substituovaných purinových bází a nukleosidů cílených především na možnou antineoplastickou aktivitu.

### 3.1. Syntéza 6-(perfluoralkyl)purinů a jejich alkylace a glykosidace

Byla vyvinuta originální metoda<sup>30</sup> perfluoralkylace 6-jodpurinů *XVII* použitím perfluoralkyl(trimethyl)silanů za přítomnosti CuI a KF (schéma 4). Vlastním perfluoralkylačním činidlem je *in situ* vytvořený perfluoralkyl kuprát. Tato metoda je velmi efektivní zejména pro trifluormethylaci 6-jodpurinových derivátů. Trifluormethylace 2-amino-6-jodpurinů a perfluoralkylace vyššími perfluoralkylsilany probíhá s nižšími výtěžky. Touto metodou byla připravena série 6-(trifluormethyl)- a 6-(heptafluorpropyl)purinových bází, nukleosidů a acyklických nukleotidů *XVIII*. U všech připravených látek byla testována biologická aktivita. Zatímco u 9-(β-D-ribofuranosyl)-6-(trifluormethyl)purinu byla nalezena významná cytostatická aktivita (IC<sub>50</sub> = 0,45–2,5 μmol.l<sup>-1</sup>) proti několika buněčným kulturám lidských nádorů a leukémií, ostatní látky

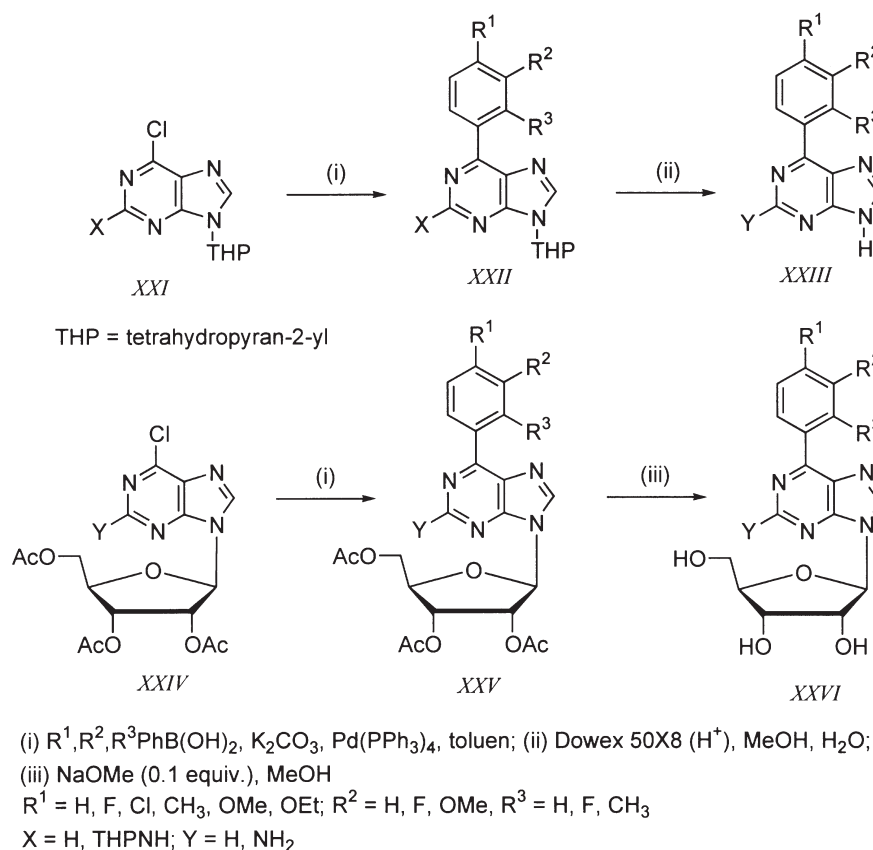


Schéma 5

byly inaktivní. Proto se jevílo zajímavé připravit sérii různých nukleosidů a acyklických nukleosidů odvozených od 6-(trifluormethyl)purinu XIX. Tato báze výše zmíněnou metodou dostupná v multigramovém množství, sloužila jako výchozí látka pro alkylační a glykosylační reakce. Tyto reakce probíhaly regio- a stereoselektivně za vzniku pouze N-9 substituovaných derivátů a  $\beta$ -anomerů v případě nukleosidů. Takto byla připravena<sup>31</sup> série: 9-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-, 9-(2-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-, 9-( $\beta$ -D-arabinofuranosyl)-, 2,3-dihydroxypropyl- a (2-hydroxyethyl)oxymethylderivátů 6-(trifluoromethyl)purinu XX. Překvapivě, kromě již zmíněného ribonukleosidu, ostatní deriváty byly inaktivní, což svědčí o velmi úzké strukturální specifitě cytostatické aktivity této skupiny látek.

### 3.2. Suzuki-Miyaurova reakce 6-halogenpurinů s boronovými kyselinami a syntéza a biologická aktivita 6-fenylpurinů

Ve spolupráci s týmem D. Dvořáka byla vyvinuta originální metoda<sup>32</sup> 6-C-substituce purinů aplikací Suzuki-Miyaurovy reakce 6-halogenpurinů s boronovými kyselinami. Tato velmi používaná reakce dosud nebyla nikdy úspěšně aplikována v chemii purinů. Optimalizací byly nalezeny dvojce reakční podmínky, za nichž reakce probíhá různým způsobem. Použití bezvodých podmínek v toluenu je velmi vhodné k reakcím fenyloboronových kyselin nesoucích elektroneutrální, elektrondonorní nebo slabě elektronakceptorní substituenty,

zatímco použití vodných podmínek je vhodné k reakcím alkyloboronových kyselin a fenyloboronových kyselin nesoucích elektronakceptorní substituent. Za bezvodých podmínek byla použitím série komerčně dostupných substituovaných fenyloboronových kyselin připravena<sup>33</sup> velká řada substituovaných 6-fenylpurinových bází XXIII a nukleosidů XXVI (schéma 5). Substituované 6-fenyl-9-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)puriny XXVI ( $Y = \text{H}$ ) vykazovaly významnou cytostatickou aktivitu *in vitro* ( $\text{IC}_{50} = 0,25\text{--}10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Studie dalších specificky substituovaných derivátů tohoto typu teprve probíhají.

## 4. Závěr

Byly vyvinuty efektivní metody přípravy 2- a 6-C-substituovaných purinových derivátů a aplikovány pro přípravu purinových bází, nukleosidů a acyklických analogů nukleotidů. Zatímco u připravených acyklických analogů nukleotidů byly nalezeny pouze marginální protivirové aktivity u několika látek, mezi připravenými nukleosidy byla objevena nová skupina látek s významnou cytostatickou aktivitou – 6-fenylpurinové ribonukleosidy. Systematické studium ve všech zmiňovaných oblastech stále pokračuje.

*Autor děkuje všem spolupracovníkům. Největší dík patří dr. A. Holému za odborné vedení během disertační práce a za cenné rady a spolupráci v pozdějších fázích projektu. Na některých částech tohoto projektu se podíleli Ing. M. Česnek, doc. D. Dvořák, Ing. M. Havelková a dr. D. Hocková (chemie),*

dr. H. Dvořáková a dr. M. Masojídková (NMR spektroskopie) a dr. G. Andrei, prof. J. Balzarini, prof. E. De Clercq, dr. R. Snoeck a dr. I. Votruba (studium biologické aktivity). Práce byla podporována granty GA ČR: 203/93/0118, 203/96/0005, 203/96/K001, 203/98/P027 a 203/00/0036 a firmou Gilead Sciences (U.S.A.).

## LITERATURA

- Holý A., v knize: *Advances in Drug Design* (De Clercq E., ed.), sv. 1, str. 179. JAI Press Inc., Greenwich 1993.
- Holý A., Dvořáková H., Jindřich J., v knize: *Antibiotics and Antiviral Compounds* (Krohn K., Kirst H. A., Maag H., ed.), str. 455. Verlag Chemie, Berlin 1993.
- De Clercq E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 449 (1998).
- Holý A., Votruba I., Merta A., Černý J., Veselý J., Šedivá K., Rosenberg I., Otmar M., Hřebabecský H., Trávníček M., Vonka V., Snoeck R., De Clercq E.: *Antiviral Res.* 13, 295 (1990).
- Holý A., Günter J., Dvořáková H., Masojídková M., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., De Clercq E.: *J. Med. Chem.* 42, 2064 (1999).
- Meerbach A., Neyts J., Holý A., Wutzler P., De Clercq E.: *Antivir. Chem. Chemother.* 9, 275 (1998).
- Holý A., Zídek Z., Votruba I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61 (Special Issue), S182 (1996).
- Zídek Z., Holý A., Franková D.: *Int. J. Immunopharmacol.* 19, 587 (1997).
- Otová B., Zídek Z., Holý A., Votruba I., Sladká M., Marinov I., Leskova V.: *In Vivo* 11, 163 (1997).
- Shaw G., v knize: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (Katritzky A. R., Rees C. W., Scriven F. V., ed.), sv. 7. Pergamon Press, London 1994.
- Ewing D. F., Mackenzie G., v knize: *Second Supplements to the 2nd Edition of Rodd's Chemistry of Carbon Compounds* (Sainsbury M., ed.), sv. IV K(partial)/L. Elsevier Science, Amsterdam 1999.
- Bergstrom D. E., Reddy P. A.: *Tetrahedron Lett.* 23, 4191 (1982).
- Estep K. G., Josef, K. A., Bacon E. R., Carabates P. M., Rumney S. IV, Pilling G. M., Krafte D. S., Volberg W. A., Dillon K., Dugrenier N., Briggs G. M., Canniff P. C., Gorczyca W. P., Stankus G. P., Ezrin A. M.: *J. Med. Chem.* 38, 2582 (1995).
- Gundersen L.-L.: *Tetrahedron Lett.* 35, 3155 (1994).
- Gundersen L.-L., Bakkestuen A. K., Aasen A. J., Overas H., Rise F.: *Tetrahedron* 50, 9743 (1994).
- Gundersen L.-L., Langli G., Rise F.: *Tetrahedron Lett.* 36, 1945 (1995).
- Van Aerschot A. A., Mamos P., Weyns N. J., Ikeda S., De Clercq E., Herdewijn P.: *J. Med. Chem.* 36, 2938 (1995).
- Mc Kenzie T. C., Glass D.: *J. Heterocycl. Chem.* 24, 1551 (1987).
- Dvořáková H., Dvořák D., Holý A.: *Tetrahedron Lett.* 37, 1285 (1996).
- Dvořáková H., Dvořák D., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 2065 (1998).
- Hirota K., Kitade Y., Kanbe Y., Maki Y.: *J. Org. Chem.* 57, 5268 (1992).
- Hocek M., Masojídková M., Holý A.: *Synthesis* 1994, 1401.
- Hocek M., Masojídková M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60, 875 (1995).
- Hocek M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60, 1386 (1995).
- Hocek M., Masojídková M., Holý A., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., De Clercq E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 1525 (1996).
- Hocek M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61 (Special Issue), S55 (1996).
- Hocek M., Masojídková M., Holý A.: *Tetrahedron* 53, 2291 (1997).
- Hocek M., Masojídková M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 62, 136 (1997).
- Česnek M., Hocek M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65, 1357 (2000).
- Hocek M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 229 (1999).
- Hocková D., Hocek M., Dvořáková H., Votruba I.: *Tetrahedron* 55, 11109 (1999).
- Havelková, M., Hocek, M., Česnek, M., Dvořák, D.: *Synlett* 1999, 1145.
- Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: *J. Med. Chem.* 43, 1817 (2000).

**M. Hocek** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Synthesis and Biological Activity of 2- and 6-C-Substituted Purine Bases, Nucleosides and Acyclic Nucleotide Analogues (Bader Award Lecture)**

An overview of the author's recent achievements in the synthesis 2- and 6-C-substituted purines. Diverse approaches consisting mainly in heterocyclization, nucleophilic substitution and cross-coupling reactions were applied to the preparation of the title purines which were further transformed to target nucleosides and nucleotide analogues. Biological activity of the analogues is discussed.

# PŘÍPRAVA A STABILITA SUPERTĚŽKÝCH PRVKŮ

ČESTMÍR JECH

Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8

Došlo dne 3.XI.1999

Klíčová slova: supertěžké prvky, ostrůvky stability

## Obsah

1. Úvod
2. Výskyt a stabilita nuklidů
3. Struktura atomových jader
4. Transuranové a blízké transfermiové prvky
5. Ke břehům ostrůvku stability
6. Technika přípravy a průkazu supertěžkých prvků
7. Prvky 114, 116, 118

## 1. Úvod

Rozvoj jaderné fyziky umožnil nejen připravit celou řadu radioaktivních nuklidů od převážné většiny prvků vyskytujících se v přírodě ve formě stabilních izotopů, ale otevřel i cestu k přípravě a zkoumání vlastností prvků s atomovými čísly vyššími než 92 (tj. ležících za uranem). Uplatnily se zde zejména pokroky v technice urychlování těžkých jaderných projektilů a manipulace s energetickými iontovými svazky, dále pak spektroskopie jaderného záření i poznatky o vnitřní struktuře a stabilitě atomových jader. Pionýrskou roli v tomto směru sehrály práce amerického chemika Glenna Seaborga<sup>1</sup>, který má významné zásluhy zejména o postupné vytváření nových transuranových prvků. Seaborg zemřel v únoru 1999 a tento referát je věnován jeho památce.

Navážeme na článek, který jsme o supertěžkých prvcích pro Chemické listy<sup>2</sup> napsali před více než čtvrt stoletím a který nyní doplníme o nejnovější poznatky, a čtenáři přiblížíme současný stav oboru. Aby byl výklad přístupný i pro chemiky, kterým je tato oblast poněkud vzdálenější, zopakujeme v úvodu nejdůležitější poznatky o výskytu, struktuře a stabilitě atomových jader.

## 2. Výskyt a stabilita nuklidů

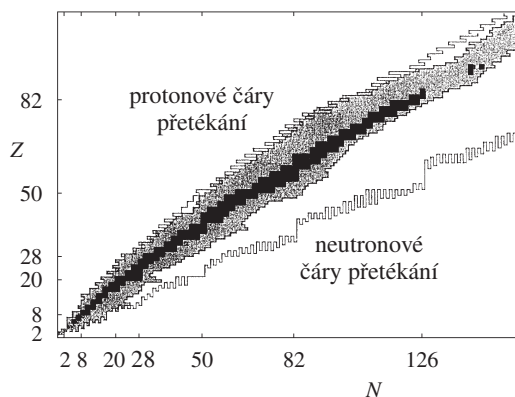
Z prvků běžně se vyskytujících v přírodě má nejvyšší protonové číslo ( $Z=92$ ) uran, jehož izotopy  $^{235}\text{U}$  a  $^{238}\text{U}$  vznikly ve vesmíru primordiální nukleogenezi patrně při výbuchu supernov a zachovaly se na Zemi (jsou radioaktivní) díky dlouhým poločasům rozpadu ( $7 \cdot 10^8$  a  $4,5 \cdot 10^9$  let). Podobně zde od dob původní nukleogeneze přežívají velmi dlouhodobé izotopy, např.  $^{40}\text{K}$ ,  $^{87}\text{Rb}$ ,  $^{147}\text{Sm}$ . Celá řada poměrně dlouhodo-

bých (avšak ve srovnání se stářím Země krátce žijících) nuklidů zde vznikla až druhotně jadernými reakcemi vyvolanými neutrony kosmického záření např.  $^{237}\text{Np}$  a  $^{239}\text{Pu}$  v uranových horninách nebo  $^{14}\text{C}$  a  $^3\text{H}$  v ovzduší Země.

Prakticky od všech prvků se dodnes podařilo připravit radioaktivní izotopy uměle bombardováním stabilních terčových jader vhodnými jadernými střelami, především neutrony. Soubor v přírodě se vyskytujících stabilních i uměle vytvořených nuklidů lze nejlépe znázornit v souřadnicích protonových ( $Z$ ) a neutronových čísel ( $N$ ) jak to ukazuje<sup>3</sup> obr. 1. Zde je 273 stabilních nuklidů vyznačeno černými čtverečky a tvoří jakousi páteř soustavy. K ní zespodu přiléhá množina uměle připravených nestabilních nuklidů, které mají (oproti stabilním nuklidům) vyšší počty neutronů v jádře. U nich dochází k nitrojaderným přeměnám neutronů v protony (za současné emise elektronu) a k snižování poměru  $N/Z$  tak, aby odpovídal oblasti stability. Podobně v nestabilních jádrech ležících nad oblastí stability probíhá úprava  $N/Z$  nitrojadernou přeměnou protonu v neutron spojenou s emisí pozitronu nebo elektronovým záchytem příp. i jinými procesy (záření alfa). Hodnoty poměru  $N/Z$  jsou u lehkých stabilních jader blízké jedničce, u těžších stabilních jader se tento poměr blíží  $3/2$ . Takové poměrně ostré vymezení oblasti jaderné stability je výsledkem působení přitažlivých jaderných sil působících mezi protony i neutrony a coulombických odpuzivých sil mezi protony. Vyznačeny zde jsou i tzv. „čáry přetékání“ (drip lines) definované jako nejlehčí a nejtěžší izotopy určitého prvku, v nichž poslední nukleon již není vázán a jádro se rozpadá v čase kratším než  $10^{-22}$  s (což je hodnota srovnatelná s dobou průletu nízkooenergetického protonu jádrem).

## 3. Struktura atomových jader

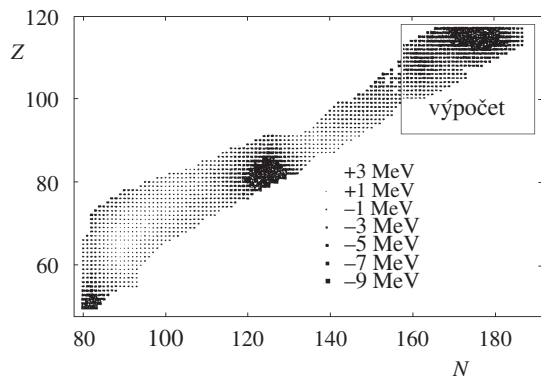
Je známo, že úhrnná energie vazby všech nukleonů v jádrech roste s jejich počtem nukleonů a dosahuje u těžkých jader až 2 GeV. Střední vazebná energie nukleonu (celková



Obr. 1. Znázornění stabilních a velmi dlouhodobých nuklidů nacházejících se v přírodě (černé čtverečky) a uměle připravených radioaktivních nuklidů (šedá plocha) v souřadnicích protonových ( $Z$ ) a neutronových ( $N$ ) čísel

energie vazby dělená počtem nukleonů) vykazuje závislost na hmotnostním číslu, kterou lze objasnit pomocí kapkového modelu jádra. Ten je založen na určité analogii mezi chováním molekul v kapalně fázi a chováním „jaderné kapaliny“ tvořené nukleony, mezi nimiž působí jaderná přitažlivost. Pomocí této představy lze dobře vysvětlit např. trhání „kapek jaderné tekutiny“ při štěpení jader.

Je zřejmé, že celková vazebná energie jádra určuje jeho stabilitu, kterou lze vyjadřovat pomocí příslušného parciálního poločasů např. spontánního štěpení. Bylo zjištěno, že zvláště pevně vázaná a tedy stabilní jsou např. jádra <sup>4</sup>He, <sup>16</sup>O, <sup>40</sup>Ca a obecně pak jádra, jejichž protonová a neutronová čísla nabývají hodnot 2, 8, 20, 28, 82, 126 (pro neutrony), která se nazývají čísla magickými. To jsou počty protonů a neutronů,



Obr. 2. Rozdělení experimentálně stanovených slupkových korekčních energií (velikost korekce je znázorněna velikostí čtverečku) a hodnot předpovídaných pro oblast supertěžkých nuklidů<sup>6</sup> (v obdelníčku)

u nichž podle slupkového modelu jádra je dokončeno obsazování jaderných slupek (v analogii s obsazováním elektronových slupek u atomů). Jednočásticový slupkový model jádra rozpracovaný zejména Goepertovou-Meyerovou a Jensenem<sup>4</sup> vysvětluje magická čísla a některé jiné vlastnosti jader interakcí jednotlivých nukleonů se silovým polem vytvářeným ostatními nukleony. Jestliže jádro obsahuje sudý počet protonů a neutronů (súdo-sudé jádro), vyskytují se v něm jen zaplněné energetické podhladiny, protože každá hladina může obsahovat dvě částice (s opačnými spiny). Taková jádra jsou stabilní a jejich výskyt převažuje, zatímco lichá-lichá jádra jsou spíše výjimkou.

Kolektivní model jádra kombinuje neúspěšnější prvky obou předešlých modelů a uvažuje i možnost kmitání a deformace jader v důsledku jejich rotace.

K hlubšímu objasnění systematiky jaderné stability, např. zvýšené stability jader s uzavřenými jak protonovými tak neutronovými slupkami (tak zvaná dvojnásobně magická jádra) zavedl Strutinsky<sup>5</sup> v roce 1967 pojem slupkové korekční energie. Podle něj představuje slupková korekce malou odchylku (zvyšující vazebnou energii) oproti stejnoměrnému rozdělení hladin jednočásticového modelu a tato odchylka se používá ke korekci energií vypočtených podle kapkového modelu. Její hodnoty lze stanovit na podkladě hmotnostního úbytku jádra a pro oblast hypotetických supertěžkých jader teoreticky předpovědět. Rozložení hodnot slupkových korekčních energií pro oblast těžkých a supertěžkých prvků ukazuje názorně obr. 2. Zde je jasně patrná oblast se zvýšenou stabilitou zejména u dvojnásobně magických jader charakterizovaných zřejmě dalším magickým protonovým číslem Z = 114 a magickým neutronovým číslem N = 184. Podle některých autorů leží oblast se zvýšenou stabilitou až u jader se Z = 126 a N = 194.

										18								
1																		2
H																		He
3	4											5	6	7	8	9	10	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
11	12	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar	
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
55	56	57*	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	
Cs	Ba	La*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
87	88	89 <sup>+</sup>	104	105	106	107	108	109	110	111	112							
Fr	Ra	Ac <sup>+</sup>	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	110	111	112							
			90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103		
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr		
			58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71		
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		

Obr. 3. Periodická tabulka prvků, + aktinidy, \* lantanidy



Tabulka I

Posloupnost dosud připravených transfermiových a supertěžkých prvků

Z	Název	Rok objevu	Místo objevu <sup>a</sup>	Reakce vzniku <sup>b</sup>	Citace
101	Mendelevium, Md	1955–58	Berkeley	$^{253}\text{Es} (^4\text{He}, n) ^{256}\text{Md}$	
102	Nobelium, No	1958–65	Dubna	$^{243}\text{Am} (^{15}\text{N}, 4n) ^{254}\text{No}$	
103	Lawrencium, Lr	1961–71	Berkeley, Dubna	$^{249-252}\text{Cm} (^{10-11}\text{B}, xn) ^{258}\text{Lr}$	
104	Rutherfordium, Rf	1964–69	Dubna	$^{249}\text{Cf} (^{12}\text{C}, 4n) ^{257}\text{Rf}$	9
105	Dubnium, Db	1968–70	Dubna	$^{243}\text{Am} (^{22}\text{Ne}, 4n) ^{261}\text{Db}$	
106	Seaborgium, Sg	1974	Berkeley, Livermore	$^{249}\text{Cf} (^{18}\text{O}, 4n) ^{263}\text{Sg}$	
107	Bohrium, Bh	1981	GSI, Darmstadt	$^{209}\text{Bi} (^{54}\text{Cr}, 1n) ^{262}\text{Bh}$	15
108	Hassium, Hs	1984	GSI, Darmstadt	$^{208}\text{Pb} (^{58}\text{Fe}, 1n) ^{265}\text{Hs}$	16
109	Meitnerium, Mt	1982	GSI, Darmstadt	$^{209}\text{Bi} (^{58}\text{Fe}, 1n) ^{266}\text{Mt}$	17
110		1994	GSI, Darmstadt	$^{208}\text{Pb} (^{62}\text{Ni}, 1n) ^{269}110$	18
111		1994	GSI, Darmstadt	$^{209}\text{Bi} (^{64}\text{Ni}, 1n) ^{272}111$	19
112		1996	GSI, Darmstadt	$^{208}\text{Pb} (^{70}\text{Zn}, 1n) ^{277}112$	20
114		1999	Dubna	$^{244}\text{Pu} (^{48}\text{Ca}, 3n) ^{289}114$	23
116		1999	Berkeley	$^{293}118$ rozpadem alfa na $^{289}116$	24
118		1999	Berkeley	$^{208}\text{Pb} (^{86}\text{Kr}, 1n) ^{293}118$	24

<sup>a</sup> Berkeley – Lawrence Berkeley National Laboratory, California; Livermore – Lawrence Livermore National Laboratory, California; Dubna – Spojený ústav jaderného výzkumu, Rusko; GSI – Gesellschaft für Schwerionenforschung, Darmstadt, SRN,

<sup>b</sup> jaderné reakce jsou uvedeny ve schématu: terčové jádro (střela, lehký produkt) těžký produkt

#### 4. Transuranové a blízké transfermiové prvky

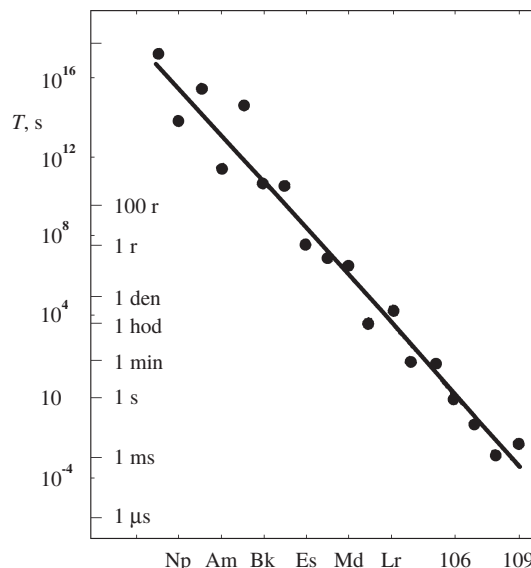
Snahy připravit nové prvky z oblasti za stávajícím koncem periodické tabulky (obr. 3) byly původně motivovány touhou poznat jejich vlastnosti a zařadit je do soustavy prvků. Jak se však ukázalo, sehrály již první připravené transurany velmi významnou roli v rozvoji jaderné energetiky a jaderných zbraní, další transurany pak našly praktické uplatnění jako zdroje záření alfa pro standardizační účely, neutronové zdroje, statické eliminátory, radioizotopové zdroje elektřiny aj. Úsilí připravit supertěžké prvky bylo pak živeno potřebou prověřit naše poznatky o jaderné stabilitě, reakčních mechanismech vedoucích ke vzniku málo stabilních těžkých jader a zejména pak hypotézy o předpokládané existenci ostrůvku (nebo ostrůvků) jaderné stability.

K pokusům o přípravu prvků s protonovými a atomovými čísly vyššími, než mají nejtěžší přírodní prvky, bylo nejprve využito jaderných reakcí záchytu neutronů. Byl to vlastně postup, který objevil Fermi, když studoval záchyt neutronů na jádrech  $^{207}\text{Tl}$ . Složená jádra  $^{208}\text{Tl}$  jsou nestabilní a jejich stabilita se obnovuje přeměnou beta, kterou se mění na jádra s protonovým číslem o jednotku vyšším – tedy na jádra  $^{208}\text{Pb}$ . Tohoto postupu bylo, jak známo, využito též při přípravě prvních transuranových prvků – neptunia 239 a plutonia 239, a opakováním reakce záchytu neutronu na dříve připravených nižších transuranech (jako terčovách jádrech) i k získání transuranů dalších až po fermium (se  $Z = 100$ ). Dále postupovat touto cestou možné nebylo, protože žádný z izotopů fermia se nepřeměňuje rozpadem beta.

K syntéze dalších prvků za hranicí fermia<sup>8,9</sup> pak bylo využito zejména jaderných reakcí vyvolaných bombardováním nejtěžších, v té době dostupných nuklidů částicemi alfa a urychlenými lehkými jádry ( $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{22}\text{Ne}$ ). Příklady takovýchto syntéz transfermiových prvků se  $Z = 101$  až 106 jsou uvedeny na prvních řádcích v tab. I spolu s časovým

údajem a pracovišti vědeckých týmů, kterým byla priorita objevu nových prvků přiznána. (Zde jsme se přidrželi názorů vyslovených v přehledném článku<sup>13</sup> a závěrů specializované komise IUPAC.) Dodnes bylo připraveno více izotopů transfermiových prvků navíc k těm, které jsou jako příklady uvedeny v tabulce.

Při zkoumání vlastností těchto prvků bylo zjištěno, že s rostoucím  $Z$  se snižují parciální poločasy jejich spontánního štěpení, jak je to znázorněno na obr. 4. Podobně se snižují



Obr. 4. Závislost poločasů spontánního  $T$  štěpení nejdéleobdobnějších izotopů prvků na protonovém čísle  $Z$  (pro prvky se  $Z$  v rozmezí 94 až 109)

i poločasy jejich přeměn alfa a to ukazuje na jejich menší stabilitu, jak to ostatně vyplývá i z představ kapkového modelu jádra. Tato skutečnost je důležitá nejen z hlediska teoretických úvah, ale má to i určité praktické důsledky při přípravě a identifikaci těžkých a supertěžkých prvků. Znamená to, že u prvků se stále vyšším  $Z$  máme stále méně času k dispozici k provedení separace a identifikace nového prvku. Zatímco v oblasti prvních transfermiových prvků při tom lze využít ještě různých rychlých chemických reakcí ke stanovení jejich vlastností, v oblasti supertěžkých prvků, kde poločasy rozpadu prvků jsou řádově v sekundách až desetinách milisekundy, jsou separace a identifikace proveditelné jen fyzikálními postupy, které jsou blíže vysvětleny v dalších odstavcích. Chemické techniky separace a identifikace stopových množství (často jen desítky nebo stovky atomů) nových prvků daly vznik speciální vědní oblasti, o jejíž rozvoj se zasloužil zejména I. Zvara<sup>10</sup>. Informace o nich lze získat v souborné práci<sup>11</sup>. Jako příklad uveďme pionýrské studie chemických vlastností rutherfordia, které ukázaly, že se tento prvek chová jako transaktinid (má podobné vlastnosti jako zirkonium a hafnium) a patří do 4. skupiny periodické tabulky (viz obr. 3, aktinidová řada končí u lawrencia). U seaborgia, jehož izotopy 265 a 266 mají sekundové poločasy, bylo možno pomocí chemických postupů dokázat, že tento prvek je hexavalentní a řadí se do 6. skupiny periodické soustavy. Předpokládá se, že prvky 106 až 112 doplňují přechodovou řadu 6d a zařazují se do skupin 6 až 12 periodické soustavy jako homology prvků W až Hg.

## 5. Ke břehům ostrůvku stability

Jaderné reakce vedoucí ke vzniku další skupiny nových těžkých prvků, založené na bombardování poměrně lehkými jádry, se označují jako „horká fúze“, protože při nich vznikají produkty (složená jádra) se značnou vnitřní excitací (kolem 50 MeV) a deexcitují emisí několika neutronů, což nežádoucím způsobem ubírá na hmotnosti posléze vytvořeného jádra.

V roce 1975 upozornil Oganessian se spolupracovníky<sup>12</sup> na to, že nežádoucí excitaci při fúzních reakcích lze omezit, když se jako terčového jádra použije dvojnásobně magického  $^{208}\text{Pb}$  (nebo sousedního  $^{209}\text{Bi}$ ) a jako střel středně těžkých jader (např.  $^{50}\text{Ti}$  nebo  $^{54}\text{Cr}$ ) a energie se volí tak, aby právě jen dostatočovala k překonání fúzní bariéry. K určité excitaci zde sice nutně rovněž dochází, ale ta je výrazně nižší (méně než 20 MeV) než v případě horké fúze a k deexcitaci stačí emise jediného neutronu. Tento typ reakce se označuje jako „studená fúze“. To co zbytek z fúzního produktu po deexcitačním vypaření neutronu (nukleonů) se označuje jako odparkový zbytek (EVR, evaporation residue) a v tomto případě zachovává vysokou hmotnost<sup>13,14</sup>.

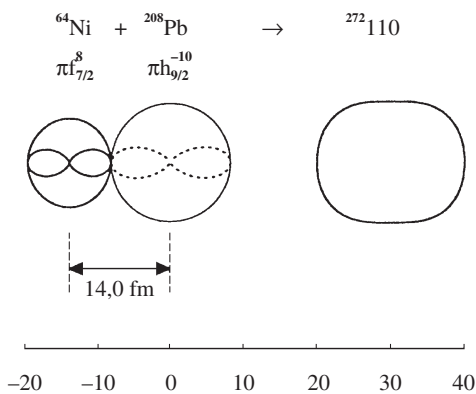
Této cesty úspěšně využili pracovníci GSI (Gesellschaft für Schwerionenforschung) a v poměrně krátké době (1981–86) se jim podařilo připravit postupně šest dalších prvků, jejichž protonová čísla se již blížila magickému číslu  $Z = 114$  (cit.<sup>15–20</sup>).

Příprava supertěžkých prvků cestou studené fúze těžkých jader má určité výhody u syntézy jader s  $Z$  větším než 106. Popišme nyní stručně, jak probíhá např. fúze terčového jádra  $^{208}\text{Pb}$  s jádrem střely  $^{64}\text{Ni}$ , znázorněná na obr. 5. Při vzájemném přibližování obě jádra nejprve překonávají vzájemné odpuzování a pronikají fúzní bariérou, danou tzv. Bassovým poten-

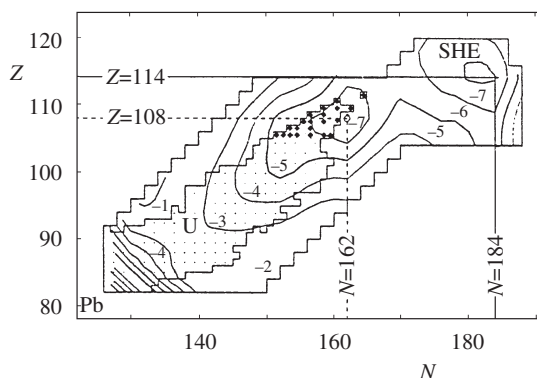
ciálem<sup>21</sup>, který lze odvodit z představ kapkového modelu jádra. V další fázi pak obě jádra postupně splývají při zachování struktury terčového jádra  $^{208}\text{Pb}$  a konečně po deexcitaci emisí neutronu vzniká jádro–produkt, kterému v následném rozpadu brání jeho štěpná bariéra. To je rozložení potenciálu bránícího podle kapkového modelu kritickému protažení jádra a jeho transformaci na (obvykle dvě) menší jádra. Pro vznik supertěžkého složeného jádra je kritický okamžik, kdy se při vzájemné srážce obě jádra dotknou a kdy dochází k přesunu nukleonů (nebo jejich párů) mezi orbity obou partnerů. V uvedeném příkladu fúze jader je tato vzdálenost 14 femtometrů, protonová podslupka v jádru olova  $h_{11/2}$  je obsazena a protony přecházejí z obsazeného orbitu  $f_{7/2}$  niklu do volné orbity podslupky  $h_{9/2}$  olova a vzniká deformovaný fúzní produkt  $^{272}110$ , který má excitační energii pouze 10,2 MeV.

Na výsledné stabilitě jádra se podílí různé faktory. V oblasti prvků se  $Z$  mezi 80 a 90 např. spontánní štěpení není významnou složkou rozpadu a teprve u  $Z$  vyšších než 90 se stává výraznou formou rozpadu. To souvisí s relativním snížením štěpné bariéry podle představ kapkového modelu jádra. U jader se  $Z$  vyšším než 100 se konečně začínají uplatňovat i slupkové korekce, které zde jsou srovnatelné s výškou štěpné bariéry. V oblasti supertěžkých prvků (které jsou právě tímto definovány) o stabilitě plně rozhodují slupkové korekce a to jak v případech deformovaných, tak kulově symetrických jader.

Podívejme se ještě jednou na vrstevnicovou mapu slup-



Obr. 5. Fáze přiblížení jader při kterém nastává mezi nimi přesun nukleonů a vzniká deformované složené jádro supertěžkého prvku 110



Obr. 6. Pomocí vrstevnic se stejnou úrovní slupkových korekčních energií (v MeV) znázorněná „krajina“ v oblasti velmi těžkých a supertěžkých nuklidů

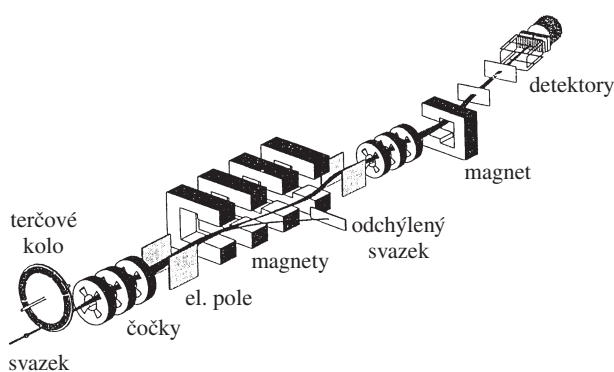
kových korekcí těžkých a supertěžkých jader<sup>22</sup> znázorněnou na obr. 6. Zde se nám zleva jeví obraz mírně se svažující krajiny, která přechází do dvou plochých rybníčků (to je obrácený obraz ostrůvků stability). Jejich středy odpovídají pro deformovaná jádra zhruba souřadnicím  $Z = 108$  a  $N = 162$  a pro jádra kulově symetrická  $Z = 114$  a  $N = 184$ . Za zmínku stojí připomenout, že vazebná energie např. olova je z důvodu slupkové korekce o 11 MeV větší než jakou bychom očekávali u nestrukturované kapičky jaderného materiálu se stejným počtem protonů a neutronů.

K tomu, aby bylo možné prokázat vznik nového prvku, je třeba ovšem připravit alespoň několik jeho atomů, takže závažná je i otázka výtěžku příslušné produkční jaderné reakce, který závisí především na jejím účinném průřezu. Obecně jsou produkční účinné průřezy vzniku supertěžkých jader horkou i studenou fúzí velmi nízké – řádu nano (nb) až pikobarnu (pb), ( $1 \text{ barn} = 10^{-28} \text{ cm}^2$ ). Pro vznik jader se  $Z$  kolem 106 jsou účinné průřezy horkých fuzních reakcí o více než jeden řád nižší než u studených fúzí, ale i zde klesají účinné průřezy při zvýšení  $Z$  o jednotku o součinitel 5. Excitační funkce těchto reakcí (závislosti účinných průřezů na energii) jsou velmi úzké a proto je nastavení energie střel velmi kritické.

## 6. Technika přípravy a průkazu supertěžkých prvků

Již jsme naznačili, že k úspěšné syntéze supertěžkých prvků je třeba nejen vybrat nejvhodnější reakční cestu, ale splnit řadu náročných experimentálních podmínek. K realizaci ať již horké nebo studené fúze jader je zapotřebí urychlovače, který poskytuje svazky střel (izotopicky separovaná jádra) středně těžkých prvků s energií 200 až 450 MeV a tokem částic řádově  $10^{12}$  za sekundu. Při tom je třeba, aby energie částic byla ostře vymezena a na zvolené energii udržovaná ve stabilním režimu po dobu až několika týdnů. Takovými urychlovači jsou vybaveny jen některé laboratoře a tak pouze několik málo týmů (uvedených např. na konci tab. I) může rozvíjet práce v tomto směru. K těmto pracím lze využívat jak urychlovačů lineárního tak kruhového (cyklotronového) typu.

Další kritickou součástí zařízení je oblast terčového ohniska, odkud je třeba nově vytvořené atomy vyčlenit k provedení přímých měření fyzikálních nebo chemických charakteristik, což přímo v ohnisku není možné. Transport těchto atomů



Obr. 7. Zařízení pro separaci a identifikaci supertěžkých prvků SHIP 94

z terčové oblasti lze uskutečnit například mechanicky, nebo k tomu lze využít vlastní kinetické energie, se kterou tyto atomy vznikají.

Příkladem prvního způsobu je technika heliové trysky, kde atomy nově vytvořených prvků vznikají ve velmi tenkém terčíku a když ho s vlastní kinetickou energií opustí, jsou zabrzděny v plynném heliu a jeho proudem odnášeny dlouhou trubicí a konečně deponovány na povrchu otočného kola. Takto separovaná aktivita se po určité době přesune pod polovodičové detektory a zde se změří energie jimi emitovaných paprsků alfa nebo štěpných trosk.

Poněkud odlišná je technika rotujícího kola, při které je tenká vrstva terčového materiálu nanášena na plášťovém povrchu rotujícího válce, na nějž v určitém místě tangenciálně dopadá svazek střel. Při otáčení válce jsou v terčové oblasti vytvořené nové atomy velmi rychle přenášeny do blízkosti stopových detektorů (slídové destičky), ve kterých se registují štěpné stopy vyzářené při rychle probíhajícím spontánním štěpení. Výhodou této techniky je vysoká účinnost registrace stop (poměr počtu zaznamenaných stop k počtu částic vyzářených), nevýhodou je, že se nezískají informace o energii vyzářovaných částic alfa.

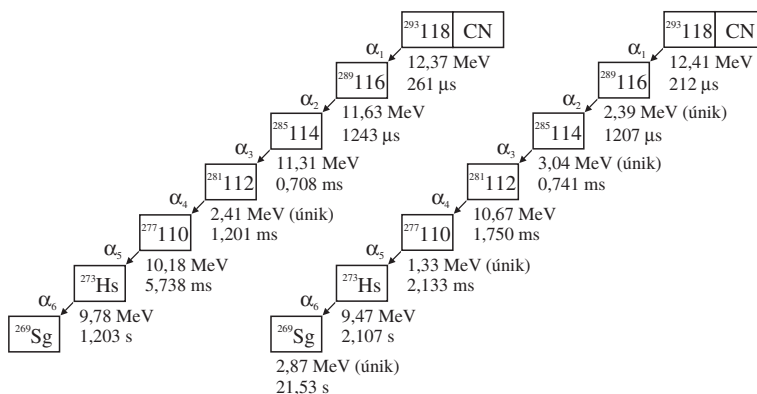
V poslední době se nejvíce používá zařízení, ve kterých se k oddělení nově vytvořených jader od ostatních parazitních produktů jaderných reakcí a terčíkem prolétlých střel využívá jejich vlastní kinetické energie, se kterou opouštějí terčík. To se uskutečňuje ve vakuových neb plynem při nízkém tlaku plněných komorách pomocí elektrických neb magnetických separátorů. Jako příklad je na obr. 7 znázorněno zařízení SHIP (Separator for Heavy Ion Reaction Products) zkonstruovaného v laboratoři GSI v Darmstadtu, kterého bylo v postupně zdokonalované formě použito při objevu prvků 107 až 112.

Svazek urychlených iontů (střel) zde dopadá ve vakuu na rotující terčík tvořený uhlíkovou folií  $50 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ , na níž je nanášena tenká vrstva terčového materiálu, např. olova. Zde vzniklá supertěžká jádra jsou od ostatních reakčních produktů a svazku střel, které prolétly terčíkem, oddělena za letu pomocí elektrického a magnetického rychlostního filtru. Částice odpovídající hmotnostními a rychlostními charakteristikami supertěžkým prvkům jsou pak zavedeny do vlastní analytické části přístroje.

V této části zařízení částice nejprve prolétnou dvěma spektrometry, kde na základě doby průletu je stanovena přesně jejich energie a dopadají pak na povrch polovodičového křemíkového detektoru, do kterého se naimplantují. Tyto (pozičně citlivé) detektory mají speciální dělenou strukturu, pomocí níž lze určit do které části jádro dopadlo a ovšem i přesnou dobu a energii s níž se implantace uskutečnila. Emise částic alfa a příp. štěpných trosk z oblasti jednotlivých naimplantovaných nových atomů je pak energeticky i časově analyzována pomocí další soustavy křemíkových detektorů a pomocí germaniových detektorů měřena i energie průvodného záření gama a rentgenového.

## 7. Prvky 114, 116, 118

Rok 1999 byl velmi bohatý na přírůstky do rodiny supertěžkých prvků a přinesl i některá překvapení. V lednu tohoto roku oznámili pracovníci z Dubny, že se jim podařilo ve spolupráci s livermorským pracovištěm prokázat vznik



Obr. 8. Sekvence rozpadů alfa u dvou uměle vytvořených jader prvku 118 (únik značí, že pouze část energie částice alfa se zaznamenala v detektoru, CN značí složené jádro)

zatím jediného atomu prvku 114. Při těchto experimentech nebylo použito klasického schématu studené fúze, ale jako terčovými jader aktinidu  $^{244}\text{Pu}$  a jako střely poměrně lehkého  $^{48}\text{Ca}$ . Záznamy z detektorů, které monitorovaly tento experiment, byly interpretovány jako vznik atomu prvku  $^{289}\text{114}$ , který po době života asi 30 s prodělal postupně sekvenci tří rozpadů alfa a spontánního štěpení. Bohužel při tom atom procházel transformací přes dosud neznámé nuklidy, takže objev prvku 114 bude třeba verifikovat vytvořením dalších atomů. Doba života 30 s naznačuje zvýšenou stabilitu i když u zástupců ostrůvku stability byly očekávány doby života výrazně delší.

Bylo-li oznámení o objevu prvku 114 tímto typem syntézy určitým překvapením, tím větší pozornost vyvolala koncem července 1999 zpráva, že se berkeleyjské skupině podařilo vytvořit podle klasického schématu studené fúze tři atomy prvku 118. Podle dosavadních zkušeností s touto reakcí (snížení účinného průřezu s rostoucím  $Z$ ) sotva bylo možno očekávat, že by tento prvek vznikl s účinným průřezem vyšším než 0,01 pikobarnu a sotva by byl na stávajících zařízeních zjištělný. Smolanczuk<sup>25</sup>, pracující s berkeleyjskou skupinou však upozornil na to, že by při použití dvojnásobně magických terčovými jader  $^{208}\text{Pb}$  bombardovaných svazkem 455 MeV střel tvořených magickým  $^{86}\text{Kr}$ , (dosud nejtěžším jádrem použitým jako střely) se teoreticky daly očekávat výrazně zvýšené účinné průřezy pro vznik prvku 118. Berkeleyjská skupina tedy využila právě dokončeného plynem plněného separátoru iontů (nutného k oddělení nově vytvářených atomů od ostatních částic) k experimentu, kdy po jedenáct dnů bombardovali terčík olova kryptonovými ionty z 88 palcového cyklotronu a v záznamech detektorů, do kterých se eluzivní jádra implantovala, pátrali po signálech, které by mohly odpovídat 118 prvku. Našli tři takové případy vzniku  $^{293}\text{118}$  a všechny tyto atomy se během velmi krátké doby sekvencí šesti přeměn alfa postupně transformovaly až na  $^{269}\text{Sg}$  (viz obr. 8). Nutně během této sekvence muselo dojít k vytvoření i dalšího supertěžkého prvku 116 a to izotopu  $^{289}\text{116}$ . Z počtu vytvořených atomů a podmínek při bombardování se dalo odvodit, že produkční účinný průřez vzniku prvku 118 reakcí uvedenou v poslední řádce tab. I byl 2,2 (+2,6–0,8) pikobarn, což bylo sice méně, než předpovídal Smolanczuk<sup>25</sup>, ale více než hodnota, na kterou ukazovala pesimistická extrapolace.

I když se tedy již podařilo vytvořit prvky s protonovými čísly odpovídajícími poloze předpokládaného ostrůvku stability, nemají dosud přípravné izotopy nijak výrazně dlouhé poločasy. To je zřejmě dáno tím, že jejich neutronová čísla jsou nízká (až o 8 jednotek u izotopu  $^{289}\text{114}$ ) oproti příslušnému neutronovému magickému číslu  $N = 184$ . K tomu aby se podařilo vytvořit izotopy ležící blíže středu ostrůvku stability by bylo třeba použít jako reakčních partnerů (tedy terčíku a střely) jader více bohatých na neutrony. Taková jádra existují, ale jsou radioaktivní. Tak například místo dlouhodobého  $^{244}\text{Pu}$  by se dalo uvažovat o použití izotopu  $^{246}\text{Pu}$ , který však má poločas 11 dnů a jen velmi obtížně by se z něj realizoval terčík, který by vydržel několikátý denní bombardování. Podobně by z hlediska neutronové bohatosti bylo výhodné použít jako střel jader  $^{96}\text{Kr}$ , která mají však poločas jen několik sekund a realizovat z nich dostatečně vydatný svazek k bombardování je zatím technicky nemožné.

Čeho že se tedy v reálné době zatím můžeme dočkat? Především jistě bude v dalších laboratořích prověřována cesta použitá v Dubně k přípravě prvku 114. V Berkeley se chystají svazkem  $^{86}\text{Kr}$  bombardovat místo olova blízké jádro  $^{209}\text{Bi}$ , což by mělo vést ke vzniku prvku 119. Ke stejnému prvku by měla vést studená fúze jader  $^{208}\text{Pb}$  s jádrem  $^{87}\text{Rb}$ . Bude se patrně hledat i odpověď na otázku, zda střed ostrůvku stability leží u  $Z = 114$ , nebo spíše u  $Z = 120$ , nebo dokonce až u  $Z = 126$ .

## LITERATURA

Seznam odborné literatury citované v informativním článku předkládaného rozsahu a záběru může pochopitelně být jen velmi omezený. Pokusili jsme se do něj zahrnout alespoň nejdůležitější knižní práce o jaderné stabilitě, dále pak základní přehledné články o metodách přípravy umělých transuranových a supertěžkých prvků a konečně i základní práce o způsobech identifikace nejtěžších prvků, které se dosud podařilo připravit. Citovaná literatura by měla být užitečným vodítkem pro další podrobnější studium.

1. Seaborg G. T., Loveland W.: *The Elements Beyond Uranium*. Wiley, New York 1990. Katz J. J., Seaborg G. T., Morss L. R.: *Chemistry of the Actinide Elements*. Chapman and Hall, London 1986.
2. Jech Č.: Chem. Listy 66, 785 (1972).
3. Mueller A. C., Sherill B. M.: Annu. Rev. Nucl. Part. Sci. 43, 529 (1993).

4. Goppert-Mayer M., Jensen J. H. D.: *Elementary Theory of Nuclear Shell Structure*. Wiley, New York 1955.
5. Strutinsky V. M.: Nucl. Phys. A 95, 420 (1967).
6. Wapstra A. H., Audi G.: Nucl. Phys. A 431, 1 (1985).
7. Myers W. D., Swiatecky W. J.: Nucl. Phys. 81, 1 (1966).
8. Armbruster P.: Annu. Rev. Nucl. Part. Sci. 43, 135 (1985).
9. Münzenberg G.: Rep. Prog. Phys. 51, 57 (1988).
10. Zvara I., Chuburkov Yu. T., Caletka R., Zvarova T. S., Shalaevsky M. R., Shilov B. V.: At. Energ. 21, 8 (1966); J. Nucl. Energ. 21, 60 (1966).
11. Schädel M.: Radiochim. Acta 70/71, 207 (1995).
12. Oganessian Yu. T., Iljinov A. S., Demin A. G., Tretyakova S. P.: Nucl. Phys. A 239, 353 (1975).
13. Hofmann S.: Rep. Prog. Phys. 61, 639 (1998).
14. Armbruster P.: Rep. Prog. Phys. 62, 465 (1999).
15. Münzenberg G., Hofmann S., Hessberger F. P., Reisdorf W., Schmidt K. H., Schneider J. H. R., Armbruster P., Sahm C. C., Thuma B.: Z. Phys. A 300, 107 (1981).
16. Münzenberg G., Armbruster P., Folger H., Hessberger F. P., Hofmann S., Keller J., Poppensieker K., Reisdorf W., Schmidt K. H., Schött H. J., Leino M. E., Hingmann R.: Z. Phys. A 309, 89 (1982).
17. Münzenberg G., Reisdorf W., Hofmann S., Agarwal Y. K., Hessberger F. P., Poppensieker K., Schneider J. R. H., Schneider W. F. W., Schmidt K. H., Schött H. J., Armbruster P., Sahm C. C., Vermeulen D.: Z. Phys. A 317, 145 (1984).
18. Hofmann S., Ninov V., Hessberger F. P., Armbruster P., Folger H., Münzenberg G., Schött H. J., Popeko A. G., Yeremin A. V., Andreyev A. N., Šáro S., Janík R., Leino M.: Z. Phys. A 350, 277 (1995).
19. Hofmann S., Ninov V., Hessberger F. P., Armbruster P., Folger H., Münzenberg G., Schött H. J., Popeko A. G., Yeremin A. V., Andreyev A. N., Šáro S., Janík R., Leino M.: Z. Phys. A 350, 281 (1995).
20. Hofmann S., Ninov V., Hessberger F. P., Armbruster P., Folger H., Münzenberg G., Schött H. J., Popeko A. G., Yeremin A. V., Šáro S., Janík R., Leino M.: Z. Phys. A 354, 229 (1996).
21. Bass R.: Nucl. Phys. A 231, 45 (1974).
22. Smolanczuk R., Skalski J., Sobiczewski A.: Phys. Rev. C 52, 1871 (1995).
23. Oganessian Yu. Ts., Yeremin A. V., Popeko A. G., Bogomolov S. L., Buklanov G. V., Chelnokov M. L., Chepigin V. I., Gikal B. N., Gorshkov. M. L., Gulbekian G. G., Itkis M. G., Kabachenko A. P., Lavrentev A. Yu., Malyshev O. N., Rohac J., Sagaidak R. N., Hofman S., Šáro S., Giardina G., Morital K.: Nature 400, 242 (1999).
24. Ninov V., Gregorich K. E., Loveland W., Ghiorso A., Hoffman D. C., Lee D. M., Nitsche H., Swiatecki W. J., Kirbach U. W., Laue C. A., Adams J. L., Patin J. B., Shaughnessy D. A., Strellis D. A., Wilk P. A.: <http://user88.lbl.gov/e118/paper.html>.
25. Smolanczuk R.: Phys. Rev. C 59, 2634 (1999).

**Č. Jech** (*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Preparation and Stability of Superheavy Elements**

A brief review is presented of the recent achievements in the field of production and identification of superheavy elements up to  $Z = 118$ . Possible reaction paths leading to the synthesis of the nuclei in the vicinity of the island of relatively stable nuclei are discussed.

# PREHĽAD VYUŽITIA NEIÓNOVÝCH TENZIDOV PRI ÚPRAVE VZORIEK PRE ENVIRONMENTÁLNU ANALÝZU ORGANICKÝCH POLUTANTOV

RADOSLAV HALKO a MILAN HUTTA

*Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina CH – 2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: halko@fns.uniba.sk, hutta@fns.uniba.sk*

Došlo dňa 15.XI.1999

Kľúčové slová: environmentálna analýza, neiónové tenszidy, extrakcia, teplota zákalu micelárnych roztokov, organické polutanty

## Obsah

1. Úvod
2. Extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE)
3. CPE organických polutantov
4. Záver

## 1. Úvod

Vlastnosti micelárnych systémov v posledných rokoch našli uplatnenie v analytickej chémii na zlepšenie alebo navrhnutie nových metód analýzy.

Vďaka mikroheterogenite štruktúry, micelotvorné roztoky interagujú selektívnym spôsobom s molekulami rozdielnych vlastností. Ich veľká schopnosť skoncentrovať širokú škálu analytov v micelách, rýchle ustálenie distribučnej rovnováhy a zlepšenie analytických parametrov detekcie výrazne zvyšuje citlivosť a selektivitu analytického stanovenia<sup>1</sup>.

Jednou z charakteristických vlastností a veľkou prednosťou micelárnych systémov je ich solubilizačná schopnosť, ktorá umožňuje rozpustiť aj látky vo vode nerozpustné, čo je využiteľné pre priame dávkovanie komplexných vzoriek do hydrodynamických systémov, napríklad: vysokoučinnnej kvapalinovej chromatografie<sup>2</sup> (HPLC), micelárnej elektrokinetickej chromatografie<sup>3</sup> (MEKC) a prietokovej injekčnej analýzy<sup>4</sup> (FIA).

V biologickej a biochemickej laboratórnej praxi sa už ustálilo používanie tenszidov na solubilizáciu biologických membrán a pre rozpúšťanie membránových zložiek<sup>5-11</sup>.

V posledných rokoch poskytli micelotvorné systémy, vďaka svojej solubilizačnej schopnosti, nové alternatívne možnosti uplatnenia sa ako náhrada za vodno-organické rozpúšťadlá používané na izoláciu a skoncentrovanie analytov zo vzoriek životného prostredia. Ich využitie v analytickej chémii zahŕňa širokú škálu aplikácií od extrakcie iónov kovov vo forme chelátov kovov<sup>12-20</sup>, až po skoncentrovanie organických polu-

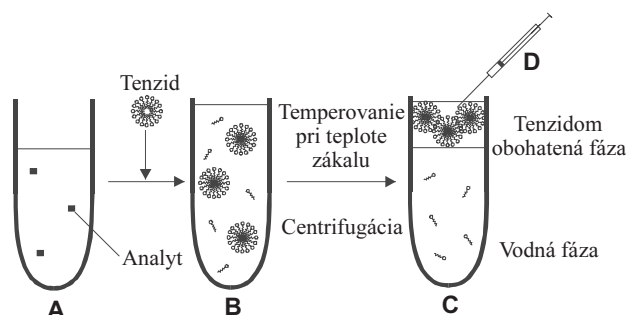
tantov z environmentálnych vzoriek (ako je to uvedené v ďalšom prehľade).

Povrchovo aktívne látky (tenszidy) sú netoxické, neprchavé, nehorľavé a menej nebezpečné ako konvenčné organické rozpúšťadlá. Použitie tenszidov s vlastnosťami blízky prírodným materiálom napomáha tiež riešiť problém s odpadmi ich jednoduchou a ľahkou biodegradáciou<sup>21</sup>. Výhody a nevýhody použitia micelotvorných systémov v rôznych oblastiach analytickej chémie boli popísané viacerými autormi<sup>22-24</sup>.

## 2. Extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (CPE)

Separácia a skoncentrovanie analytov zo vzoriek pred samotným stanovením je nepostrádateľným krokom environmentálnej stopovej analýzy. Na úpravu vzoriek pred analýzou sa najčastejšie používajú extrakcia v systéme kvapalina–kvapalina a extrakcia v systéme tuhá fáza–kvapalina (SPE).

V posledných rokoch sú častejšie ako predtým publikované práce, ktoré popisujú využívanie micelárnych roztokov tvorených z jedného alebo zmesi neutrálnych tenszidov (neiónových<sup>25</sup> resp. amfotérnych<sup>26</sup>) na izoláciu a skoncentrovanie analytov zo vzoriek<sup>27-29</sup>. Najčastejšie používanou metódou je extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov (Cloud-Point Extraction – CPE)<sup>30</sup>; kde micelárny izotropný roztok, zahrievaný nad určitú teplotu, ktorá je charakteristická pre každý tenszid, sa zrazu stáva zakaleným následkom preskupenia micelotvorných zložiek a vzniku ďalšej fázy. Príčina tohto javu je v spôsobe interakcie vody, napríklad s polyetylén glykoléterovými skupinami neiónových tenszidov<sup>31</sup> alebo iónovými skupinami amfotérnych tenszidov<sup>32</sup>. Po vzniku dvoch fáz a po určitej dobe, ktorá sa môže skrátiť centrifugáciou, sú získané dve vodné fázy: jedna obohatená tenszidom a druhá fáza obsahujúca koncentráciu tenszidu nižšiu ako kritická koncentrácia vzniku micel (CMC)<sup>30</sup>. Experimentálna schéma CPE je znázornená na obr. 1. Odlíšna selektivita,



Obr. 1. Experimentálna schéma CPE: A – vodný roztok obsahujúci analyty; B – vodný micelárny roztok, v ktorom sú analyty solubilizované neiónovým tenszidom; C – separácia a vznik dvoch fáz; D – odobratie skoncentrovaných analytov z fázy obohatenej tenszidom. Poznámka: aktuálne rozvrstvenie micelárnych fáz závisí od konkrétnych experimentálnych podmienok

ako pri extrakcii v systéme kvapalina–kvapalina a jednoduchá manipulácia s teplotou dovoľuje rýchlo získať dve fázy. Zložky vzorky vrátane analytov sa podľa svojich vlastností a chemickej štruktúry distribuuju prednostne do jednej alebo druhej micelárnej fázy s koncentračným faktorom porovnateľným s extrakciou v systéme kvapalina–kvapalina<sup>33</sup>. Napríklad pri použití neiónogénnych tenzidov sa obyčajne nepolárne a málo polárne analyty koncentrujú vo fáze obohatenej tenzidom.

Tabuľka I

Základné charakteristiky najpoužívanejších neiónových tenzidov pre CPE

Tenzid	Teplota zákalu [°C]	CMC [mmol.l <sup>-1</sup> ]	Lit.
Triton X-100	64–65	0,17–0,30	55,56,57
Triton X-114	23–25	0,2–0,35	57,58
PONPE-7,5	5–20	0,085	59
PONPE-10	62–65	0,07–0,085	60
Genapol X-080	42	0,05	29
C <sub>8</sub> E <sub>3</sub>	10,6	5,9–7,5	61,62,63
C <sub>10</sub> E <sub>4</sub>	19–21	0,6–0,8	62
C <sub>12</sub> E <sub>4</sub> (Brij-30)	2–7	0,02–0,06	56,62,64
C <sub>14</sub> E <sub>6</sub>	35–42	0,01	10
Igepal CO-630	48–52	–	12

Tabuľka II

Príklady použitia CPE pri úprave vzoriek pre environmentálnu analýzu organických polutantov

Extrahované zlučiny	Matrica	Použitý tenzid a podmienky	Poznámky	Lit.
PCB	voda	Triton X-100, 71 °C; GC–ECD <sup>a</sup>	%R = 94–116	37
PAH	voda a drevo	Triton X-114, 40 °C; HPLC-F	K <sub>f</sub> = 15–70	47
PAH, PCDD <sup>b</sup>	ľudské sérum	Triton X-100, 50 °C; HPLC-UV	%R = 94–100 %R = 100 (PAH) %R = 85–98 (PCDD)	48
PAH, ftaláty a PCDD <sup>b</sup>	ľudské sérum	Genapol X-080 46 °C/CEC-UV		52
Organofosforové pesticídy	riečna voda	Triton X-114, 40 °C; HPLC-ED	K <sub>f</sub> = 40 %R = 85–100	42,43
Napropamid (NP), Thiabendazol (TB)	vodný roztok a pôda	Genapol X-080, 75 °C; F	K <sub>f</sub> = 56 (NP), 17 (TB); %R = 76 (NP), 22 (TB)	39,40
Fungicídy	riečna voda	Triton X-114, 40 °C; HPLC – ED	K <sub>f</sub> = 75; %R ≥ 75	41
Triazínové herbicídy	voda	Triton X-114, 40 °C; CE – UV	K <sub>f</sub> = 7–42; %R = 93–106	51
Fulvo a humínové kyseliny	riečna voda	Triton X-100, 90 °C; IP – HPLC-UV	K <sub>f</sub> = 13,5; %R = 78	46
Atrazín	vodný roztok	Triton X-100, 72,5 °C; ELISA <sup>c</sup>	K <sub>f</sub> = 42,1	53
Chlorofenoly (CF), 4-chloroanilín (CA)	vodný roztok	C <sub>8</sub> E <sub>3</sub> , 55 °C (CF) C <sub>8</sub> E <sub>3</sub> , 36 °C (CA); HPLC-UV	K <sub>f</sub> = 20–50; %R = 87,1–99,9 (CF) %R = 70 (CA)	33
Hydroxyaromáty	farby	Triton X-114, 40 °C; HPLC-UV	%R = 86–106	54

<sup>a</sup> ECD – detektor elektrónového záchytu, <sup>b</sup> PCDD – polychlorované dibenzo-*p*-dioxíny, <sup>c</sup> ELISA – analýza s enzýmom naviazaným na immunosorbent, tj. protilátku

Základné charakteristiky najpoužívanejších neiónových tenzidov pre CPE sú uvedené v tabuľke I.

Na veľkosť koncentračného faktora ( $K_f$ ) a extračný výťažok ( $R$ ) CPE pri použití neiónových tenzidov má vplyv:

- dĺžka alkylového reťazca neiónového tenzidu,
- prítomnosť aromatickej skupiny (fenylénová skupina a pod.),
- počet jeho etylénoxidových jednotiek,
- koncentrácia tenzidu,
- prídavok solí (napr. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl a pod.) resp. organického modifikátora (napr. etanol),
- trvanie ustaľovania rovnováhy,
- ďalšie (napr. teplota a kombinácie už uvedených faktorov).

V praxi je preto potrebné optimalizovať jednotlivé premenné s ohľadom na požadované parametre úpravy vzorky a vlastnosti matrice<sup>32,34,35</sup>.

### 3. CPE organických polutantov

CPE metóda sa dá aplikovať na izoláciu a skoncentrovanie biologických vzoriek (bioseparácia, solubilizácia membrán), iónov kovov a organických polutantov (pesticídy, aromatické uhľovodíky, fenoly a pod.)<sup>32,36</sup>. Úspešnosť CPE je porovnateľná, a v niektorých prípadoch aj lepšia ako pri konvenčnej extrakcii v systéme kvapalina–kvapalina aj kvôli častokrát vyššej citlivosti detekcie (fluorimetrickej, potenciometrickej a pod.) analytov nachádzajúcich sa priamo vo fáze obohatenej tenzidom<sup>32</sup>.

Extrakčný systém CPE je zložený zo systému vodnej fázy obsahujúcej nízku koncentráciu rozpusteného tenzidu a vysoko hydratovanej tenzidom obohatenej fázy, preto sú podmienky úplnej nemiešateľnosti týchto dvoch fáz splnené len zriedka. Hodnoty rozdeľovacích koeficientov lipofilných látok v micelárnych roztokoch sú obyčajne nižšie ako pri tradičných vodno-organických rozpúšťadlových systémoch. CPE je efektívnejšia pre roztoky neiónových látok. Extrahované môžu byť tiež iónové a iónogénne hydrofóbne zlúčeniny<sup>35</sup>.

Vybrané príklady použitia CPE pri úprave organických polutantov (fungicidy, pesticidy, aromatické amíny atď.) sú uvedené v tabuľke II.

CPE aplikovaná pri analýze polychlórovaných bifenylov (PCB) vo vzorkách odpadových vôd umožnila zvýšiť extrakčný výťažok na dvojnásobok oproti extrakcii v systéme kvapalina–kvapalina. Pre odpadovú vodu sa výťažky pre jednotlivé izoméry PCB pri CPE pohybovali v rozmedzí 81 % až 103 %, zatiaľ čo pri použití extrakcie hexánom sa pohybovali v rozmedzí 32 % až 51 %. Naproti tomu CPE a extrakcia ultračistej vody so štandardným prídavkom PCB hexánom poskytovali porovnateľné extrakčné výťažky 94 % až 116 %. Navyše emulzia, ktorej tvorba bola často pozorovaná počas extrakcie v systéme kvapalina–kvapalina, sa pri použití CPE nevytvárala<sup>37</sup>. Vysoké extrakčné výťažky PCB (≈ 90 %) a koncentračný faktor (≈ 35) sa dosiahli aj pri použití CPE vodnej zorky pomocou tetraetylenglykol-monododecyléteru (Brij-30) a následnej analýze PCB metódou HPLC s fluorescečným detektorom<sup>38</sup>.

CPE je vhodná aj pri úprave vzoriek pre stanovovanie pesticídov, fungicídov a herbicídov<sup>39-45</sup>. Úspešne bol použitý Genapol X-080 pri extrahovaní napropamidu a thiabendazolu z vodnej a pôdnej matrice<sup>39,40</sup> a Triton X-114 pri izolácii a skoncentrovaní imidových fungicídov zo vzorky riečnej vody<sup>41</sup>, resp. skoncentrovaní organofosforových pesticídov s následným stanovením HPLC s elektrochemickou detekciou<sup>42-44</sup>.

Pomocou CPE boli úspešne extrahované fulvokyseliny resp. humínové kyseliny zo vzorky vody. Pri nízkom pH bola dosiahnutá extrakčná výťažnosť 80 % pre fulvokyseliny a 96 % pre humínové kyseliny pri koncentračnom faktore 13,5. Humínové látky boli stanovené ión-párovacou HPLC s fotometrickou detekciou v ultrafialovej oblasti spektra<sup>46</sup>.

Ďalšou zaujímavou aplikáciou je skladovanie vodných vzoriek pred analýzou v micelárnych roztokoch. Micelárne prostredie zabraňuje úbytku hydrofóbných organických analytov počas skladovania spôsobeného nižšou sorpciou na stenách používaných nádob resp. znížením interakcií s organickými zložkami (humínové látky) matric (pôdne sedimenty) a tak stúpa extrakčný výťažok analytov<sup>47,48</sup>. Pri použití vhodného neiónového tenzidu môžu byť tieto účinky priamo kombinované s CPE. Napríklad pri stanovení polyaromatických uhľovodíkov (PAH) s použitím Triton X-114 ako neiónového tenzidu boli dosiahnuté extrakčné výťažky PAH z roztoku humínových kyselín vyššie ako 97 % (cit.<sup>47</sup>).

CPE bola úspešne overená aj ako technika úpravy vzoriek životného prostredia pred ich analýzou takými separačnými technikami, ako sú HPLC<sup>49,50</sup>, kapilárna elektroforéza<sup>51</sup> (CE), kapilárna elektrochromatografia<sup>52</sup> (CEC) a plynová chromatografia<sup>37</sup> (GC). Veľkou výhodou CPE v tomto prípade je možnosť priameho dávkovania vzoriek do spomenutých systémov.

#### 4. Záver

CPE je sľubne rozvíjajúcou a atraktívnou technikou pre úpravu vzoriek životného prostredia v súčasnosti aplikovanou hlavne pri analýze nepolárnych ekotoxických analytov. Zvlášť príznačnými črtami je kompatibilita CPE s HPLC, CE, CEC, MEKC a GC umožňujúca v mnohých prípadoch priame a potenciálne aj veľkoobjemové dávkovanie. Do budúcnosti je možné očakávať kombinovanie prístupov CPE a SPE, ako aj využívanie selektívne funkcionalizovaných tenzidov pre účely úpravy komplexných matric a analýzy širokej škály analytov.

*Táto práca vznikla za finančnej podpory VEGA MŠ a SAV v rámci projektov č. 1/4198/97, č. 1/6222/99 a USA – Slovak Science and Technology Program Award No: 007–95.*

#### LITERATÚRA

- McIntire G. L.: *Anal. Chem.* 21, 257 (1990).
- Lu B., Koimur M., Westerlund D.: *Chromatographia* 46, 72 (1997).
- Kunkel A., Gunter S., Watzig H.: *Electrophoresis* 19, 1882 (1997).
- Hernandez-Torres M. A., Khaledi M. G., Dorsey J. G.: *Anal. Chim. Acta* 201, 67 (1987).
- Herman P., Hladík J., Sofrová D.: *Chem. Listy* 82, 157 (1988).
- Alred P. A., Kozlowski A., Harris J. M., Tjerneld F.: *J. Chromatogr. A* 659, 289 (1994).
- Liu Ch., Kamei D. T., King J. A., Wang D. I. C., Blank-schtein D.: *J. Chromatogr. B* 711, 127 (1998).
- Saitoh T., Hinze W. L.: *Talanta* 42, 119 (1995).
- Sánchez-Ferrer A., Pérez-Gilbert M., Núñez E., Bru R., García-Carmona F.: *J. Chromatogr. A* 668, 75 (1994).
- Schwarz A., Terstappen G. C., Futerman A. H.: *Anal. Biochem.* 254, 221 (1997).
- Horvath W. J., Huie C. W.: *Talanta* 40, 1385 (1993).
- Wang Ch., Martin D. F., Martin B. B.: *J. Environ. Sci. Health A31*, 1101 (1996).
- Silva M. F., Fernandez L., Olsina R. A., Stacchiola D.: *Anal. Chim. Acta* 342, 229 (1997).
- Akita S., Rovira M., Sastre A. M., Hyodo N., Takeuchi H.: *Proceeding of International Symposium on Liquid-Liquid Two Phase Flow and Transport Phenomena, Antalya, Turkey, 3–7 november 1997* (Maron D. M., ed.), str. 371. Begell House, New York 1997.
- Oliveros M. C. C., de Blas O. J., Pavón J. L. P., Cordero B. M.: *J. Anal. At. Spectrom.* 13, 547 (1998).
- Pinto C. G., Pávon J. L. P., Cordero B. M., Beato E. R., Sánchez S. G.: *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 37 (1996).
- Pávon J. L. P., Cordero B. M.: *Analyst* 117, 215 (1992).
- Laespada M. E. F., Pávon J. L. P., Cordero B. M.: *Analyst* 118, 209 (1993).
- Akita S., Rovira M., Sastre A. M., Takeuchi H.: *Separ. Sci. Technol.* 33, 2159 (1998).
- Okada T.: *Anal. Chem.* 64, 2138 (1992).
- Šmidrkal J.: *Chem. Listy* 93, 421 (1999).
- Hinze W. L., Armstrong D. W. (ed.): *Ordered Media in Chemical Separation*. American Chemical Society, Washington D. C. 1987.



23. Pelizzetti E., Pramauro E.: *Anal. Chim. Acta* 169, 1 (1985).
24. Cline-Love L. J., Habarta J. G., Dorsey J. G.: *Anal. Chem.* 56, 1132A (1984).
25. Schick M. J. (ed.): *Nonionic Surfactants*. Marcel Dekker, New York 1967.
26. Saitoh T., Hinze W. L.: *Anal. Chem.* 63, 2520 (1991).
27. Akita S., Takeuchi H.: *Sep. Sci. Technol.* 30, 833 (1995).
28. Akita S., Takeuchi H.: *Sep. Sci. Technol.* 31, 401 (1996).
29. Sirimanne S. R., Patterson Jr. D. G., Ma L., Justice Jr. J. B.: *J. Chromatogr. B* 716, 129 (1998).
30. Cordero B. M., Pavón J. L. P., Pinto C. G., Laespada E. F.: *Talanta* 40, 1703 (1993).
31. Blažej A.: *Tenzidy*. Alfa, Bratislava 1977.
32. Quina F. H., Hinze W. L.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 4150 (1999).
33. Tani H., Kamidate T., Watanabe H.: *J. Chromatogr. A* 780, 229 (1997).
34. Frankewich R. P., Hinze W. L.: *Anal. Chem.* 66, 944 (1994).
35. Pramauro E., Prevot A. B.: *Pure Appl. Chem.* 67, 551 (1995).
36. Hinze W. L., Pramauro E.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24, 133 (1996).
37. Froschl B., Stangl G., Niessner R.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 357, 743 (1997).
38. Fernández A. E., Ferrera Z. S., Rodríguez J. J. S.: *Anal. Chim. Acta* 358, 145 (1998).
39. Stangl G., Niessner R.: *Mikrochim. Acta* 113, 1 (1994).
40. Stangl G., Niessner R.: *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 58, 15 (1995).
41. Martínez R. C., Gonzalo E. R., Jiménez M. G. G., Pinto C. G., Pavón J. L. P., Méndez J. H.: *J. Chromatogr.* 754, 85 (1996).
42. Pinto C. G., Pavón J. L. P., Cordero B. M.: *Anal. Chem.* 67, 2606 (1995).
43. Cordero B. M., Pavón J. L. P., Pinto C. G., v knihe: *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation* (Meyers R. A., ed.), str. 3230. John Wiley, New York 1998.
44. Pinto C. G., Pavón J. L. P., Cordero B. M.: *Anal. Chem.* 64, 2334 (1992).
45. Evdokimov E., von Wandruszka R.: *Anal. Lett.* 31, 2289 (1998).
46. Revia R. L., Makharadze G. A.: *Talanta* 48, 409 (1999).
47. Pinto C. G., Pavón J. L. P., Cordero B. M.: *Anal. Chem.* 66, 874 (1994).
48. Sirimanne S. R., Barr J. R., Patterson D. G., Ma L.: *Anal. Chem.* 68, 1556 (1996).
49. Boyd-Boland S. S., Pawliszyn J. B.: *Anal. Chem.* 68, 1521 (1996).
50. Jin X., Zhu M., Conte E. D.: *Anal. Chem.* 71, 514 (1999).
51. Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Domínguez-Alvarez J., Hernández-Méndez J.: *Anal. Chem.* 71, 2468 (1999).
52. Sirimanne S. R., Barr J. R., Patterson Jr. D. G.: *J. Microcolumn Sep.* 11, 109 (1999).
53. Stangl G., Weller M. G., Niessner R.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 351, 301 (1995).
54. Wu Y. C., Huang S. D.: *Analyst* 123, 1535 (1998).
55. Ray A., Nemethy G.: *J. Phys. Chem.* 75, 809 (1971).
56. Van Ede J., Nijmeijer J. R. J., Welling-Wester S., Orvell C., Welling G. W.: *J. Chromatogr.* 476, 319 (1989).
57. Tragger D., Csordas A.: *Biochem. J.* 244, 605 (1987).
58. Sepulveda L., MacRitchie F.: *J. Colloid Interface Sci.* 28, 19 (1968).
59. Watanabe H., Tanaka H.: *Talanta* 25, 585 (1978).
60. Hsiao L., Dunning H. N., Lorenz P. B.: *J. Phys. Chem.* 60, 657 (1956).
61. Brackman J. C., van Os N. M., Engberts J. B. F. N.: *Langmuir.* 4, 1266 (1988).
62. Schubert K. V., Strey R., Kahlweit M.: *J. Colloid Interface Sci.* 141, 21 (1991).
63. Hinze W. L.: *Ann. Chim. (Paris)* 77, 167 (1987).
64. Rosen M. J., Cohen A. W., Dahanayake M., Hua X. Y.: *J. Phys. Chem.* 86, 541 (1982).

**R. Halko and M. Hutta** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Review on Utilization of Non-Ionic Tensides for Sample Pretreatment in Environmental Analysis of Organic Pollutants**

The article reviews recent developments and applications of the cloud-point extraction (CPE), a new promising and fast-developing technique of pretreatment of environmental samples. This approach has been recently used especially in the analysis of nonpolar to medium-polar ecotoxic analytes present in aqueous samples. CPE is mainly used for analysis of multicomponent residues in combination with high-performance separation techniques such as GC, HPLC, CE, CEC, and micellar electrokinetic chromatography.

# KONTROLA ENANTIOMERNÍ ČISTOTY LÉČIV

MILADA DOLEŽALOVÁ a MAGDA TKACZYKOVÁ

Státní ústav pro kontrolu léčiv, Šrobárova 48, 100 41 Praha 10, e-mail:dolezal@sukl.cz

Došlo dne 22.IX.1999

Klíčová slova: enantioselektivní HPLC, kapilární elektroforéza, levodopa, methylidopa, karbidopa

## Obsah

1. Úvod
2. Čistota léčiv
3. Stanovení enantiomerní čistoty
4. Kontrola enantiomerní čistoty levodopy, methylidopy a karbidopy jako ilustrativní příklad
  - 4.1. Lékopisné polarimetrické metody
  - 4.2. Enantioselektivní HPLC metody
  - 4.3. Enantioselektivní CE metody
  - 4.4. Srovnání metod
5. Závěr

## 1. Úvod

S chiralitou se setkáme u více než poloviny užívaných léčiv. Ze skupiny syntetických chirálních léčiv je více než 80 % léčiv vyráběno a předepisováno ve formě racemátů, tj. ekvimolárních směsí enantiomerů. Obvykle pouze jeden z izomerů vykazuje žádoucí terapeutické účinky a druhý musí být považován za tzv. izomerní balast. Nežádoucí izomery mohou interagovat s odlišnými receptory nebo enzymy a vést ke vzniku rozdílných metabolitů a nežádoucích vedlejších účinků či toxicitě léčiva nebo „pouze“ zatěžují organismus vstupem neaktivní látky.

Přestože existence stereoizomerie u chemických sloučenin byla poznána před více než 100 lety, v klinické farmakologii a toxikologii byla donedávna tématem zcela opomíjeným. Teprve v polovině 80. let začali odborníci uvažovat nejednotný charakter chirálních léčiv a na racemát léčiva, který je nejčastějším případem chirálního léčiva, pohlížet jako na směs dvou látek, které se v chirálním prostředí živých organismů chovají rozdílně<sup>1,2</sup>. Byla vyvolána široká diskuse o stereoselektivitě farmakokinetických a farmakodynamických vlastností léčiv a o nutnosti opustit ve farmakologických studiích nestereoselektivní analytické metody, které nedovedou rozlišovat mezi enantiomery<sup>1</sup>. Intenzivní diskuse vědců a farmaceutických výrobců se účastnily i lékové regulační agentury a začátkem 90. let formulovaly svá stanoviska k problematice „enantiomer vs. racemát“, orientovaná ve prospěch enantiomerně čistých léčiv<sup>3-5</sup>.

Stimulem pro studium farmakologických vlastností enan-

tiomerů chirálních léčiv a vývoj enantiomerně čistých léčiv byl současně i mohutný rozvoj technik syntézy a izolace enantiomerů a stereoselektivní analytické metodologie.

Pod vlivem striktní politiky lékových agentur roste v současné době počet léčiv vyvinutých a vyráběných ve formě čistých enantiomerů. U takových léčiv se nežádoucí enantiomery řadí mezi ostatní organické nečistoty léčiva a jako takové by měly být také limitovány a kontrolovány.

## 2. Čistota léčiv

Čistota není exaktním pojmem. Je vždy dána použitou analytickou technikou a je tedy závislá na dosaženém rozvoji analytické metodologie, přičemž absolutní čistoty nemůže být dosaženo. Všechna léčiva nutně obsahují nečistoty a čistota léčiv a farmaceutických přípravků je proto stále předmětem dalšího studia a nikdy nekončícího zlepšování zkoušek a zpřísňování kritérií.

Zaměříme-li se pouze na chemické nečistoty léčiv (opomíjeje např. mikrobiologickou čistotu), můžeme rozdělit nečistoty u léčiv a farmaceutických přípravků na nečistoty organické, anorganické a zbytková rozpouštědla. Organické nečistoty zahrnují látky obsažené již v materiálu použitém pro výrobu léčiva, látky vznikající jako vedlejší produkty nebo meziprodukty při výrobě a degradační produkty.

Mezi tyto organické nečistoty je nutno řadit i nežádoucí stereoizomery přítomné v enantiomerně čistých léčivech.

Přípustné hladiny organických nečistot v léčivech jsou dány především jejich toxicitou, dále dostupností a finanční nákladností syntézy léčiva, analytickými možnostmi a v neposlední řadě i způsobem a dobou užívání a maximálními denními dávkami léčiva. Nedávno přijatá mezinárodní harmonizační směrnice<sup>6</sup> požaduje, aby všechny nečistoty vyskytující se v množství nad 0,1 % byly identifikovány a limitovány a aby byla ověřena jejich biologická bezpečnost v toxikologických studiích. U zvláště toxických nebo farmakologicky účinných nečistot může být uvedený limit ještě nižší.

Enantiomerní nečistoty však byly z této směrnice vyňaty a pro jejich obsah zatím platí jen doporučení obsažené v novější směrnici pro specifikaci léčiv<sup>7</sup>, zabývající se souborem zkoušek, analytických postupů a vhodných kritérií u nových syntetických léčiv. V části o specifických zkouškách je doporučeno, aby se i k enantiomerním, případně diastereomerním nečistotám přistupovalo stejně jako k organickým nečistotám a jejich obsah byl limitován a kontrolován podle zásad směrnice pro nečistoty v léčivech<sup>6</sup>, pokud tomu nebrání technická omezení.

## 3. Stanovení enantiomerní čistoty

Klasickou metodou pro stanovení enantiomerních nečistot je polarimetrie neboli měření optické otáčivosti (v tomto případě můžeme pro čistotu použít termín optická čistota). Je to metoda univerzální a jednoduchá, ale zároveň málo selektivní a často nedostatečně citlivá a přesná, vyžaduje znalost specifické

optické otáčivosti čistého enantiomeru a nevýhodou může být i náročnost na množství vzorku potřebné pro stanovení.

Z neseparačních metod získává v poslední době na významu NMR spektroskopie, která je obecně metodou achirální a pro rozlišení enantiomerů využívá buď nepřímé metody s derivatizací chirálními činidly nebo metody přímé s chirálními solvatačními či posuvovými činidly<sup>8</sup>.

Nejširšího použití však doznaly v posledních dvou dekáдах enantioselektivní separační metody. Jsou založeny buď na přímých separacích, probíhajících v chirálním systému nebo na separacích nepřímých, které probíhají v achirálním systému, ale vlastní separaci předřazují derivatizaci chirálním činidlem. Z této velké skupiny moderních metod se při separacích a stanoveních enantiomerů léčiv nejúspěšněji a nejhojněji uplatňují metody HPLC<sup>9-12</sup> a kapilární elektroforézy (CE)<sup>13-16</sup>.

HPLC metodologie dává v současné době přednost přímým separacím na chirálních stacionárních fázích (CSP), jejichž výběr je velice pestrý<sup>9,17-19</sup> a je stále obohacován vývojem CSP s novými chirálními selektory.

U CE metodologie je nejčastěji používanou enantioselektivní technikou přidávání chirálního selektoru k nosnému elektrolytu. V současné době je k dispozici velké množství chirálních selektorů nejrůznější povahy, přičemž nejpočetnější a v aplikacích nejúspěšnější selektory jsou cyklohextriny a jejich deriváty<sup>20</sup>.

Ve srovnání s HPLC nabízí CE vyšší účinnost, větší pružnost a rychlost vývoje metody a v neposlední řadě i menší spotřebu vzorků a chirálních selektorů a nižší náklady. Nevýhodou však je, že často nedosahuje stejné citlivosti a reprodukovatelnosti jako HPLC.

Stanovení enantiomerní čistoty klade na použité separační metody přísnější požadavky než separace enantiomerů v racemátu, neboť se jedná o stanovení nízkých koncentrací enantiomerní nečistoty v přítomnosti majoritního enantiomeru. Rozlišení postačující pro úplnou separaci enantiomerů v racemátu není dostatečné pro citlivé stanovení enantiomerní čistoty. Obecně se uvádí, že musí být u racemátu dosaženo rozlišení nejméně 2, jestliže metoda má být použita pro stanovení enantiomerní nečistoty<sup>21</sup>.

Podobně jako u každého stanovení nečistot separační metodou je i v tomto případě důležité pořadí eluce majoritní a minoritní složky. Přesnějších a správnějších výsledků a výrazného zvýšení citlivosti je dosaženo, je-li pík enantiomerní nečistoty detegován před majoritním píkem enantiomerní účinné látky<sup>22</sup>.

Lékopisy i v současné době spoléhají ve většině případů kontroly enantiomerních nečistot na měření optické otáčivosti, třebaže se ukazuje, že polarimetrické metody neodpovídají současným požadavkům na kontrolu čistoty. Vzhledem k nedostatečné selektivitě polarimetrických metod mohou být zároveň s nežádoucím enantiomerem stanovovány i další organické nečistoty, které jsou opticky aktivní. Široká rozmezí optické otáčivosti uváděná v lékopisech u polarimetrických metod tolerují přítomnost i několika jednotek procent (2–5 %) enantiomerních nečistot<sup>23-26</sup>, zatímco ostatní organické nečistoty jsou běžně stanovovány na úrovni desetin procenta v souladu s požadavky mezinárodní harmonizační normy<sup>6</sup> (viz část 2). Navíc může být toto rozmezí stanoveno nesprávně a v důsledku toho pak dochází k absurdní situaci, že enantiomer léčiva je „příliš“ čistý, a proto nevyhovuje požadavkům v lékopise<sup>26</sup>.

Jak bylo zmíněno v úvodu, trend současné doby je používat léčiva ve formě jediného enantiomeru. Lékopisné články pro takováto nově vyvinutá léčiva již obsahují kvalitnější analytickou metodologii a s nimi začíná do lékopisů zvolna pronikat enantioselektivní HPLC. Např. Evropský lékopis a jeho doplňky<sup>27</sup> uvádějí tuto metodu ve třech článcích pro enantiomerně čistá léčiva, tři další články s enantioselektivní HPLC jsou připravovány<sup>28-30</sup>.

#### 4. Kontrola enantiomerní čistoty levodopy, methyldopy a karbidopy jako ilustrativní příklad

Pro ilustraci problematiky diskutované v tomto článku uvedeme konkrétní příklady využití HPLC a CE metod pro stanovení enantiomerní čistoty tří chemicky příbuzných léčiv užívaných ve formě L-izomerů a porovnáme tyto metody s lékopisnými polarimetrickými metodami.

Levodopa (L-2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina) je široce používána při léčbě Parkinsonovy nemoci a patří k té menšině syntetických chirálních léčiv, která jsou již mnoho let vyráběna jako čisté enantiomery. Důvodem bylo zjištění, že levodopa nevyvolává žádné vedlejší účinky (granulocytopenia), které byly pozorovány u dopy, jež je racemickou směsí obou enantiomerů<sup>31</sup>.

Ve formě čistého enantiomeru jsou užívány i methyldopa (L-2-amino-2-methyl-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina), předepisovaná jako antihypertensivum a karbidopa (L-2-hydrazino-2-methyl-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina) aplikovaná společně s levodopou jako antiparkinsonikum.

Tabulka I

Měření optické otáčivosti dle ČL 97 (levodopa a karbidopa) a ČSL 4 (methyldopa)

Léčivo	Přídavek D-izomeru [%]	Optická otáčivost <sup>a</sup> [°]	Lékopisem povolené rozmezí <sup>a</sup> [°]
Levodopa	0	-1,310	-1,27 až -1,34
	0,50	-1,313	
	1,00	-1,299	
	1,98	-1,278	
	5,02 <sup>b</sup>	-1,260 <sup>b</sup>	
Methyldopa	0	-15,42	-12,5 až -15,5
	0,50	-15,09	
	1,00	-14,84	
	1,97	-14,73	
	4,79	-13,91	
Karbidopa	0	-23,63	-22,5 až -26,5
	3,21	-22,52	
	5,33 <sup>b</sup>	-19,89 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> U levodopy jsou uvedeny hodnoty změřeného úhlu optické otáčivosti  $\alpha_D^{20}$ , které jsou limitovány lékopisem. U methyldopy a karbidopy jsou uvedeny hodnoty specifické optické otáčivosti  $[\alpha]_D^{20}$ , které jsou limitovány lékopisem, <sup>b</sup> hodnoty nevyhovující požadavkům lékopisu

Tabulka II

HPLC a CE metody separací enantiomerů levodopy, methyldopy a karbidopy a jejich využitelnost pro stanovení enantiomerní čistoty

Léčivo	Enantioselektivní separační metoda	Detekční limit <sup>a</sup> [%]	Validační studie	Komentář
Levodopa	LEC s dime-L-Phe	0,04	+	Vhodná pro citlivé stanovení enantiomerní čistoty. Vyžaduje dlouhé ustavování rovnováhy na koloně.
	LEC s L-Phe	–	–	Vhodná pro citlivé stanovení enantiomerní čistoty. Vyžaduje dlouhé ustavování rovnováhy na koloně.
	teikoplanin CSP RP LC	0,03	+	Robustní metoda pro citlivé, rutinní stanovení enantiomerní čistoty. Možnost doladit rozlišení obsahem ethanolu v mobilní fázi (test způsobilosti).
	teikoplanin CSP PO LC	–	–	Separace s nízkou účinností a dlouhými retenčními časy.
	CE s SBECD	0,02	–	Vhodná pro citlivé stanovení enantiomerní čistoty.
Methyldopa	LEC s dime-L-Phe	–	–	Stanovení nízkých koncentrací R-izomeru je znemožněno interferujícím negativním píkem. Není dosaženo úplné separace enantiomerů.
	teikoplanin CSP RP LC	–	–	Využitelná pro stanovení enantiomerní čistoty. Rozlišení enantiomerů nelze ovlivnit složením mobilní fáze, citlivé stanovení vyžaduje kolonu s vysokou účinností.
	teikoplanin CSP PO LC	0,40	+	Vhodná pro citlivé, rutinní stanovení enantiomerní čistoty. Možnost doladit rozlišení enantiomerů koncentrací SBECD (test způsobilosti).
	CE s SBECD	0,05	+	Vhodná pro citlivé, rutinní stanovení enantiomerní čistoty. Možnost doladit rozlišení enantiomerů koncentrací SBECD (test způsobilosti).
Karbidopa	LEC s L-Phe	0,05	+	Vhodná pro citlivé stanovení enantiomerní čistoty. Vyžaduje dlouhé ustavování rovnováhy na koloně.
	CE s SBECD	0,10	–	Vhodná pro citlivé, rutinní stanovení enantiomerní čistoty. Možnost doladit rozlišení koncentrací SBECD (test způsobilosti).
	teikoplanin CSP RP LC	0,50	–	Nižší účinnosti separace vedou k nižším detekčním limitům.
	teikoplanin CSP PO LC	0,50	–	Nižší účinnosti separace vedou k nižším detekčním limitům.

<sup>a</sup> Stanovený z poměru signál/šum a vyjádřený jako obsah D-izomeru vztahený k celkovému obsahu L+D-izomeru

#### 4.1. Lékopisné polarimetrické metody

V tabulce I jsou uvedeny výsledky měření optické otáčivosti podle příslušných metod European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)<sup>27</sup>, které jsou zároveň i metodami Českého lékopisu (ČL 97)<sup>32</sup>. Pro měření byly namíchány směsi D- a L-izomerů o známém složení, uvedeném v prvním sloupci tabulky. Poslední sloupec pak obsahuje přípustná rozmezí optické otáčivosti udávaná v lékopisech.

U methyldopy jsme použili metodu dle Československého lékopisu (ČSL 4)<sup>33</sup>, protože metoda podle Ph. Eur. a ČL 97 používá roztoky methyldopy v silně koncentrovaném, viskózním roztoku chloridu hlinitého a jsou známy experimentální potíže s prováděním této metody<sup>34</sup>.

Podle očekávání dokládají výsledky nedostatečnou citlivost metod. Ve všech případech přestávají lékopisným limitům vyhovovat až směsi obsahující více jak 2 % D-izomeru jako nečistoty, u methyldopy zkoušené dle ČSL 4 dokonce vyhovuje i směs obsahující 4,79 % D-izomeru. Velkou šíří

přípustného rozmezí pro optickou otáčivost můžeme dokumentovat na případu karbidopy. Interval přípustných hodnot specifické otáčivosti karbidopy má podle Ph. Eur. i ČL 97 šíři 4,0°. Naše měření ukázala, že přidání i tak velkého množství jako je 5,3 % D-izomeru k L-karbidopě změnilo specifickou otáčivost o hodnotu menší než je uvedený interval (rozdíl mezi hodnotami specifické otáčivosti pro karbidopu s nulovým obsahem D-izomeru a s obsahem 5,33 % D-izomeru, uvedenými v tabulce I, je 3,74°).

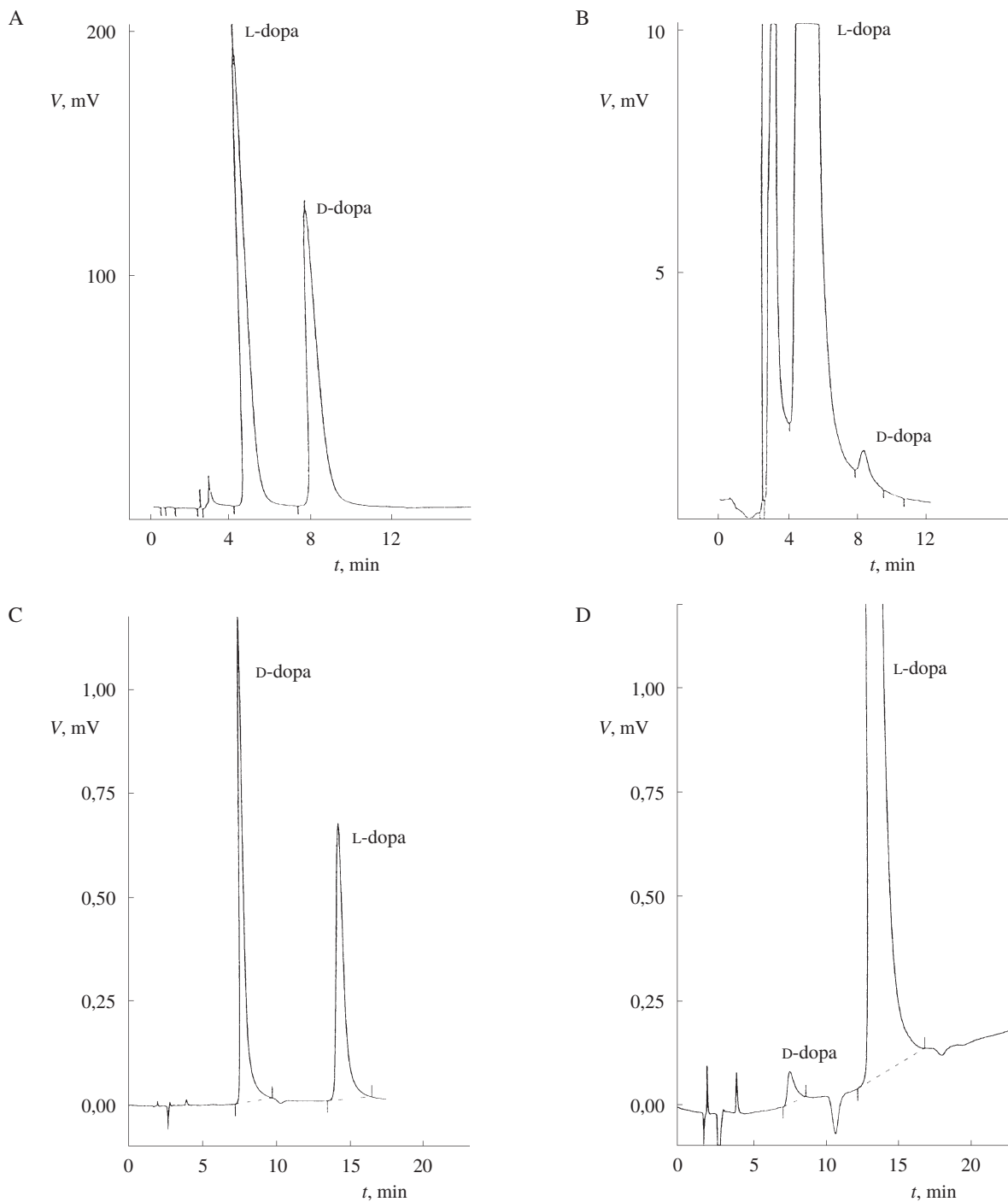
#### 4.2. Enantioselektivní HPLC metody

Pro přímou separaci aromatických aminokyselin s primární aminovou skupinou, k nimž patří svým chemickým složením dopa i methyldopa, nabízí současná enantioselektivní HPLC metodologie několik možností: chromatografii s výměnou ligandů<sup>35</sup> (LEC), která je vůbec nejstarší enantioselektivní HPLC technikou, použití cyklických polyetherů v chirální stacionární nebo mobilní fázi<sup>36,37</sup>, použití stacionární fáze s vá-

zaným  $\alpha$ -cyklodextrinem<sup>38</sup> nebo nejnověji stacionární fáze s vázaným glykopeptidovým antibiotikem teikoplaninem<sup>39,40</sup>.

Teikoplanin se ukázal být zvláště účinným chirálním selektorem pro enantioseparace aminokyselin, když bylo dosaženo separace u 45 racemátů z 55 zkoušených aminoky-

selin<sup>40</sup>. Proto jsme podrobně prostudovali možnosti jeho použití pro separaci enantiomerů dopy, methyl dopy i karbidopy. Pracovali jsme v reverzním separačním módu (RP), používajícím jako mobilní fázi směs alkohol–voda i v módu s polárně organickou mobilní fází (PO), tvořenou směsí methanolu,



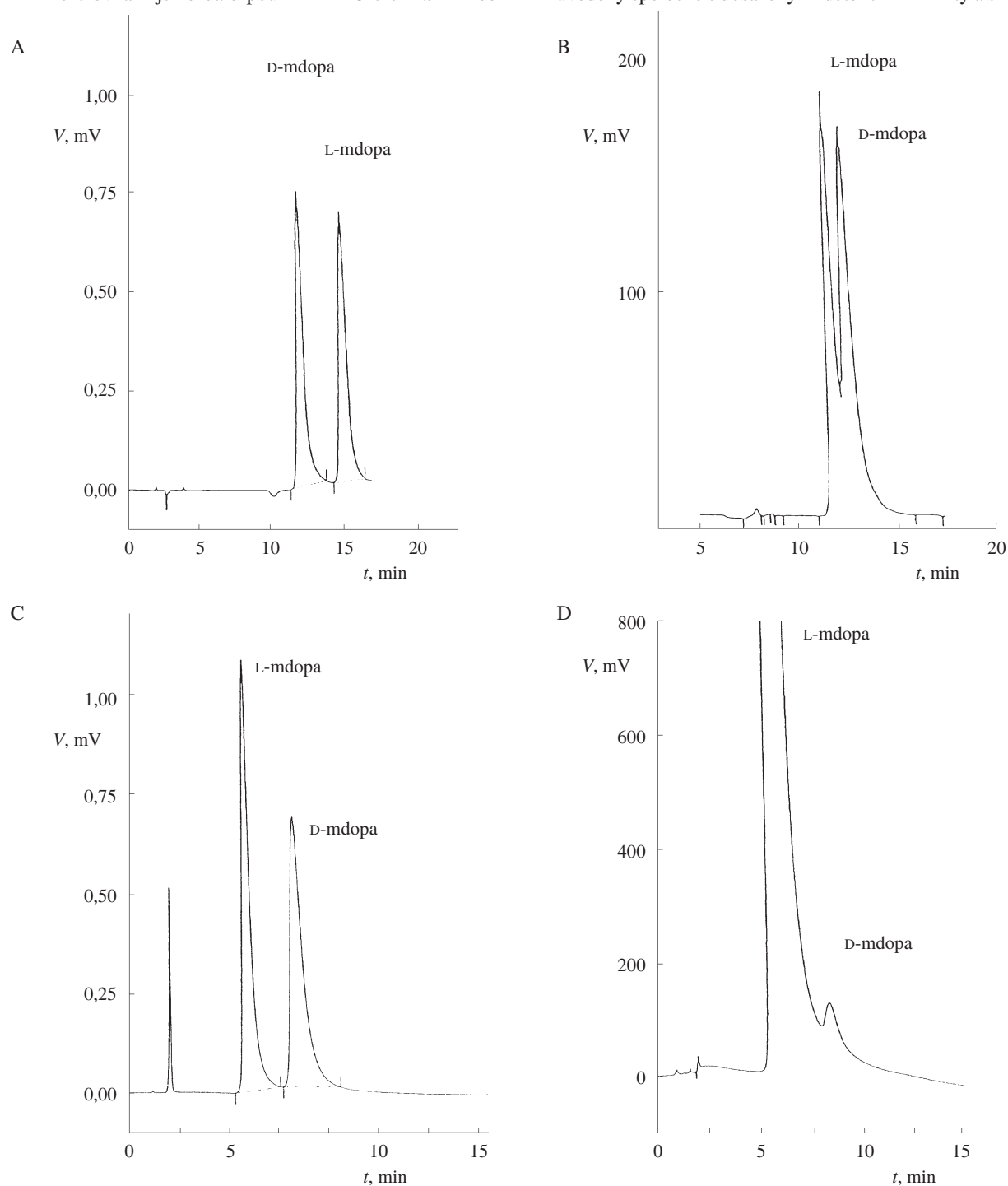
Obr. 1. Chromatografické záznamy separace racemátu dopy (A, C) a směsí enantiomerů dopy obsahující 0,1 % D-dopy (B) nebo 0,5 % D-dopy (D); A, B: teikoplaninová stacionární fáze (kolona o rozměrech 150×4,6 mm), mobilní fáze 65 % (v/v) ethanol – 35 % (v/v) voda, průtoková rychlost 0,7 ml.min<sup>-1</sup>, UV detekce při 280 nm; C, D: chromatografie s výměnou ligandů na koloně C18, 250×4,6 mm, mobilní fáze 10 % (v/v) methanol – 90 % (v/v) octan měďnatý ( $c = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) o pH 4,5 obsahující dime-L-Phe ( $c = 2 \text{ mmol.l}^{-1}$ ), průtoková rychlost 0,8 ml.min<sup>-1</sup>, UV detekce při 228 nm

triethylaminu a kyseliny octové<sup>25,41</sup>. U dosažených separací enantiomerů byl dále zkoumán jejich potenciál pro stanovení enantiomerní čistoty L-izomerů<sup>24,25,41</sup>.

Pro srovnání jsme dále použili i LEC s chirální mobil-

ní fází obsahující buď *N,N*-dimethyl-L-fenylalanin (dime-L-Phe)<sup>24,25</sup> nebo L-fenylalanin (L-Phe)<sup>34</sup>.

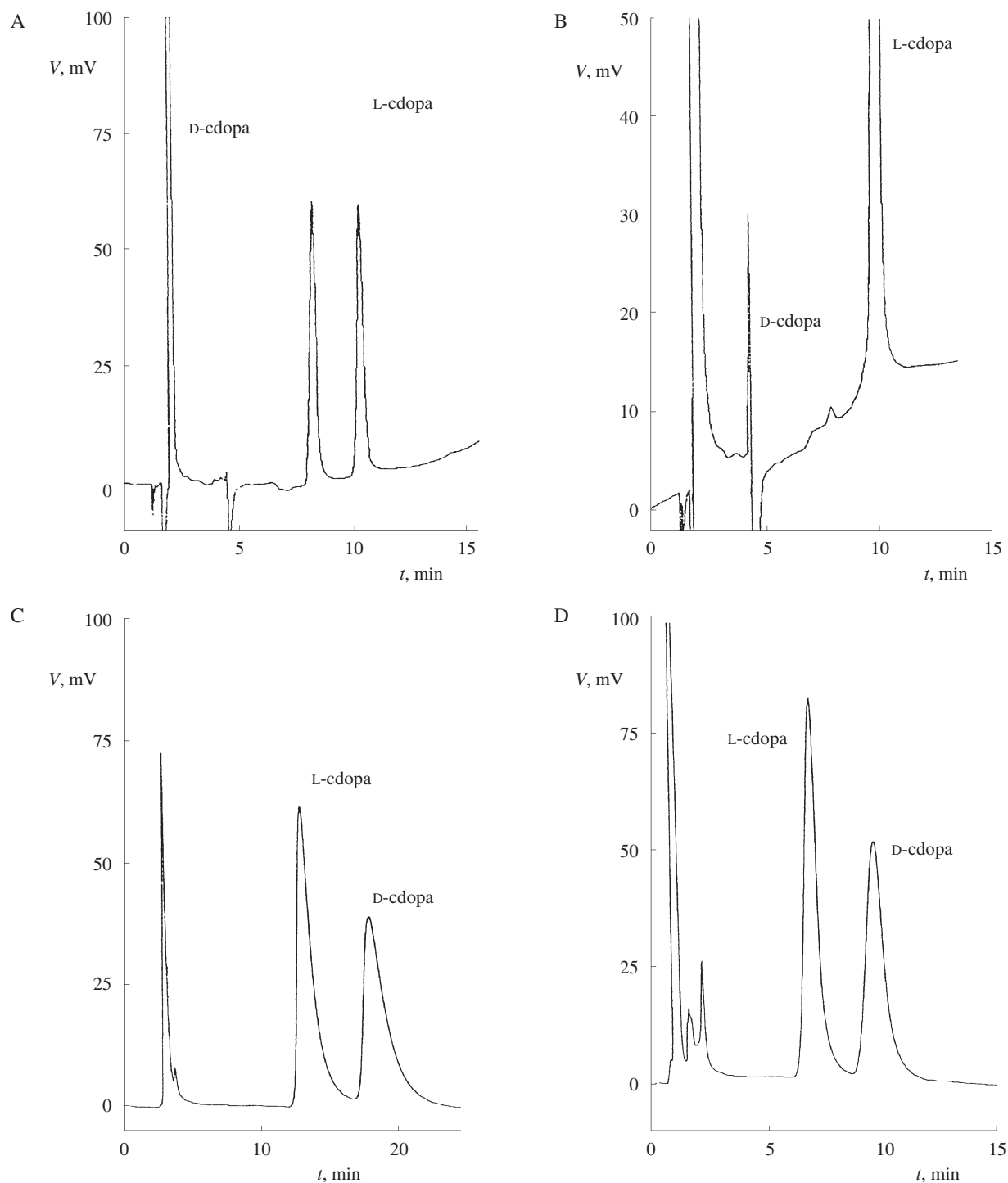
Použité HPLC metody enantioseparací jsou přehledně uvedeny společně s dosaženými detekčními limity a s kome-



Obr. 2. Chromatografické záznamy separace racemátu methyldopy (A, B, C) a směsi enantiomerů methyldopy obsahující 1 % D-methyldopy (D); A: chromatografie s výměnou ligandů na koloně C18, 250×4,6 mm, mobilní fáze 10 % (v/v) methanol – 90 % (v/v) octan měďnatý ( $c = 1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) o pH 4,5 obsahující dime-L-Phe ( $c = 2 \text{ mmol.l}^{-1}$ ), průtoková rychlost  $0,8 \text{ ml.min}^{-1}$ , UV detekce při 228 nm, B: chromatografie na teicoplaninové stacionární fázi (kolona o rozměrech 150×4,6 mm), mobilní fáze 65 % (v/v) ethanol – 35 % (v/v) voda, průtoková rychlost  $0,7 \text{ ml.min}^{-1}$ , UV detekce při 280 nm, C, D: jako B ale s polárním organickou mobilní fází obsahující směs 99,99 % (v/v) methanolu, 0,005 % (v/v) kyseliny octové a 0,005 % (v/v) triethylaminu, průtoková rychlost  $0,9 \text{ ml.min}^{-1}$ , UV detekce při 210 nm

tářem v tabulce II. Dosažené separace studovaných enantiomerů ilustrují obrázky 1–3, experimentální podmínky jsou uvedeny v textu pod obrázky. V tabulce III jsou ukázány

některé výsledky validačních studií těchto metod. Hodnoty validačních parametrů jsou srovnatelné s hodnotami běžně získávanými při stanovení čistoty léčiv pomocí HPLC a do-



Obr. 3. Chromatografické záznamy separace racemátu karbidopy (A, C, D) a směsi enantiomerů karbidopy obsahující 1 % D-karbidopy (B); A, B: separace dosaženy metodou chromatografie s výměnou ligandů na koloně C18, 250×4,6 mm, mobilní fáze 7,7 % (v/v) methanol – 92,3 % (v/v) octan měďnatý ( $c = 3 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) obsahující L-Phe ( $c = 6 \text{ mmol.l}^{-1}$ ), průtoková rychlost  $1 \text{ ml.min}^{-1}$ , UV detekce při 280 nm, C: chromatografie na teikoplaninové stacionární fázi (kolona o rozměrech 150×4,6 mm), mobilní fáze 65 % (v/v) ethanol – 35 % (v/v) voda, průtoková rychlost  $0,7 \text{ ml.min}^{-1}$ , UV detekce při 280 nm, D: jako C ale s polární organickou mobilní fází obsahující methanol s 0,005 % (v/v) kyseliny octové, průtoková rychlost  $0,9 \text{ ml.min}^{-1}$ , UV detekce při 210 nm

kumentují dobrou přesnost, správnost a citlivost stanovení. Pouze u stanovení enantiomerní čistoty methyldopy za použití teikoplaninové CSP a PO mobilní fáze bylo dosaženo poněkud nižší citlivosti a správnosti, což je způsobeno problémy při vyhodnocování píku D-izomeru eluovaném na chvostu majoritního píku L-izomeru.

#### 4.3. Enantioselektivní CE metody

V posledních letech jsou pro enantioselektivní CE separace stále více využívány deriváty cyklohextrinu s vlastním nábojem<sup>42</sup>. Jedním z takovýchto chirálních selektorů je nedávno popsán polyaniontový derivát, sulfobutylether- $\beta$ -cyklohextrin (SBECD), který je charakterizován průměrným stupněm substituce 4 a který má, díky svým sulfonovým skupinám, negativní náboj v celém rozsahu pH běžném u CE<sup>43,44</sup>.

Tento chirální selektor jsme použili při studiu separací enantiomerů dopy, methyldopy a karbidopy. Na základě zjištěné závislosti migračních časů a rozlišení enantiomerů na koncentraci SBECD byly nalezeny podmínky pro separace využitelné pro stanovení enantiomerní čistoty<sup>45</sup>. Na obrázku 4

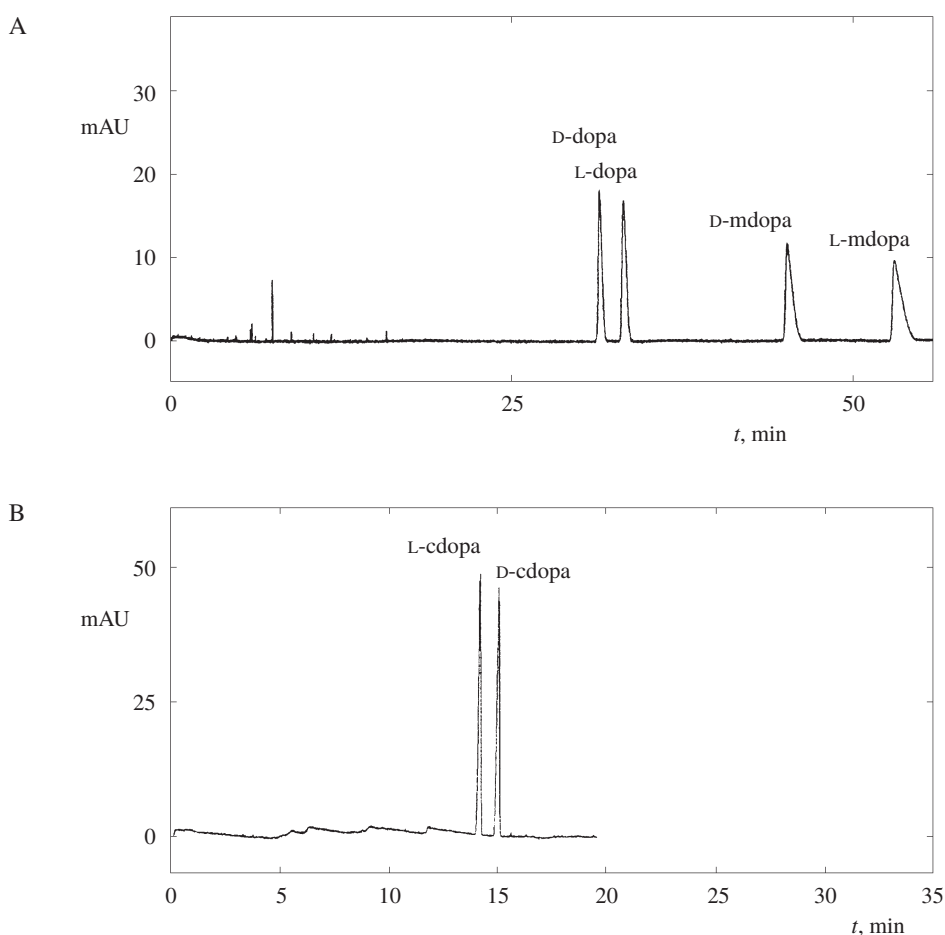
jsou pro ilustraci ukázány dva záznamy dosažených separací enantiomerů, experimentální podmínky jsou uvedeny v textu pod obrázkem.

Navržené CE metody jsou společně s HPLC metodami uvedeny v přehledu v tabulce II, do tabulky III je pro ilustraci zařazeno několik výsledků validace CE metody stanovení enantiomerní čistoty methyldopy.

#### 4.4. Srovnání metod

Data uvedená v tabulkách I–III dokumentují nedostatečnou citlivost polarimetrických metod a přednosti enantioselektivních metod HPLC a CE. Pro každé ze tří studovaných léčiv byla vypracována nejméně jedna separační metoda, která umožňuje citlivé a selektivní stanovení nežádoucího D-izomeru a která je vhodná pro rutinní používání. Citlivost je ve srovnání s polarimetrickými metodami o 1–2 řády vyšší a naruždí od polarimetrických metod jsou tyto metody nejen selektivní, ale v některých případech umožňují i současné stanovení dalších organických nečistot<sup>25</sup>.

Enantioselektivní CE se ukázala být dobrou alternativou k HPLC a její použití pro stanovení enantiomerní čistoty může



Obr. 4. Elektroforetické záznamy separace enantiomerů dopy, methyldopy a karbidopy získané při teplotě 20 °C za použití křemenné kapiláry o průměru 50  $\mu\text{m}$  a celkové délce 47 cm (délka k detektoru 40 cm) a elektrolytového systému obsahujícího fosforečnanový pufr ( $c = 40 \text{ mmol.l}^{-1}$ , pH 2,50) a chirální selektor SBECD o koncentraci 3,06  $\text{mmol.l}^{-1}$  (A) nebo 20,04  $\text{mmol.l}^{-1}$  (B), UV detekce při 200 nm, separační napětí 18 kV normální polarity (A) nebo obrácené polarity (B)



Tabulka III  
Validace HPLC a CE metod stanovení enantiomerní čistoty léčiv

Léčivo	Metoda	Přídavek D-izomeru [%]	RSD [%]		Výtěžnost [%]	Korelační koeficient	Rozsah linearity [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
			během dne	mezi dny			
Levodopa	LEC	0,50	2,3	5,7	99,4	0,9991	1–25
	s dime-L-Phe	1,19	1,4	3,5	102,7		
	teikoplaninCSP	0,50	1,0	1,4	104,3		
	RP LC	0,99	1,2	2,5	99,5		
Methylodopa	teikoplaninCSP	1,47	1,8	1,5	83,2	0,9815	5–27
	PO LC	2,97	0,4	2,2	96,2		
	CE s SBECD	0,55	3,2	2,6	108,8		
		1,95	2,0	1,1	96,2		
Karbidopa	LEC s L-Phe	0,49	2,7	1,0	101,9	0,9999	1–50

být v některých případech výhodnější než použití HPLC, jak ukazuje příklad methylodopy. Enantiomery této aminokyseliny jsou pro svoji  $\alpha$ -methylovou skupinu na teikoplaninové stacionární fázi obtížněji rozlišitelné než enantiomery dopy<sup>41</sup> a ani enantioselektivní LEC není v tomto případě aplikovatelná při vyšších citlivostech<sup>25</sup>. Naproti tomu CE metoda se SBECD jako chirálním selektorem nabízí citlivé a spolehlivé stanovení čistoty (viz výsledky validací v tabulce III).

## 5. Závěr

Současný posun v používání syntetických chirálních léčiv ve prospěch čistých enantiomerů spolu se stále přísnějšími požadavky na čistotu léčiv klade větší nároky i na kontrolu enantiomerní čistoty léčiv a na metody pro tento účel používané. Klasické polarimetrické metody neodpovídají současným požadavkům na kontrolu čistoty a současnému vývoji enantioselektivní metodologie. Při použití enantioselektivních metod HPLC nebo CE lze kontrolovat enantiomerní čistotu léčiv na stejné úrovni, jaká je požadována pro sledování přítomnosti organických nečistot, zatímco polarimetrické metody zachycují přítomnost enantiomerních nečistot neselektivně a většinou až při obsahu převyšujícím výrazně 1 %. Použití metod enantioselektivní HPLC a CE v lékopisech zlepšilo úroveň článků pro enantiomerně čistá léčiva a přispěje ke změně v přístupu k enantiomerním nečistotám, které jsou zatím ze skupiny organických nečistot vyčleňovány.

Je však třeba zdůraznit, že při komplexnosti celého jevu chiralit a vzhledem ke skutečnosti, že trend ve vývoji léčiv jasně směřuje k většímu počtu stereogenních center v molekule syntetických chirálních léčiv, představuje obecně kontrola stereoizomerní čistoty léčiv náročný úkol pro moderní stereo-selektivní analytickou chemii.

*Tato práce byla finančně podporována grantem MZ ČR (grant č. 3607-3).*

## LITERATURA

- Ariens E. J.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 26, 663 (1984).
- Drayer D. E.: Clin. Pharmacol. Ther. 40, 125 (1986).
- FDA: Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs. Chirality 4, 338 (1992).
- CPMP: Directive 75/318/EEC: Investigation of Chiral Active Substances (přijato 1993).
- Rauws A. G., Groen K.: Chirality 6, 72, 1994.
- ICH Tripartite Guideline Q3A: Impurities in New Drug Substances (přijato 1995).
- ICH Tripartite Guideline Q6A: Specifications for New Drug Substances and Products: Chemical Substances. Step 2, 1997.
- Dawson B. A., Mattok G. L.: Pharmeuropa 9, 347, 1997.
- Subramanian G. (ed.): A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography. VCH, New York 1994.
- Ahuja S. (ed.): Chiral Separation by Liquid Chromatography (ACS Symposium Series 471). American Chemical Society, Washington, DC 1991.
- Petersson C., Persson B. A., v knize: Handbook of HPLC (Katz E., Eksteen R., Schoemakers P., Miller N., ed.), str. 669. Marcel Dekker, New York 1998.
- Gilar M., Tesařová E., Patzelová V., Deyl Z.: Chem. Listy 88, 514 (1994).
- Wang F., Khaledi M. G., v knize: High Performance Capillary Electrophoresis (Khaledi M. G., ed.), str. 791. Wiley-Interscience Publications, New York 1998.
- Nishi H., Terabe S.: J. Chromatogr. A 694, 245 (1995).
- Fanali S.: J. Chromatogr. A 735, 77 (1996).
- Vespalec R., Boček B: Electrophoresis 18, 843 (1997).
- Däppen R., Arm H., Meyer V. R.: J. Chromatogr. 373, 1 (1986).
- Armstrong D. W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill Ch., Chen J.-R.: Anal. Chem. 66, 1473 (1994).
- Okamoto Y., Kaida Y.: Chromatogr. A 666, 403 (1994).
- Bressolle F., Audran M., Pham T.-N., Vallon J.-J.: J. Chromatogr. B 687, 303 (1996).
- Doyle T. D., v knize: Chiral Separations by LC (Ahuja S., ed.), str. 27. ACS, Washington, DC 1991.
- Perry J. A., Rateike J. D., Szczerba T. J.: J. Chromatogr. 389, 57 (1987).
- Blom Y., Ek M., Martin J. T., Stjernström: Pharmeuropa 5, 381 (1993).
- Doležalová M., Tkaczyková M.: Pharmeuropa 10, 322 (1998).

25. Doležalová M., Tkaczyková M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**, 555 (1999)
26. Rose U., Kaltenbach T.: *Pharmeuropa* **11**, 16 (1999).
27. Council of Europe: *European Pharmacopoeia* 3rd Ed. (1996) a Supplement 2000 (1999), Strasbourg.
28. Anonym: *Pharmeuropa* **10**, 198 (1998).
29. Anonym: *Pharmeuropa* **10**, 243 (1998).
30. Anonym: *Pharmeuropa* **11**, 77 (1999).
31. Cotzias G. C., Papavasiliow P. S., Gellene R.: *N. Engl. J. Med.* **280**, 337 (1969).
32. *Český lékopis 1997* (Pharmacopoea Bohemica MCMXCVII). Grada Publishing, Praha 1997.
33. *Československý lékopis* (Pharmacopoea Bohemoslovaca IV), 4. vydání. Avicenum, Praha 1987.
34. Gelber L. R., Neumeyer J. L.: *J. Chromatogr.* **257**, 317 (1983).
35. Davankov V. A.: *J. Chromatogr. A* **666**, 55 (1994).
36. Hilton M., Armstrong D. W.: *J. Liq. Chromatogr.* **14**, 9 (1991).
37. Shinbo T., Yamaguchi T., Nishimura K., Sugiura M.: *J. Chromatogr.* **405**, 145 (1987).
38. Armstrong D. W., Yang X., Han S. M., Menges R. A.: *Anal. Chem.* **59**, 2594 (1987).
39. Armstrong D. W., Liu Y., Ekborgott K. H.: *Chirality* **7**, 474 (1995).
40. Berthod A., Liu Y., Bagwill Ch., Armstrong D. W.: *J. Chromatogr.* **731**, 123 (1996).
41. Doležalová M., Tkaczyková M.: *Chirality* **11**, 394 (1999).
42. Chankvetadze B.: *J. Chromatogr. A* **792**, 269 (1997).
43. Tait R. J., Thompson D. O., Stella V. L., Stobaugh J. F.: *Anal. Chem.* **66**, 4013 (1994).
44. Desiderio C., Fanali S.: *J. Chromatogr.* **16**, 183 (1995).
45. Doležalová M., Fanali S.: *23rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques HPLC'99*, Granada 1999. Book of Abstracts Vol. II, str. PB 6/7.

**M. Doležalová and M. Tkaczyková** (*State Institute for Drug Control, Prague*): **Control of Enantiomeric Purity of Drugs**

Due to the importance of stereoisomerism for drug efficacy and safety and due to the strict policy of regulatory authorities, pharmaceutical companies tend to produce chiral drugs in single enantiomeric forms. In drug control, the undesirable stereoisomers should be considered in the same manner as other organic impurities. The potential of enantioselective liquid-phase separation methods in determination of the enantiomeric purity is demonstrated for three structurally related drugs, levodopa, methyl dopa and carbidopa. Direct HPLC and capillary electrophoretic separations of the enantiomers of interest with the use of recently introduced chiral selectors, teicoplanin and sulfobutyl ether  $\beta$ -cyclodextrin, are described. In addition, ligand-exchange liquid chromatography with *N,N*-dimethyl-L-phenylalanine or L-phenylalanine in mobile phase is discussed. Results of measurement of optical rotation according to the European Pharmacopoeia are mentioned and inapplicability of polarimetric methods to assessment of enantiomeric impurities (D-isomers) at levels lower than 2 % is shown.

## NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE

### DOPORUČENÍ IUPAC

#### The Hold-up Volume Concept in Column Chromatography

Revised recommendations are presented for the nomenclature of the hold-up volume in chromatography, updating those originally presented in the IUPAC document "Nomenclature for Chromatography (IUPAC Recommendations 1993)", Pure Appl. Chem. 65, 819–872 (1993). A number of related and derived definitions for retention parameters are described, including a definition of the term "chromatographic system". The paper also compares methods used in the literature to determine the hold-up volume.

#### Retention Parameters in Gas Chromatography

This paper presents a revision of terms in Chapter 3.6 The Mobile Phase and Chapter 3.7 Retention Parameters in Column Chromatography of the "Nomenclature for Chromatography (IUPAC Recommendations 1993)", Pure Appl. Chem. 65, 819–872 (1993), with the aims of (i) emphasizing the physical meaning of the terms and (ii) specifying the temperatures and pressures for the terms for gas volumes and flow rates. A number of the original terms were found to be misleading or superfluous, including such terms as corrected retention time, net retention time, total retention volume (time), specific retention volume at 0 °C, relative pressure and their usage is strongly discouraged. Chapter 1.1 Basic Definitions was supplemented with the terms chromatographic system and chromatographic process.

#### Generic Source-Based Nomenclature for Polymers

The commission has already published two documents on the source-based names of linear copolymers (Pure Appl. Chem. 57, 1427–1440 (1985)) and nonlinear polymers (Pure Appl. Chem. 69, 2511–2521 (1997)); however, in some cases this nomenclature leads to ambiguous names. The present document proposes a generic source-based nomenclature that solves these problems and yields clearer source-based names. A generic source-based name comprises two parts: 1. a polymer class (generic) name followed by a colon and 2. the actual or hypothetical monomer name(s), parenthesized in the case of a copolymer. The formula, the structure-based name, the source-based name, and the generic source-based name are given for each example in the document. In some cases, only generic source-based nomenclature gives unambiguous na-

mes, for example when a polymer has more than one name or when it is obtained through a series of intermediate structures. The rules concern mostly polymers with one or more types of functional groups or heterocyclic system in the main chain, but to some extent they are also applicable to polymers with side-groups, carbon-chain polymers such as vinyl or diene polymers, spiro and cyclic polymers, and networks.

Otiskujeme synopse názvoslovných návrhů z oboru chromatografie, které připravila komise IUPAC pro separační metody v analytické chemii, a z oboru názvosloví polymerů, který připravila komise IUPAC pro makromolekulární nomenklaturu. Návrhy jsou určeny k posouzení a kritice chemické veřejnosti. Zájemci o bližší informace či o texty návrhů se mohou obrátit na adresu Národního střediska IUPAC v České republice:

Ing. Jaroslav Kahovec, CSc.  
Ústav makromolekulární chemie AV ČR  
Heyrovského nám. 2  
162 06 Praha 6  
tel. 02-2040 3322, fax 02-367981, e-mail: kah@imc.cas.cz

Připomínky k návrhům je třeba zaslat do 28. února 2001 na adresy:

Prof. José Antonio García Domínguez 1. návrh  
Institute of Physical Chemistry "Rocasolano"  
Calle Serrano 119  
E-28006 Madrid, Spain  
Tel.: +34-91-561-9400  
Fax: +34-91-564-2431  
e-mail: jagd@iqfr.csic.es

Prof. Vadim A. Davankov 2. návrh  
Institute of Organo-Element Compounds  
Russian Academy of Sciences  
Vavilov Street 28  
RU-117813 Moscow, Russia  
Tel.: +7-095-135-6471  
Fax: +7-095-135-6471  
e-mail: davank@ineos.ac.ru

Prof. Ernest Maréchal 3. návrh  
Laboratoire de Synthèse Macromoléculaire  
Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)  
Boîte 184 – Tour 54, 4e étage  
4 place Jussieu  
F-75252 Paris Cédex 05, France  
Tel.: +33-1-44-27-38-04  
Fax: +33-1-44-27-70-54  
e-mail: marechal@ccr.jussieu.fr

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### VOLTAMETRICKÉ CHOVÁNÍ A STANOVENÍ NĚKTERÝCH CYTOKININŮ NA RTUŤOVÉ ELEKTRODĚ

RENATA HUŠKOVÁ<sup>a</sup>, DANUŠE PĚCHOVÁ<sup>b</sup>,  
MILAN KOTOUČEK<sup>a</sup>, KAREL LEMR<sup>a</sup>  
a KAREL DOLEŽAL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc, <sup>b</sup>Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého a Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, e-mail: huskova@prfnw.upol.cz

Došlo dne 23.III.2000

Klíčová slova: voltametrie, polarografie, kinetin, *N*<sup>6</sup>-benzylaminopurin

### Úvod

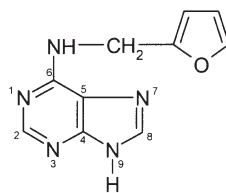
Cytokiny tvoří jednu z pěti skupin rostlinných hormonů (fytohormonů), jejichž charakteristickou vlastností je schopnost napomáhat dělení buněk a stimulovat metabolismus rostlin, zejména syntézu RNA a proteinů. Z praktických aplikací cytokininů (spolu s auxiny) je nejvýznamnější jejich využití v rostlinných biotechnologiích jako složek kultivačních médií při množení zemědělsky strategických a okrasných rostlin a dále při regeneraci rostlin *in vitro*. Cytokiny se také používají ke stimulaci větvení okrasných rostlin a v kombinaci s gibereliny ke tvarování plodů některých odrůd jablek. Exogenní aplikace cytokininů u obilovin v době kvetení vyvolává zvýšení počtu zrn v klasech.

Některé deriváty cytokininů vykazují specifický inhibiční účinek na růst určitých savčích tumorů<sup>1-3</sup>. Uměle připravené deriváty přírodních cytokininů byly v posledních deseti letech studovány pro jejich schopnost inhibovat buněčné dělení prostřednictvím specifické interakce s nedávno objevenými základními regulátory buněčného cyklu tzv. cyklin-dependentními kinasami<sup>4</sup> (CDK). Klinická onkologie spojuje své naděje právě s vývojem nových preparátů, jakými jsou umělé inhibitory CDK potenciálně použitelné jako cytostatika.

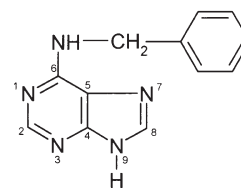
Ke stanovení fytohormonů se používají biotesty založené na zjištění růstové nebo metabolické odezvy na daný hormon. Mnohem častěji se však využívá chromatografických a imunochemických technik. Ke stanovení a identifikaci lze využít i méně používané, avšak snadno dostupné a rychlé voltametrické techniky. Elektrochemické chování těchto látek na rtuťové elektrodě může do jisté míry osvětlit dílčí kroky složitě

metabolického procesu cytokininů a jejich působení v rostlinách. Zatímco elektrochemické chování adeninu (6-aminopurinu) a jeho některých derivátů již bylo zkoumáno<sup>5-8</sup>, skupině biologicky důležitých cytokininů byla věnována doposud malá pozornost<sup>9</sup>.

V této práci je tedy s využitím klasické dc-polarografie, diferenčně pulzní voltametrie s rychlým nárůstem potenciálu (FSDPV), potenciostatické coulometrie a adsorptivní stripping voltametrie (AdSV) sledováno chování dvou zástupců aromatických cytokininů: *N*<sup>6</sup>-(furfurylamino)purinu (kinetinu) a *N*<sup>6</sup>-(benzylamino)purinu (BAP). Cílem bylo získat další poznatky o mechanismu redukce uvedených cytokininů na rtuťové elektrodě a vypracovat postup pro stanovení v modelových vzorcích a v médiích pro kultivaci rostlin.



kinetin



*N*<sup>6</sup>-(benzylamino)purin

### Experimentální část

Kinetin a BAP jako standardní látky byly získány jednak od firmy Fluka Chemie AG, jednak z Laboratoře růstových regulátorů (Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc). Zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup> v methanolu p.a. (Lachema, Neratovice). Roztoky nižších koncentrací byly získány ředěním zásobních roztoků methanolem.

Klasická dc-polarografie byla prováděna na polarografu OH 102 (Radelkis, Budapest) v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla rtuťová kapková elektroda s parametry:  $t = 3,6$  s,  $m = 1,98$  mg.s<sup>-1</sup> při výšce rezervoáru 90 cm. Nasycená kalomelová elektroda (SCE) tvořila elektrodu referenční, pomocnou elektrodou platinová (obě Radelkis, Budapest). Technika diferenčně pulzní voltametrie s rychlým nárůstem potenciálu (FSDPV) byla prováděna na polarografickém analyzátoru PA-4 v kombinaci se zapisovačem XY 4106 a statickou rtuťovou elektrodou SMDE (vše Laboratorní přístroje, Praha) s dobou nárůstu kapky 160 ms. Měření křivek cyklické voltametrie, adsorpční stripping voltametrie a stanovení kinetinu metodou FSDPV bylo prováděno na přístroji Eko-Tribo-Polarograf se rtuťovou tužkovou minielektrodou (Polaro-Sensors, Praha), referenční argentchloridovou a pomocnou platinovou elektrodou. Elektrokapilární křivky byly měřeny na analyzátoru PA-4 v tříelektrodovém zapojení, přičemž pracovní elektrodou tvořila Novotného vřetenová elektroda (šířka vřetene  $d = 160$  μm, vnitřní průměr kapiláry  $d =$

\* Tato práce získala 1. místo v soutěži o cenu firmy Merck za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie 2.2.2000 v Brně

43  $\mu\text{m}$ ). Coulometrická měření byla uskutečněna na analyzátoru OH 404/A (Radelkis, Budapest) s velkoplošnou rtuťovou katodou ( $A = 26,4 \text{ cm}^2$ ). SCE sloužila jako elektroda referenční, v anodovém prostoru odděleném fritou byla umístěna pomocná Pt-elektroda. Elektrolytem v obou prostorech byl acetátový pufr daného pH. Produkty coulometrické redukce byly identifikovány hmotnostní spektrometrií na přístroji LCQ (Finnigan Mat, San Jose, CA, USA) vybaveném ionizační technikou ESI (+ modus, teplota kapiláry  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ , napětí zdroje 4,5 kV, průtok dusíku 30, napětí na kapiláře 21 V). Parametry spektrometru byly laděny na roztok BAP. Roztoky standardu ( $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) a vzorky těžce sloučeniny ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , 10 % v/v methanol, 0,02 molární acetátový pufr) po coulometrické redukci byly dávkovány přímo do ionizačního zdroje průtokem  $5 \mu\text{l.min}^{-1}$ . Spektrofotometrická měření disociačních konstant byla prováděna v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1,0 cm, při  $\lambda = 287 \text{ nm}$  (kinetin),  $\lambda = 269 \text{ nm}$  (BAP) na přístroji PU 8750 (Philips, Cambridge). Hodnoty pH byly měřeny na pH-metru MV 870 (Präcitronic, Dresden).

## Výsledky a diskuse

Cytokininy – kinetin a BAP – podléhají na rtuťové kapkové elektrodě ireverzibilní redukci. Probíhá pouze v kyselém prostředí a je reprezentována jednou difuzní dc vlnou resp. jedním dp-píkem. S rostoucím pH se hodnoty proudů u obou sloučenin snižují a při  $\text{pH} \approx 6,6$  již neposkytují žádnou odezvu (obr. 1). Závislosti  $E_{1/2} = f(\text{pH})$  resp.  $E_p = f(\text{pH})$  při hodnotě iontové síly  $I = 0,1$  jsou tvořeny dvěma přímkovými úseky, jejichž průsečík odpovídá disociační konstantě oxidované formy (obr. 2). Tato disociační konstanta je v dobré shodě s hodnotou zjištěnou pomocí UV-spektrometrie (tabulka I).

V roztocích o  $\text{pH} < \text{p}K_a$  proud dosahuje nejvyšších hodnot a z toho vyplývá, že redukci na rtuťové elektrodě podléhá protonizovaná forma. Nasvědčují tomu i závislosti  $E_{1/2} = f(\text{pH})$  resp.  $E_p = f(\text{pH})$ . V mírně kyselé oblasti ( $\text{pH} > \text{p}K_a$ ), kde

Tabulka I

Hodnoty disociačních konstant  $\text{p}K_a$

Metoda	Kinetin	BAP
dc-Polarografie	3,9	4,1
FSDPV	3,8	4,2
UV-spektroskopie	3,73	4,16

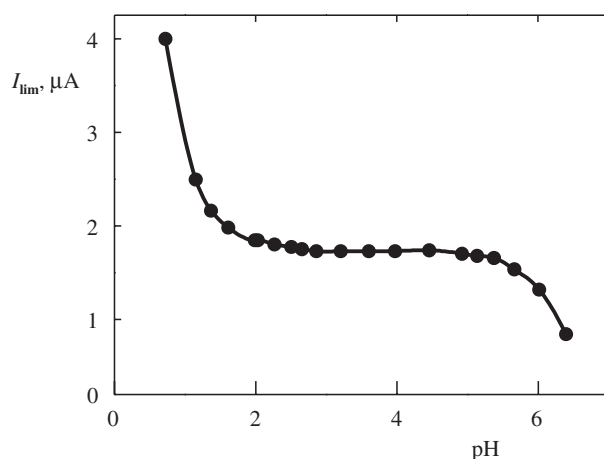
Tabulka II

Hodnoty proudů dc-vln srovnávacích analýz

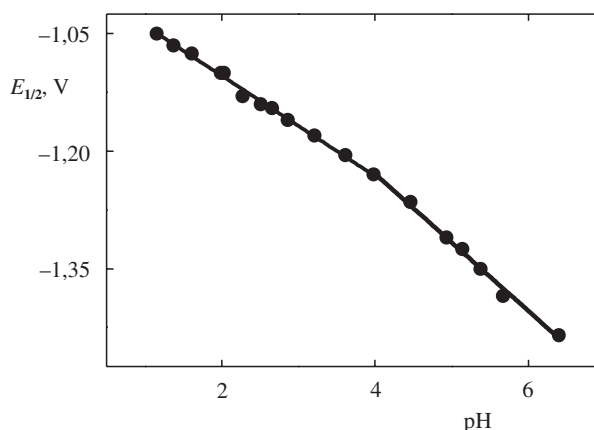
1. Srovnávací analýza		2. srovnávací analýza	
Látka ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ )	$I [\mu\text{A}]$	látka ( $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ )	$I [\mu\text{A}]$
<i>m</i> -Nitrobenzoová k.	0,528	<i>m</i> -nitrobenzoová k.	1,152
Adenin	0,72	adenin	1,728
BAP	0,78	kinetin	1,692

elektrochemická reakce ustává, redukce vyžaduje větší energii v důsledku nezbytné prioritní protonizace molekuly, tzn. že  $\Delta E = f(\Delta\text{pH})$  je větší nežli v oblasti  $\text{pH} < \text{p}K_a$ . Protonizovaná forma je stabilizována bohatou mezomerií a tautomerií (schéma 1). Rozhodnout o pravděpodobné struktuře, která podléhá na rtuťové elektrodě redukci, je obtížné. Podle Elvinga<sup>7</sup> je největší elektronová hustota na atomu dusíku N<sup>1</sup> pyrimidinového jádra a tudíž na tomto místě by měla nastat protonizace molekuly a vstup prvního elektronu při redukci.

K určení počtu elektronů potřebných na redukci cytokininů byla použita jako základní metoda potenciostatická coulometrie na velkoplošné rtuťové elektrodě. Zjištěno bylo šest elektronů. Šest elektronů bylo zjištěno také srovnávací analýzou dc polarografických vln. Jako srovnávací látky byly použity benzil a *m*-nitrobenzoová kyselina. Současně byla pro srovnání zaznamenána i vlna adeninu. Vlny kinetinu, BAP a rovněž tak vlna adeninu jsou přibližně 1,5krát vyšší než čtyřelektronová vlna *m*-nitrobenzoové kyseliny (tabulka II), a tedy odpovídají šestielektronové redukci. Ve srovnání s vlnou benzilu vykazují cytokininy proud trojnásobný. Není bez zajímavosti úsudek Elvinga<sup>7</sup>, že adenin, oproti šestielektronové coulometrické redukci, je polarograficky redukován na



Obr. 1. Závislost limitního proudu kinetinu na pH v HCl a následně v Brittonových-Robinsonových puffrech,  $c = 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , 10 % (v/v) methanolu, dc-polarografie



Obr. 2. Závislost  $E_{1/2}$  kinetinu na pH,  $I = 0,1$

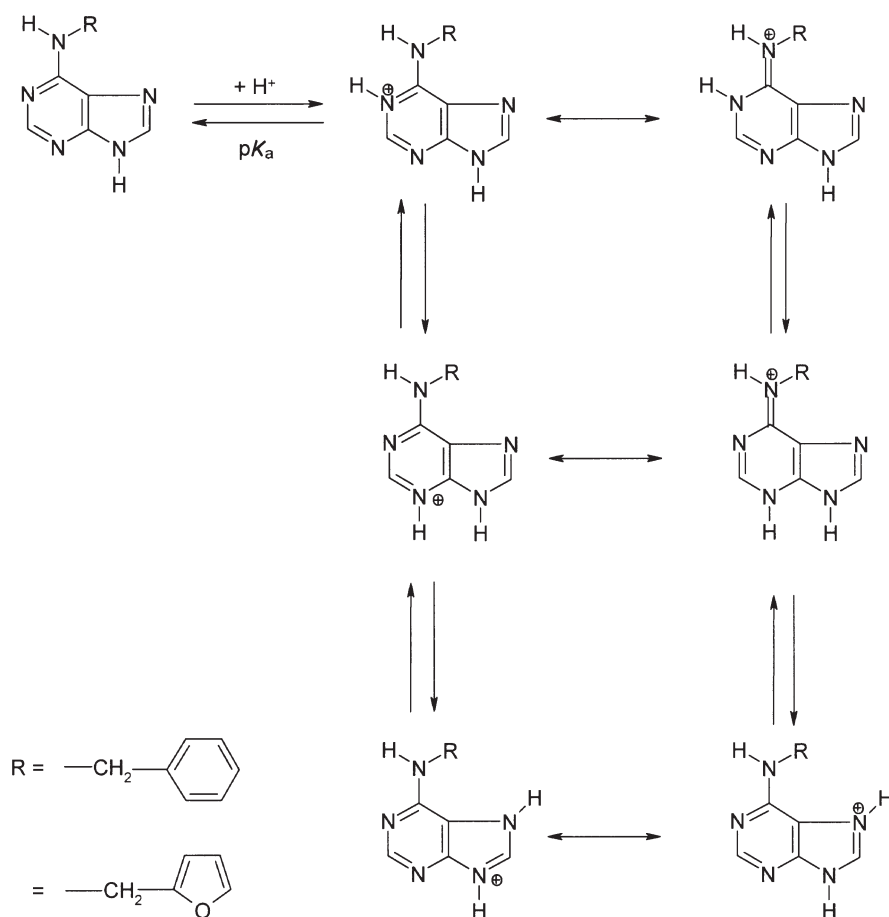


Schéma 1. Předpokládané mezomerní a tautomerní struktury kinetinu a BAP

rtuťové kapce pouze čtyřmi elektrony. V tomto případě by však vlna adeninu musela být srovnatelná s čtyřelektronovou vlnou *m*-nitrobenzoové kyseliny. Uvedené výsledky však ukazují, že i v případě polarografické redukce adeninu je elektrodový děj šestielektronový.

V souladu s navrženým mechanismem elektroredukce adeninu<sup>7</sup> lze u cytokininů předpokládat redukci dvojných vazeb N(1)=C(6) a C(2)=N(3) a odštěpení benzylaminu a furfurylaminu v poloze 6. Benzylamin ( $m/z = 108,1$ ), jeho štěpné produkty a purin ( $m/z = 121,1$ ) jako meziprodukt coulometrické redukce roztoku BAP byly identifikovány hmotnostní spektrometrií. Problémem zůstává, v které fázi redukce dochází k odštěpení aminoderivátu. Mohou nastat dvě varianty (schéma 2):

- a) odštěpení aminoderivátu může nastat v první třetině redukce, tedy po vzniku 1,6- dihydroderivátu (*I*),
- b) nebo až po další dvouelektronové redukci, tzn. po vzniku 1,2,3,6-tetrahydroderivátu (*III*).

Jako první by měla podléhat redukci dvojná vazba C(6)=N(1), neboť zde je předpokládaná protonizace, a tedy i vstup prvního elektronu. V případě varianty (*a*) vzniká po dvouelektronové redukci útvar energeticky labilní v důsledku zvýšené elektronové hustoty v oblasti vazby 1,6. Odštěpením substi-

tuentu v poloze 6 dojde ke stabilizaci molekuly a k obnově dvojných vazeb C(6)=N(1) za vzniku purinu (*II*). Vzniklý purin není od elektrody odstraňován a podléhá elektrochemické přeměně. Jelikož elektrochemická reakce probíhá u potenciálu druhé vlny purinu, musí se jeho redukce uskutečnit v jediném kroku a bude čtyřelektronová. U varianty (*b*) se předpokládá odštěpení aminoderivátu až po vzniku 1,2,3,6-tetrahydroderivátu. V tomto případě by bylo možné očekávat vznik dvou vln, jako je tomu u purinu či methylpurinu<sup>7</sup>. Tyto vlny však nalezeny nebyly.

Sledována byla také adsorpce cytokininů na rtuťové kapkové elektrodě s cílem zvýšení citlivosti voltametrického stanovení. Elektrokapilární křivky, měřené v McIlvainově (pH 4,54) a acetátovém pufru (pH 4,4), v kyselině chlorovodíkové ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ ) a kyselině citronové ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ ) vykazují jen velmi malé rozdíly v povrchovém napětí u roztoků bez a s cytokininem. Vyplývá z toho, že adsorpce sledovaných látek na rtuťové elektrodě je malá. Tentýž výsledek poskytují i křivky cyklické voltametrie pro různé rychlosti polarizace elektrody. Závislosti  $\log i_p = f(\log v)$  cytokininů, kde  $v$  je rychlost polarizace elektrody v rozmezí 20–2500  $\text{mV.s}^{-1}$ , v roztocích McIlvainových pufrů jsou sice přímkové, avšak směrnice jsou vzdáleny hodnotám odpovídajícím zlogaritmovanému vztahu

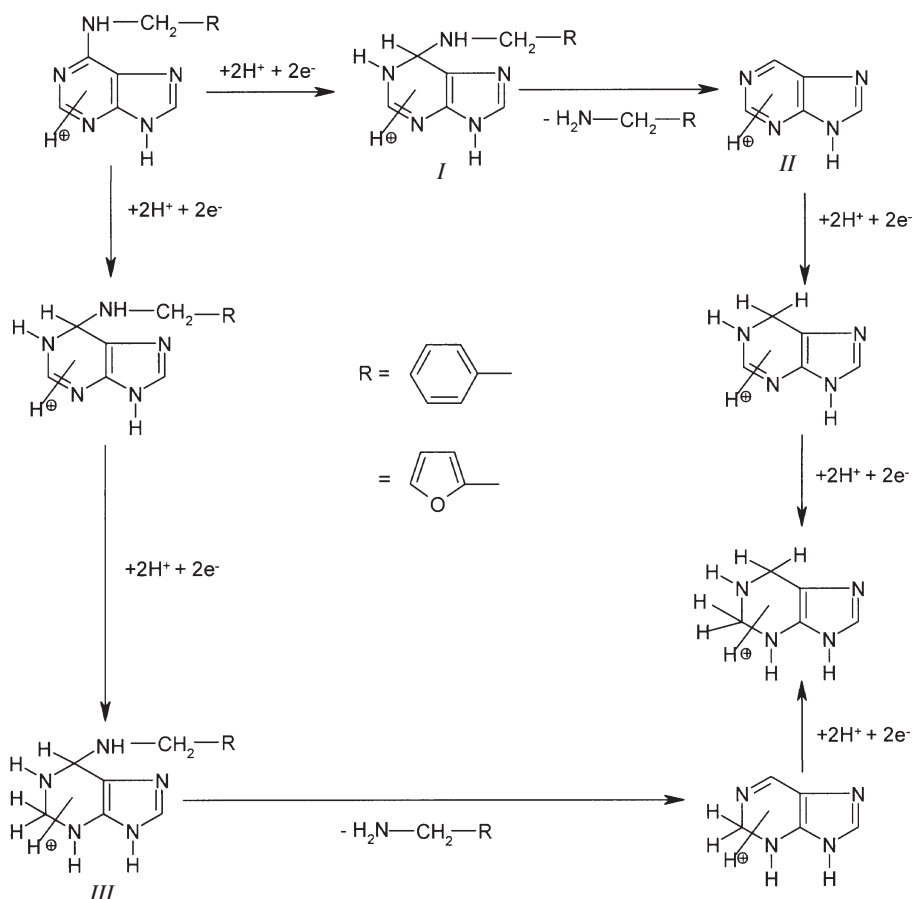


Schéma 2. Možné varianty elektrochemické redukce kinetinu a BAP

(I) pro adsorpční děj<sup>10</sup> při maximálním pokrytí  $\Gamma_0$  elektrody analytem.

$$i_p = \frac{z^2 F^2}{4RT} \cdot \nu A \Gamma_0 \quad (I)$$

Tabulka III

Závislosti logaritmu proudu CV-příků na logaritmu rychlosti polarizace elektrody ( $c = 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , 10 % v/v methanol,  $\nu = 20\text{--}2500 \text{ mV.s}^{-1}$ )

Látka	pH	Rovnice přímky	Podíl adsorpce [%]
Kinetin	2,6	$y = 0,5672x + 1,8735$	13,4
	4,84	$y = 0,6709x + 1,2495$	34,2
BAP	2,6	$y = 0,5794x + 2,1294$	15,9
	4,45	$y = 0,6574x + 1,8569$	31,5

Směrnice se pohybuje kolem hodnoty 0,6. Pouze v alkalickéjším prostředí, kde převažuje neprotonovaná forma cytokininů, je adsorpce poněkud výraznější (tabulka III). Avšak

z důvodů nízké proudové odezvy v mírně kyselém prostředí není adsorpce ani v tomto případě analyticky využitelná.

Pro kvantitativní analýzu tedy byla použita metoda FSDPV. Kalibrační přímky získané v různých elektrolytech jsou přímkové v široké koncentrační oblasti. Jako nejvhodnější elektrolyt byla vybrána 0,05 M-kyselina citronová (pH 2,3), kde oba cytokiny poskytují úzké, vysoké píky a nejnižší detekční limity d.l. =  $2,3 \text{ ng.ml}^{-1}$  ( $1,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ ) u kinetinu a  $7,88 \text{ ng.ml}^{-1}$  ( $3,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ ) u BAP. Kyselina citronová, jako základní elektrolyt, byla také použita ke stanovení kinetinu a BAP v modelových vzorcích a v reálných vzorcích média pro kultivaci rostlin *in vitro*. U voltametrického stanovení bylo dosaženo relativní směrodatné odchylky  $s_r < 10 \%$ . Jelikož média obsahují různé organické a anorganické látky nezbytné pro růst a vývoj rostlin, bylo nutné vzorky médií před voltametrickým stanovením přefiltrat a stanovený analyt zakonzentrovat. K tomuto účelu byly použity chromatografické metody (iontově výměnná, gelová, adsorpční a afinitní) – schéma 3.

## Závěr

Redukce kinetinu a BAP na rtuťové elektrodě probíhá

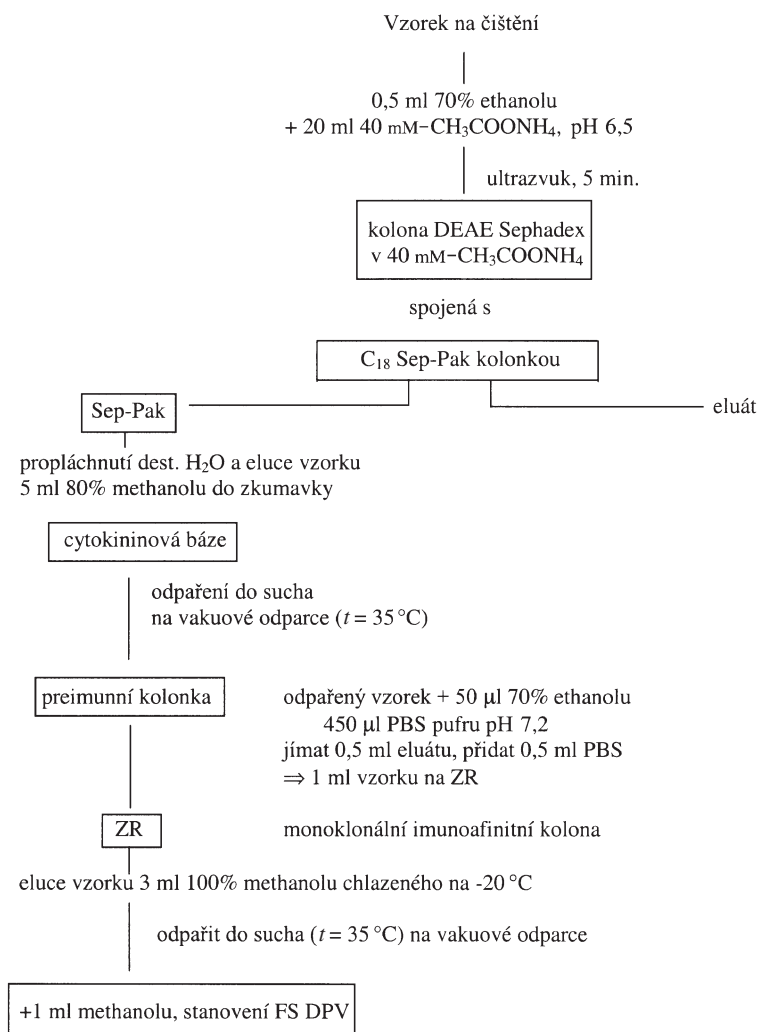


Schéma 3. Postup čištění média a izolace cytokininu

v kyselém prostředí, je šestielektronová a ireverzibilní. Místa redukce jsou vazby N(1)-C(6) a C(2)-N(3) pyrimidinového jádra. V důsledku odstěpení aminu z vedlejšího řetězce se obnoví jedna z původních aktivních vazeb a následuje poslední dvouelektronový krok. Na mechanismu elektrodové reakce se uplatňuje protolytická rovnováha. Redukce je reprezentována jednou difuzní dc vlnou, resp. jedním dp-píkem. Adsorpce studovaných cytokininů je na rtuťové elektrodě malá a není vhodná pro analytické využití. Kvantitativní analýza byla tedy provedena technikou FSDPV. Kinetin a BAP byly stanoveny v modelových vzorcích a také v reálných vzorcích média používaných pro kultivaci rostlin *in vitro*. Porovnáním směrodatné odchylky voltametrického stanovení fytohormonů s používanými biotesty vyplynulo, že voltametrické stanovení je přesnější ( $s_r < 10\%$  u voltametrického stanovení,  $s_r \approx 40\%$  u biotestů).

Autoři děkují Grantové agentuře ČR (grant č. 203/99/1511) za finanční podporu.

#### LITERATURA

- Gallo R. C., Whang-Peng J. Perry S.: *Science* 165, 400 (1969).
- Gallo R. C., Hechst S. M., Whang-Peng J., O'Happ S.: *Biochim. Biophys. Acta* 281, 248 (1972).
- Suk D., Simpson C. L., Mihick E.: *Cancer Res.* 30, 1429 (1970).
- Strnad M., Veselý J., Hajdúch M., Havlíček L., Rypka M., Kryštof V., Hanuš J., Weigl E., Lenobel R., Macháček J.: *Zprav. Klin. Farmakol. Farmac.* 12, 10 (1998).
- Smith D. L., Elving P. J.: *Anal. Chem.* 34, 930 (1962).
- Smith D. L., Elving P. J.: *J. Amer. Chem. Soc.* 84, 1412 (1962).
- Janik B., Elving P. J.: *Electrochem. Soc.* 116, (8), 1087 (1969).
- Dryhurst G., Elving P. J.: *Talanta* 16, 855 (1969).
- Smyth M. R., Kell D. B.: *J. Electroanal. Chem.* 122, 363 (1981).



10. Gosser D. K., Jr.: *Cyclic Voltammetry*. VCH, New York 1993.

**R. Hušková<sup>a</sup>, D. Pěchová<sup>b</sup>, M. Kotouček<sup>a</sup>, and K. Lemr<sup>a</sup>**  
(<sup>a</sup>*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University*, <sup>b</sup>*Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Olomouc*): **Voltammetric Behaviour and Determination of Some Cytokinines on Mercury Electrode**

Electrochemical behaviour of 6-(furfurylamino)purine (kinetin) and 6-(benzylamino)purine (BAP) on a mercury electrode was studied using classic DC polarography, cyclic voltam-

metry and fast-scan differential pulse voltammetry (FSDPV). The six-electron reduction of the mentioned cytokinines is irreversible and proceeds only in the protonated form. The electrode process starts with four-electron reduction of the pyrimidine skeleton. As a result of elimination of the amine from the side chain, one of the electrochemically active bond is re-established and the last two-electron step follows. The dissociation constants of the oxidized forms determined using UV spectrometry are:  $pK_a = 3.73 \pm 0.16$  (kinetin) and  $pK_a = 4.16 \pm 0.19$  (BAP). Kinetin and BAP were determined using FSDPV in model samples as well as in real samples of the medium used for cultivation of plants *in vitro*. The analyte was concentrated by ion exchange, gel permeation, adsorption or affinity chromatography. The voltammetric determination is more precise in comparison with the used biotests.

## STANOVENÍ NANOMOLÁRNÍCH KONCENTRACÍ ANTHRACYKLINOVÝCH ANTIBIOTIK KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU S UV DETEKČÍ\*

ALEŠ GAVENDA<sup>a</sup>, JURAJ ŠEVČÍK<sup>a,b</sup>  
a JITKA PSOTOVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc, e-mail: gavenda@prfnw.upol.cz,

<sup>b</sup>Centrum analytické chemie molekulárních struktur, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 26 Olomouc, <sup>c</sup>Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Došlo dne 10.IV.2000

Klíčová slova: anthracyklinová antibiotika, kapilární elektroforéza, UV detekce

### Úvod

Vysokoučinná kapilární elektroforéza (HPCE) je metoda, kterou lze separovat látky s velice podobnou strukturou ve velmi krátkém čase. Velkou výhodou kapilární elektroforézy je vysoká účinnost separace a velmi malé objemy vzorku. S výhodou lze tuto metodu využít pro analýzy vzorků s relativně bohatou maticí, tedy zejména biologických vzorků.

Jako každá analytická metoda má však i kapilární elektroforéza své nedostatky. Jedním z nich je relativně vysoká mez detekce při použití UV/VIS detektoru, který se v HPCE běžně využívá. Koncentrační citlivost se u těchto detektorů pohybuje řádově v jednotkách až desítkách  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Zvýšení citlivosti lze dosáhnout několika způsoby. Prvním z nich je použití jiného detektoru. Ideálním řešením se jeví využití detektoru s laserem indukovanou fluorescencí<sup>1,2</sup> (LIF). Tento způsob detekce vyniká zejména svou vysokou citlivostí, která se pohybuje v řádu  $10^{-9}$   $\text{mol.l}^{-1}$ . Nevýhodou laserem indukované fluorescence je však relativně vysoká pořizovací cena, která brání jejímu většímu rozšíření.

Druhou možností zlepšení detekce je zakoncentrování analytu. Toho lze dosáhnout například zakoncentrováním na kolonce (SPE), avšak u tohoto způsobu prekoncentrace vzorku je nutné provést optimalizaci.

Výhodnější metodou zakoncentrování analytu je on-line prekoncentrace, což je vlastně zakoncentrování v průběhu vlastní analýzy. V odborné literatuře jsou podrobně popsány tři základní možnosti on-line prekoncentrace. První z nich je přechodná izotachoforéza<sup>3,4</sup>, jejíž princip spočívá v zakoncentrování analytu v izotachoforetickém módu. V průběhu izotachoforetické prekoncentrace se analyty ze vzorku separují do úzkých zón a ionty, které byly původně v nízké koncentraci, jsou zakoncentrovány řádově na koncentraci vedoucího elek-

trolytu. Po zakoncentrování je koncový elektrolyt nahrazen vedoucím elektrolytem a analýza pokračuje v módu zónové elektroforézy.

Další popsanou on-line prekoncentrací je využití tzv. stacking efektu (z angl. stack – nahromadit)<sup>5-8</sup>. Je to velmi jednoduchá prekoncentrační technika velmi často používaná v kapilární elektroforéze. Tímto způsobem lze zakoncentrovat i větší objemy vzorku do úzké zóny.

Posledním z publikovaných on-line prekoncentračních postupů je využití tzv. sweeping efektu (z angl. zametání). Je to speciální prekoncentrační technika používaná v micelární elektrokinetické chromatografii<sup>9,10</sup> (MEKC). Tento způsob se používá pro neutrální analyty s velkou afinitou k pseudostacionární fázi. Princip prekoncentrace, jak už je z názvu patrné, spočívá v prostupování pseudostacionární fáze dlouhou zónou vzorku, při kterém pseudostacionární fáze před sebou sbírá (zametá) neutrální analyty do úzké zóny, čímž dochází k žádanému zakoncentrování vzorku. Analyty v této úzké zóně se v dalším průběhu analýzy od sebe separují do zón, které jsou detegovány. Tento princip je velmi jednoduchý a účinný, avšak je použitelný pouze v micelární elektrokinetické chromatografii.

### Anthracyklinová antibiotika

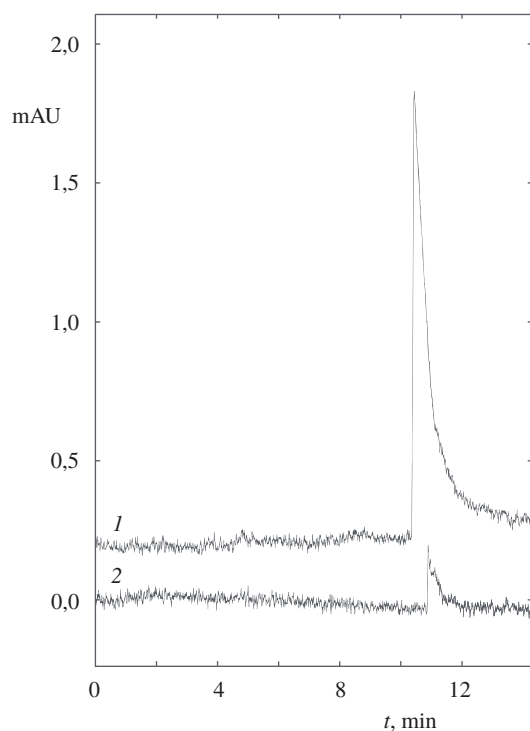
Tato skupina látek byla objevena a izolována v 60. letech z kultur plísně *Streptomyces peuceitius varietas Caesius*. Ve druhé polovině šedesátých let pak některé z nich našly uplatnění při léčbě onkologických onemocnění. Mezi nejvýznamnější z nich patří doxorubicin, daunorubicin a idarubicin. Tato léčiva mají řadu negativních účinků, zejména však mají za následek poškození srdečního svalu.

Zejména z důvodu kardiotoxicity je nutné monitorovat hladinu anthracyklinových antibiotik a jejich metabolitů v plazmě. Pro stanovení hladiny anthracyklinů se v minulosti používaly nejčastěji metody měření celkové fluorescence po extrakci okyseleným ethanolem<sup>11,12</sup>, tenkovrstvá chromatografie s fluorescenční detekcí<sup>12,13</sup> a radioimunoanalýza<sup>11,14</sup> (<sup>3</sup>H). Od poloviny sedmdesátých let byly tyto metody postupně nahrazovány citlivějšími a selektivnějšími metodami. Obsah anthracyklinů v plazmě se pohybuje ve velmi malých koncentracích, řádově v desítkách až stovkách nanomolů na litr. Analýzu navíc znesnadňuje relativně složitá matrice reálných vzorků.

V dnešní době se pro stanovení hladiny anthracyklinů v plazmě používají výhradně separační metody a to vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční nebo elektrochemickou detekcí<sup>15-17</sup> a vysokoúčinná kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí<sup>18,19</sup> (LIF).

Cílem práce bylo navržení alternativního analytického postupu pro stanovení nízkých koncentrací anthracyklinových antibiotik v modelových vzorcích kapilární elektroforézou s UV/VIS detekcí, která by s úspěchem využila fyzikálně-chemických vlastností analytů a odstranila problémy, které se u používaných metod vysokoúčinné kapilární elektroforézy s použitím LIF detekce vyskytují. Jsou to především sorpce analytu na stěnu křemenné kapiláry a problematická reprodukovatelnost elektrokinetického nástřiku.

\* Tato práce získala 3. místo v soutěži o cenu firmu Merck za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie 2.2.2000 v Brně



Obr. 1. Separace doxorubicinu v kationtovém módu; pufr fosfát  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  pH 2,5, 20 % methanolu (v/v), standardní roztok doxorubicinu o koncentraci  $10^{-4}$  (1) a  $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  (2), nástřik 1 s hydrodynamicky, separační napětí 30 kV

## Experimentální část

### Chemikálie

Všechny použité látky byly čistoty p.a. od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA). Standardy anthracyklinových antibiotik byly získány jako dar firmy Pharmacia & Upjohn S.p.A., Itálie. Standardní roztoky anthracyklinových antibiotik byly připraveny pro hydrodynamické dávkování v základním elektrolytu a pro elektrokinetické dávkování ve směsi rozpouštědel acetonitril–voda (95:5 v/v).

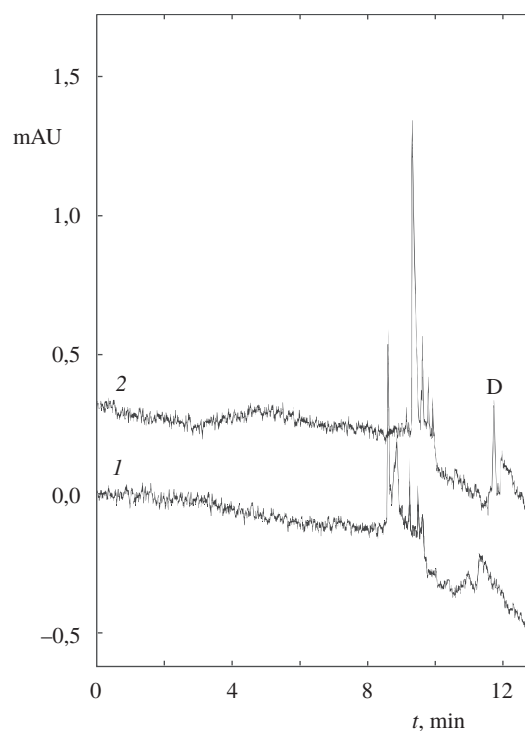
### Aparatura a experimentální podmínky

Měření bylo prováděno na přístroji Spectra PHORESIS 100 s rychle snímajícím UV/VIS detektorem SpectraFOCUS (TSP). Pro měření byla použita nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem  $50 \mu\text{m}$  o celkové délce 75 cm (efektivní délka 40 cm). Aplikované separační napětí bylo 30 kV. Všechny analýzy byly prováděny při laboratorní teplotě ( $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$ , pH 2,5 s obsahem 20 % methanolu (v/v). Ve vstupní části byl fosfátový pufr  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$ , pH 2,5 s obsahem  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  dodecylsulfátu sodného a 20 % methanolu.

### Popis „on-line“ prekoncentrace

Fosfátový pufr pH 2,5 umožňuje kladnou ionizaci anthracyklinů, proto bylo elektrokinetické dávkování vzorku prováděno



Obr. 2. Elektroforeogram doxorubicinu s elektrokinetickým dávkováním; pufr fosfát  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  pH 2,5,  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  SDS, 40 % methanolu (v/v), standardní roztok doxorubicinu s koncentrací  $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$  ve směsi acetonitril–voda v poměru 95:5 (v/v), elektrokinetický nástřik 50 s při 30 kV, separační napětí 30 kV; 1 – slepý pokus (acetonitril–voda 95:5 v/v), 2 – doxorubicin (D)  $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$

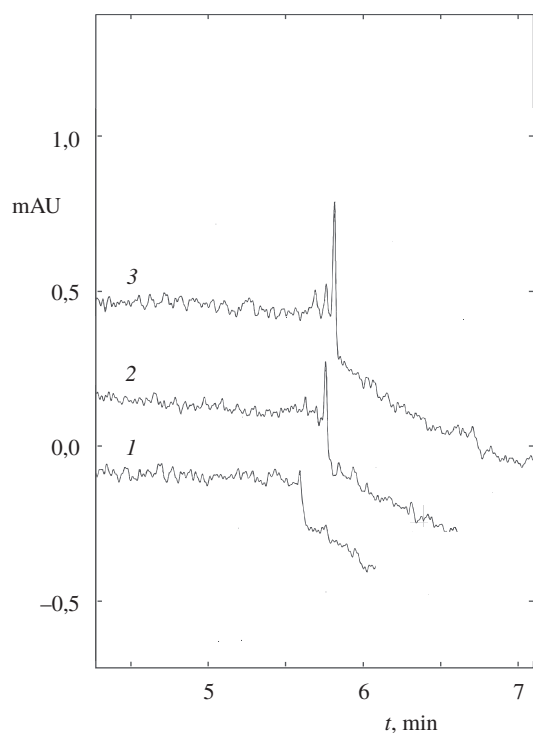
děno při kladné polaritě elektrod. Při hydrodynamickém dávkování analytu byla vzorkem naplněna téměř celá efektivní délka kapiláry.

Vlastní analýza pak byla prováděna v aniontovém módu (záporně nabitá vstupní elektroda). V inletové části byl fosfátový pufr s obsahem dodecylsulfátu sodného (SDS). V průběhu analýzy migruje kladně nabitý analyt k inletové konci kapiláry a proti němu migruje zóna záporně nabitého SDS, který na rozhraní se zónou vzorku tvoří komplexy s anthracykliny. Tyto komplexy pak díky celkovému efektivnímu zápornému náboji migrují k detektoru.

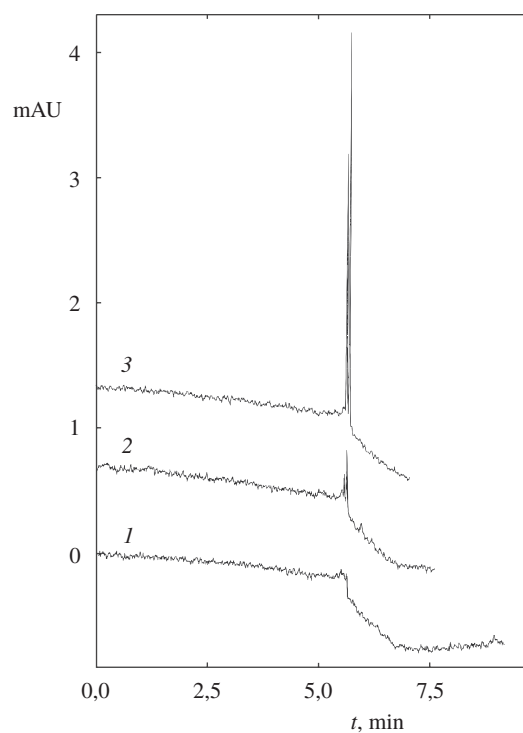
## Výsledky a diskuse

Při zakoncentrování s využitím tzv. sweeping efektu jsme použili oba běžně využívané způsoby dávkování vzorku do kapiláry. Tedy jak elektrokinetické, tak i hydrodynamické dávkování.

Dosažené detekční limity ilustrují obrázky 2 a 3. V případě elektrokinetického dávkování vzorku je dosažený limit detekce  $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$ . Při použití hydrodynamického nástřiku vzorku je dosažený limit detekce  $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ . Ve srovnání s limitem detekce při analýze kapilární elektroforézou bez on-line prekoncentrace (obr. 1), který byl s použitím UV/VIS detektoru  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , je zvýšení citlivosti UV/VIS detekce velmi výrazné. Při analýze bez tzv. sweeping prekoncentrace se



Obr. 3. **Elektroforeogram doxorubicinu s hydrodynamickým dávkováním**; pufr fosfát  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  pH 2,5,  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  SDS, 20 % methanolu (v/v), standardní roztok doxorubicinu v základním elektrolytu, nástřik tlakem 20 s, separační napětí 30 kV; 1 – slepý pokus (základní elektrolyt), 2 – doxorubicin  $1.10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ , 3 – doxorubicin  $5.10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$



Obr. 4. **Separace modelové směsi doxorubicinu (DOX) a daunorubicinu (DAU)**; pufr fosfát  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  pH 2,5,  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  SDS, 20 % methanolu (v/v), nástřik tlakem 20 s, separační napětí 30 kV; 1 – slepý pokus (základní elektrolyt), 2 – modelová směs  $1.10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$ , 3 – modelová směs  $1.10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$

navíc uplatňuje silná sorpce anthracyklinů na stěnu kapiláry. Velkou výhodou „sweeping“ efektu je kromě samotné prekoncentrace také odstranění již naadsorbovaného analytu. Odstranění sorpce na kapiláru je velkou výhodou zejména při využití elektrokinetického nástřiku vzorku, protože sorpcí analytu na stěnu kapiláry se značně měnil charakter povrchu kapiláry a způsoboval špatnou reprodukovatelnost elektroosmotického toku a tím také elektrokinetického nástřiku. Také se výrazně zlepšila reprodukovatelnost migračních časů anthracyklinů.

Další výhodou je také skutečnost, že i přes velkou zónu vzorku při hydrodynamickém dávkování nedochází k výraznému zhoršení či úplné ztrátě separace jednotlivých anthracyklinů (obr. 4).

## Závěr

Prezentovaná metoda on-line prekoncentrace s využitím tzv. sweeping efektu umožňuje rychlé, jednoduché a účinné zakoncentrování anthracyklinových antibiotik. Tato prekoncentrace umožňuje využití UV/VIS detektoru pro stanovení anthracyklinů a mohla by být alternativou k běžně používaným metodám stanovení anthracyklinových antibiotik v plazmě.

Autoři děkují grantům MŠMT ČR VŠ 96021 a MSM 153100013 za podporu této práce.

## LITERATURA

- Hempel G., Haberland S., Schulze-Westhoff P., Möhling N., Blaschke G., Boos J.: *J. Chromatogr. B* 698, 287 (1997).
- Hempel G., Schulze-Westhoff P., Flege S., Laubrock N., Boos J.: *Electrophoresis* 19, 2939 (1998).
- Foret F., Sustacek V., Boček P.: *J. Microcol. Sep.* 2, 229 (1990).
- Křivánková L., Gebauer P., Boček P.: *J. Chromatogr. A* 716, 35 (1995).
- Chien R. L., Burgi D. S.: *Anal. Chem.* 64, 1046 (1992).
- Gebauer P., Thormann W., Boček P.: *J. Chromatogr.* 608, 47 (1992).
- Gebauer P., Thormann W., Boček P.: *Electrophoresis* 16, 2039 (1995).
- Burgi D. S., Chien R. L.: *Anal. Chem.* 63, 2042 (1991).
- Quirino J. P., Terabe S.: *Science* 282, 465 (1998).
- Quirino J. P., Terabe S.: *Anal. Chem.* 71, 1638 (1999).
- Israel M., Pegg W. J., Wilkinson P. M., Garnick M. B.: *J. Liquid Chromatogr.* 1, 795 (1978).
- Eksborg S., Ehrsson H., Andersson B., Beran M.: *J. Chromatogr.* 153, 211 (1978).
- Hulhoven R., Desager J. P.: *J. Chromatogr.* 125, 369 (1976).
- Oosterbaan M. J. M., Dirks R. J. M., Vree T. B., Van der Kleijn E.: *J. Chromatogr.* 306, 323 (1984).

15. Breda M., Basileo G., Fonte G., Long J., James C. A.: *J. Chromatogr. A* 854, 81 (1999).
16. Shim H. J., Lee E. D., Yoon E. J., Lee S. D., Kim W. B., Yang J., Lee M. G.: *J. Chromatogr. B* 656, 407 (1994).
17. Van Lancker M. A., Nelis H. J. C. F., De Leenheer A. P.: *J. Chromatogr.* 254, 45 (1983).
18. Hempel G., Haberland S., Schulze-Westhoff P., Möhling N., Blaschke G., Boos J.: *J. Chromatogr. B* 698, 287 (1997).
19. Hempel G., Schulze-Westhoff P., Flege S., Laubrock N., Boos J.: *Electrophoresis* 19, 2939 (1998).

**A. Gavenda<sup>a</sup>, J. Ševčík<sup>a,b</sup>, and J. Psotová<sup>c</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký Univer-*

*sity,* <sup>b</sup>*Center of Analytical Chemistry of Molecular Structures, Faculty of Medicine, Palacký University,* <sup>c</sup>*Institute of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc*): **Determination of Nanomolar Concentrations of Anthracyclines by Capillary Electrophoresis with UV Detection**

On-line preconcentration was used to get better UV detection limits in capillary electrophoresis. The sweeping effect in micellar electrokinetic chromatography was used to detect trace amounts of the biologically active group of anthracyclines in model samples. The improved sweeping preconcentration technique provides for excellent detection limits decreasing down to concentration  $10^{-9}$  mol.l<sup>-1</sup>.

**HPLC SEPARACE GENOTOXICKÝCH DERIVÁTŮ  
NAFTALENU\*****VERONIKA QUAISEROVÁ, JIŘÍ ZIMA  
a JIŘÍ BAREK***UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, ka-  
tedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita  
Karlova, Albertov 2030, 128 43 Praha 2*

Došlo dne 10.V.2000

---

**Klíčová slova:** HPLC, separace, naftalen, aminonaftaleny,  
hydroxynaftaleny, nitronaftaleny, optimalizace

---

**Úvod**

V současné době se do popředí zájmu environmentálních, lékařských a chemických věd dostává otázka vlivu chemických karcinogenů a mutagenů v životním a pracovním prostředí na zdraví lidské populace. Naftalen a jeho nitro- a aminoderiváty patří k prokázaným chemickým mutagenům<sup>1-3</sup>, navíc 2-aminonaftalen je prokázaný karcinogen<sup>4</sup>. Metabolicky jsou transformovány na odpovídající hydroxyderiváty, které lze využít při biologickém monitorování expozice těmto škodlivým látkám<sup>5,6</sup>. Proto roste poptávka po citlivých a selektivních metodách stanovení těchto látek ve složitých environmentálních i biologických matricích<sup>7-10</sup>. V předkládané práci byla věnována pozornost HPLC metodě rozdělení směsi naftalenu, 1-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu, 1-nitronaftalenu, 2-aminonaftalenu, 2-hydroxynaftalenu a 2-nitronaftalenu. Při hledání optimálních podmínek separace bylo využito kombinace predikce chromatografického chování studovaných látek pomocí programu ChromSword<sup>®</sup> s experimentálním ověřením předpověděných dat a upřesněním navržených podmínek. Program ChromSword<sup>®</sup> byl vyvinut firmou Merck pro optimalizaci podmínek separace v systému HPLC s reverzními fázemi, normálními fázemi a iontově-výměnnou HPLC<sup>11</sup>. Výhodou této kombinace je rychlé nalezení optimálních podmínek separace s minimální spotřebou drahých rozpouštědel během optimalizace<sup>12</sup>.

**Experimentální část****Aparatura**

K měření byl použit kapalinový chromatograf LaChrom (Merck Hitachi, SRN) sestavený z vysokotlaké pumpy L-7100, interface D-7000 a UV-detektoru L-7400, ovládací software HPLC systém Manager (Hitachi, Japan) v prostředí WinNT (Microsoft Corp.) Dávkováno bylo dávkovacím ven-

tilem Rheodyne 7725i (Rheodyne, USA) s 20  $\mu$ l smyčkou. Látky byly separovány na koloně LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18, 5  $\mu$ m, 125 mm  $\times$  4 mm I.D. (Merck, SRN) při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. Vzduch byl z mobilní fáze odstraněn pomocí ultrazvuku. K měření pH mobilní fáze bylo použito přístroje Conductivity and pH-meter 4330 (Jenway, Anglie) s kombinovanou skleněnou elektrodou. Dále byl použit chromatografický optimalizační program ChromSword<sup>®</sup> verze 1.0 (Merck, SRN).

**Reagencie**

Naftalen, 1-aminonaftalen, 2-aminonaftalen, 1-hydroxynaftalen, 2-hydroxynaftalen, 1-nitronaftalen, 2-nitronaftalen (vše Aldrich). Zásobní roztoky látek o koncentraci 1.10<sup>-3</sup> mol.l<sup>-1</sup> byly připraveny v methanolu p.a. (Lachema Brno), a byly uchovávány v temnu za laboratorní teploty. Pro chromatografii byl použit methanol a acetonitril „gradient grade“ (Merck Praha). Při sledování vlivu pH mobilní fáze na separaci byl použit fosfátový pufr tvořený 0,01 mol.l<sup>-1</sup> dihydrogenfosforečnanem sodným, jehož pH bylo upraveno koncentrovanou kyselinou fosforečnou na požadovanou hodnotu. K přípravě všech roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Q-plus Systém, Millipore, USA).

**Pracovní postupy**

K separaci naftalenu, 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu, 2-hydroxynaftalenu, 1-nitronaftalenu a 2-nitronaftalenu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Vzhledem k povaze studovaných látek byla pro separaci zvolena reverzní chromatografie na oktadecylové fázi chemicky vázané na silikagelu. Nalezení optimálních podmínek stanovení pro separaci bylo provedeno metodou postupné optimalizace jednotlivých složek a parametrů mobilní fáze klasickou experimentální metodou v kombinaci s chromatografickým optimalizačním programem ChromSword<sup>®</sup>.

Mobilní fáze byly připraveny mísením příslušných objemových dílů vodné složky a organického modifikátoru. Při studiu vlivu pH na separaci bylo pH mobilní fáze upravováno změnou pH vodné složky, takže údaje týkající se pH mobilní fáze udávají pH vodné složky mobilní fáze. Měřeny byly roztoky jak jednotlivých látek o koncentraci 1.10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup>, tak roztok směsi studovaných látek o koncentraci každé složky v roztoku 1.10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup>. Mrtvý čas byl stanoven pomocí 1.10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup> vodného roztoku dusičnanu sodného při 240 nm. Detekce jednotlivých látek probíhala při vlnových délkách jejich absorpčních maxim. Směs látek byla detegována při společné vlnové délce 285 nm. Použitá kolona LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 nebyla termostatována.

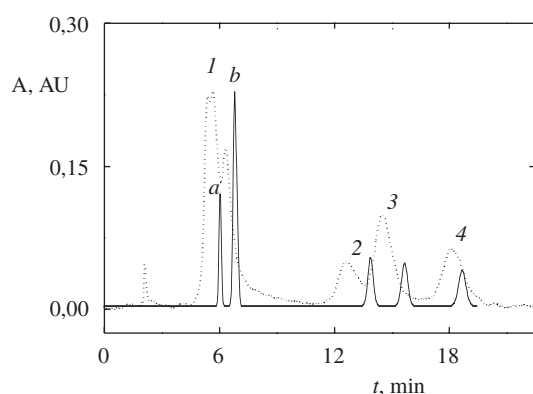
Při optimalizaci byla nejprve předpovězena separace studovaných látek v methanolu a následně také v acetonitrilu programem ChromSword<sup>®</sup>, do kterého byly zadány struktury všech stanovovaných látek, typ kolony a methanol (acetonitril) jako organický modifikátor. Z těchto údajů byla teoreticky vypočtena závislost logaritmu retenčních faktorů látek na obsahu methanolu (acetonitrilu) v mobilní fázi a byl navržen

\* Tato práce získala 3. místo v soutěži o cenu firmy Merck za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie 2.2.2000 v Brně

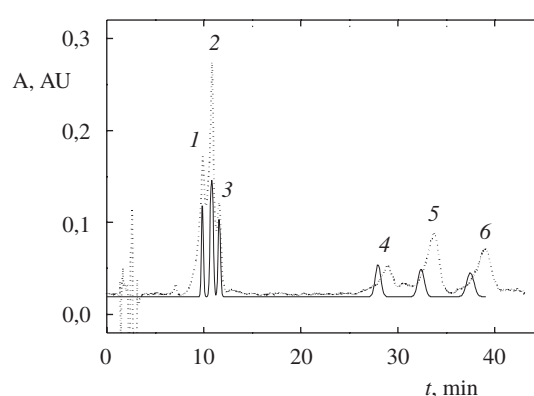
Tabulka I

Vliv obsahu methanolu v mobilní fázi na retenční časy ( $t_R$ , min) a logaritmy retenčních faktorů ( $\log k$ ) naftalenu, 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu, 2-hydroxynaftalenu, 1-nitronaftalenu, 2-nitronaftalenu

Analyt	% MeOH							
	90		85		75		65	
	$t_R$	$\log k$	$t_R$	$\log k$	$t_R$	$\log k$	$t_R$	$\log k$
Naftalen	3,64	0,23	5,12	0,45	9,02	0,75	18,23	1,09
1-Aminonaftalen	2,56	-0,05	2,78	0,03	3,72	0,23	5,51	0,48
2-Aminonaftalen	2,54	-0,05	2,79	0,03	3,72	0,23	5,57	0,49
1-Hydroxynaftalen	2,59	-0,04	3,09	0,11	4,07	0,29	6,45	0,57
2-Hydroxynaftalen	2,55	-0,05	3,23	0,14	3,77	0,24	5,75	0,50
1-Nitronaftalen	3,21	0,14	4,57	0,38	6,50	0,57	12,56	0,91
2-Nitronaftalen	2,63	-0,02	5,17	0,45	7,22	0,63	14,52	0,98



Obr. 1. Chromatogram směsi 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu, 2-hydroxynaftalenu (1), 1-nitronaftalenu (2), 2-nitronaftalenu (3) a naftalenu (4) v mobilní fázi methanol–voda (65:35) experimentálně stanovený (přerušovaná čára) a teoreticky vypočtený programem ChromSword® (plná čára), kde *a* je 2-hydroxynaftalen a *b* je směs 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu



Obr. 2. Chromatogram směsi 2-hydroxynaftalenu (1), 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu (2), 1-hydroxynaftalenu (3), 1-nitronaftalenu (4), 2-nitronaftalenu (5) a naftalenu (6) v mobilní fázi acetonitril–voda (40:60) experimentálně stanovený (přerušovaná čára) a teoreticky vypočtený programem ChromSword® (plná čára)

optimální obsah organického modifikátoru v mobilní fázi. Experimentální ověření výpočtu bylo provedeno měřením závislosti retenčních charakteristik jednotlivých látek na obsahu methanolu (acetonitrilu) v mobilní fázi. V každé mobilní fázi byla také nastříkováána směs naftalenu a jeho derivátů. Poté byl teoretický výpočet upřesněn zadáním experimentálně naměřených retenčních dat.

Při studiu vlivu pH na separaci je optimalizační program ChromSword® schopen zohlednit vliv pH na chromatografické chování látek až po zadání alespoň dvou hodnot experimentálně naměřených při dvou různých pH. Proto byly nejprve měřeny retence látek při pH 7, 5 a 3 v mobilní fázi acetonitril – fosfátový pufr o daném pH. Naměřená retenční data byla zadána do optimalizačního programu. Z údajů byla teoreticky vypočtena závislost logaritmu retenčních faktorů látek a také závislost rozlišení limitujícího páru na pH. Z těchto závislostí byla nalezena oblast pH, kde by mělo být rozlišení limitujícího páru dostatečné pro jejich oddělení. Následně byl výpočet experimentálně ověřen.

## Výsledky

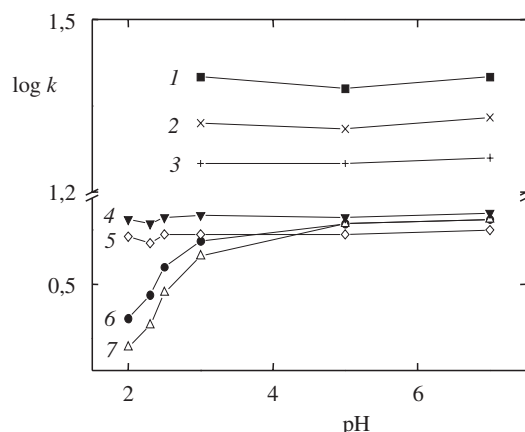
Vliv obsahu methanolu na eluční časy studovaných látek

Na chromatografické chování látek má rozhodující vliv obsah organického modifikátoru (rozpuštědla) v mobilní fázi. Pro počáteční experimenty byl zvolen jako organická složka mobilní fáze methanol. Nejprve bylo programem ChromSword® předpovězeno chromatografické chování studovaných látek v mobilní fázi methanol–voda. Tento program navrhl optimální obsah methanolu v mobilní fázi 68 %. Z teoretického výpočtu vyplynulo, že v této mobilní fázi by nemělo dojít k separaci všech složek dělené směsi. To bylo experimentálně potvrzeno měřením závislosti retenčních dat analytů na obsahu methanolu v mobilní fázi. Zjištěné retence látek a logaritmy jejich retenčních faktorů  $\log k = \log [(t_R - t_M)/t_M]$  jsou uvedeny v tabulce I, ze které je patrné, že retence všech studovaných látek se snižují s rostoucím obsahem methanolu v mobilní fázi. Následně byl teoretický výpočet upřesněn vložení experimentálně stanovených dat. Obsah methanolu

Tabulka II

Vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenční časy ( $t_R$ , min) a logaritmy retenčních faktorů ( $\log k$ ) naftalenu, 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu, 2-hydroxynaftalenu, 1-nitronaftalenu, 2-nitronaftalenu

Analyt	% MeCN													
	90		85		75		65		55		45		40	
	$t_R$	$\log k$	$t_R$	$\log k$	$t_R$	$\log k$	$t_R$	$\log k$	$t_R$	$\log k$	$t_R$	$\log k$	$t_R$	$\log k$
Naftalen	3,31	0,09	4,01	0,23	5,24	0,42	7,43	0,62	11,81	0,86	22,84	1,18	39,39	1,38
1-Aminonaftalen	2,59	-0,13	2,85	-0,04	3,23	0,10	3,91	0,24	5,21	0,42	7,84	0,65	10,93	0,78
2-Aminonaftalen	2,60	-0,13	2,84	-0,02	3,22	0,10	3,89	0,24	5,25	0,43	8,00	0,66	10,97	0,78
1-Hydroxynaftalen	2,57	-0,14	2,67	-0,10	3,09	0,06	3,74	0,20	5,00	0,40	7,87	0,65	11,80	0,81
2-Hydroxynaftalen	2,53	-0,15	2,64	-0,11	2,99	0,03	3,51	0,16	4,57	0,34	6,81	0,58	10,04	0,73
1-Nitronaftalen	2,95	-0,01	3,46	0,12	4,32	0,30	5,89	0,49	9,13	0,73	17,22	1,04	29,25	1,25
2-Nitronaftalen	3,01	0,01	3,59	0,14	4,57	0,34	6,35	0,53	10,05	0,78	19,69	1,11	33,95	1,31

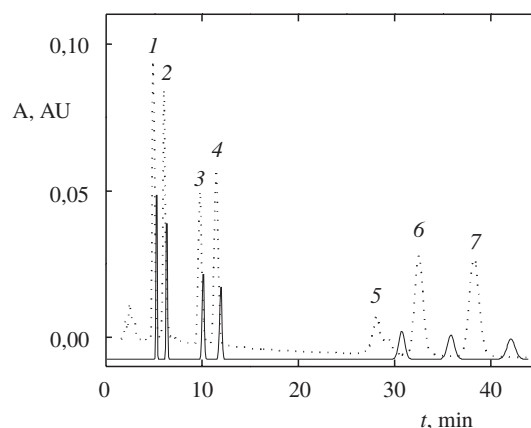


Obr. 3. Závislost logaritmu retenčních faktorů naftalenu (1), 2-nitronaftalenu (2), 1-nitronaftalenu (3), 1-hydroxynaftalenu (4), 2-hydroxynaftalenu (5), 1-aminonaftalenu (6) a 2-aminonaftalenu (7) na pH

v mobilní fázi byl optimalizován na 65 %, kde však došlo k úplnému oddělení pouze naftalenu a k částečnému oddělení 1-nitro- a 2-nitronaftalenu (viz obr. 1). Snížením obsahu methanolu pod 65 % by došlo k neúnosnému prodloužení retenčních časů. Vzhledem k nedostatečnému oddělení studovaných látek byla dále separace naftalenu a jeho derivátů studována v mobilní fázi acetonitril–voda.

#### Vliv obsahu acetonitrilu na eluční časy studovaných látek

V této fázi byla opět nejprve předpovězena separace látek programem ChromSword<sup>®</sup>, kterým byl navržen optimální obsah acetonitrilu v mobilní fázi 51 %. Z tohoto teoretického výpočtu vyplynulo, že by nemělo dojít ke zlepšení separace látek oproti separaci ve fázi methanol–voda. Teoretický výpočet byl opět ověřován měřením retenčních časů analytů v závislosti na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce II, ze které vyplývá, že retence všech látek se snižuje s rostoucím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi. Poté byl opět teoretický výpočet upřesněn vložím



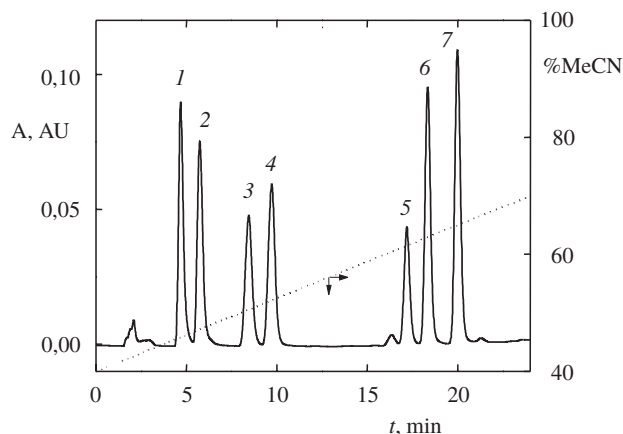
Obr. 4. Chromatogram směsi 2-aminonaftalenu (1), 1-aminonaftalenu (2), 2-hydroxynaftalenu (3), 1-hydroxynaftalenu (4), 1-nitronaftalenu (5), 2-nitronaftalenu (6) a naftalenu (7) experimentálně stanovený (přerušovaná čára) a teoreticky vypočtený programem ChromSword<sup>®</sup> (plná čára) v mobilní fázi acetonitril–fosfátový pufr o pH 2,3 (40:60)

experimentálně naměřených dat do optimalizačního programu. Obsah acetonitrilu v mobilní fázi byl optimalizován na 40 % (viz obr. 2). Z tohoto obrázku je patrné, že v této mobilní fázi oproti původní predikci došlo k úplné separaci naftalenu, 1-nitro- i 2-nitronaftalenu a také k částečnému oddělení 2-hydroxy- a 1-hydroxynaftalenu. Je patrné, že po vložení naměřených retenčních dat došlo ke zpřesnění teoretického výpočtu optimalizačního programu i když predikce úplného oddělení 2-hydroxynaftalenu a 1-hydroxynaftalenu nebyla experimentálně potvrzena. Snížení obsahu acetonitrilu pod 40 % by způsobilo výrazné prodloužení retenčních časů.

#### Vliv pH mobilní fáze

Vzhledem k tomu, že ani v mobilní fázi acetonitril–voda nedošlo k oddělení amino- a hydroxyderivátů naftalenu a protože tyto látky obsahují protonizovatelné a disociovatelné skupiny, byl dále studován vliv pH na jejich separaci. Protože optimalizační program ChromSword<sup>®</sup> je schopen zohlednit





Obr. 5. Chromatogram směsi 2-aminonafthalenu (1), 1-aminonafthalenu (2), 2-hydroxynafthalenu (3), 1-hydroxynafthalenu (4), 1-nitronafthalenu (5), 2-nitronafthalenu (6) a nafthalenu (7) s 24-min lineárním gradientem s obsahem 40 až 70 % acetonitrilu (pH vodné fáze 2,3). Přerušovanou čarou je vyznačen profil použitého gradientu

vliv pH na chromatografické chování látek až po zadání alespoň dvou hodnot experimentálně naměřených při dvou různých pH, byly nejprve měřeny retence látek při pH 7, 5 a 3. Všechna měření probíhala v mobilní fázi 40 % acetonitrilu – 60 % fosfátového pufru. S klesajícím pH byl pozorován vzrůst rozlišení píků amino- a hydroxyderivátů, ale k jejich úplnému oddělení nedošlo ani při pH 3. Naměřená retenční data byla zadána do optimalizačního programu a z údajů byla teoreticky nalezena oblast pH 2 až 2,6. Toto rozmezí pH bylo zvoleno tak, aby rozlišení všech separovaných látek bylo dostatečné a zároveň pH bylo vhodné pro použitou kolonu. Tato predikce byla experimentálně ověřena měřením retencí látek při pH 2,5, 2,3 a 2,0. Vliv pH na chromatografické chování studovaných látek znázorňuje obr. 3. Za daných experimentálních podmínek bylo zvoleno jako optimální pH 2,3, při kterém došlo k oddělení všech složek separované směsi nafthalenu a jeho derivátů (viz obr. 4).

#### Optimalizace gradientu

Za účelem zkrácení celkové doby separace látek v mobilní fázi 40 % acetonitrilu – 60 % fosfátového pufru o pH 2,3 byl studován vliv gradientu acetonitrilu na separaci. Na základě předběžných experimentů byl stanoven následující optimální gradient: lineární 24-minutový gradient s obsahem acetonitrilu od 40 do 70 % (viz obr. 5). Doba analýzy se zkrátila z původních 40 min na 21 minut.

#### Závěr

K separaci směsi nafthalenu, 1-aminonafthalenu, 2-aminonafthalenu, 1-hydroxynafthalenu, 2-hydroxynafthalenu, 1-nitrona-

ftalenu a 2-nitronafthalenu byly za použití kombinace predikce chromatografického chování studovaných látek pomocí programu ChromSword<sup>®</sup> s experimentálním ověřením předpověděných dat navrženy následující podmínky: kolona LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18, 24-minutový lineární gradient mobilní fáze s obsahem 40 až 70 % acetonitrilu; pH vodné složky mobilní fáze 2,3; průtoková rychlost mobilní fáze 0,5 ml.min<sup>-1</sup> a detekce při 285 nm.

*J. B. děkuje Grantové agentuře České republiky (grant č. 203/98/1187). J. Z. děkuje Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy (výzkumný záměr 113100002).*

#### LITERATURA

1. Moreira J. C., Barek J.: *Quimica Nova* 18, 362 (1995).
2. Barek J., Cvačka J., Moreira J. C., Zima J.: *Chem. Listy* 90, 805 (1996).
3. Barek J., Cvačka J., Mejstřík V., Muck A., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29, 81 (1999).
4. Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, sv. 4. IARC, Lyon 1974.
5. Barek J., Mejstřík V., Švagrová I., Zima J.: *Chem. Listy* 88, 341 (1994).
6. Andreoli R., Manini P., Bergamaschi E., Mutti A., Franchini I., Niessen W. M. A.: *J. Chromatogr. A* 847, 9 (1999).
7. Jäger J.: *J. Chromatogr.* 152, 575 (1978).
8. MacCrehan W. A., May W. E., Yang S. D., Benner B. A.: *Anal. Chem.* 60, 194 (1988).
9. Liu T.-Y., Robbat A., Jr.: *J. Chromatogr.* 539, 1 (1991).
10. Jacob J., Karcher W., Belliaro J. J., Dumler R., Boenke A.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 349, 755 (1991).
11. Galushko S. V.: *Instruction Manual for Program Version 1.0 ChromSword<sup>®</sup>*. Merck, Darmstadt 1996.
12. Quaiserová V.: *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2000.

**V. Quaiserová, J. Zima, and J. Barek** (*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Charles University, Prague*): **HPLC Separation of Genotoxic Derivatives of Naphthalene**

The following optimised conditions for the separation of naphthalene, naphthalen-1-amine, naphthalen-2-amine, 1- and 2-naphthols, and 1- and 2-nitronaphthalenes were found using a combination of the prediction of chromatographic behaviour of the tested substances with ChromSword<sup>®</sup> (Merck) optimisation software and experimental verification: LiChrospher<sup>®</sup> column, 24-min linear gradient, acetonitrile (40–70 %) – phosphate buffer, pH 2.3 (60–30 %), flow rate 0.5 ml.min<sup>-1</sup>, UV detection at 285 nm.

**PLAZMOVÁ TRYSKA PRO EMISNÍ SPEKTRÁLNÍ ANALÝZU\*****MARTIN SEMERÁD, MARTIN ŠTĚPÁN,  
VÍTĚZSLAV OTRUBA a VIKTOR KANICKÝ***Laboratoř plazmových zdrojů pro chemickou analýzu, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: semik@chemi.muni.cz*

Došlo dne 3.V.2000

Klíčová slova: plazmová tryska, radiofrekvenční plazma, optická emisní spektrometrie

**Úvod**

V dnešní době je jednou z nejpoužívanějších metod optické emisní spektrometrie (OES) metoda indukčně vázaného plazmatu (ICP). Spektrometry ICP-OES jsou provozně nákladné, což je dáno jednak náročným přístrojovým vybavením, jednak vysokou spotřebou pracovních plynů, obvykle argonu. Snížení provozních nákladů, tedy především snížení spotřeby argonu, lze dosáhnout konstrukčními úpravami plazmové hlavice pro minimalizaci průtoku plynů. V současných spektrometrech jsou plazmové hlavice optimalizovány natolik, že další výrazné snížení spotřeby argonu již není pravděpodobné. Zájem fyziků a analytických chemiků se nyní soustřeďuje na nové excitační zdroje, které by umožnily miniaturizaci celého zařízení a snížily provozní náklady.

Pracovníci katedry fyzikální elektroniky PřF MU sestrojili nový typ plazmové hlavice a nazvali ji plazmovou tužkou, kterou svým tvarem připomíná. Toto zařízení je vyvíjeno pro archeology – tryskající plazma (plazma-jet) vykazuje velmi dobré čistící schopnosti na různé archeologické artefakty<sup>1,2</sup>. Tato plazma byla rovněž zkoušena i jako derivatizační prostředek<sup>3</sup>.

Naše práce se zabývá studiem excitačních vlastností tryskající plazmy a možnostmi použití radiofrekvenční plazmové trysky (RPJ) jako zdroje záření v optické emisní spektrometrii.

**Experimentální část****Chemikálie**

Kalibrační roztoky Li a K byly připraveny z komerčních zásobních roztoků firmy Analytika, s. r. o., Praha, o koncentracích 1000 mg.l<sup>-1</sup>. Zásobní roztok 1000 mg.l<sup>-1</sup> Rb byl připraven z pevného RbCl p.a., Fluka, Švýcarsko.

Plazmový plyn argon byl čistoty 4,6 (99,996 %) firmy Messer Technogas, Česká republika.

**Přístroje**

Během experimentů byly použity dva typy generátorů – nízkovýkonový a vysokovýkonový:

*Nízkovýkonový* (nv) generátor byl sestaven na katedře fyzikální elektroniky a má pracovní frekvenci 27,12 MHz a výkon max. 100 W, přičemž dodaný výkon výboje se pohyboval v rozmezí 90–100 W.

K tomuto generátoru byl použit ladicí člen Versa Tuner, model MFJ-969 firmy MFJ Enterprises, Inc. s maximálním trvalým zatížením (CW) 100 W; pro provoz s modulovaným generátorem je přípustný špičkový výkon 300 W. S tímto tunerem bylo prováděno přizpůsobení výboje pomocí dvou otočných kondenzátorů a jedné ladicí cívky tak, aby poměr dodaný/odražený výkon (přesněji SWR – poměr stojatých vln) byl co největší. Hodnota SWR by měla být pokud možno menší než 1,5. Měřené hodnoty výkonu byly většinou asi 90–100 W pro dodaný výkon a asi 1–4 W pro výkon odražený.

*Vysokovýkonový* (vv) generátor byl komerční výrobek firmy International Plasma Corporation, model PM 101. Generátor pracuje na frekvenci 13,56 MHz a má plynule nastavitelný výkon do 1500 W. Běžný dodávaný výkon při experimentech se pohyboval okolo 150–220 W. Výkon výboje (měřeno na ladicím členu) byl asi 200 W.

K tomuto generátoru musel být použit výkonnější ladicí člen, a to Digital Antenna Tuner model HFT 1500 firmy VCI Vectronics<sup>TM</sup>, Valor Enterprises, Inc. Tento ladicí člen snese zatížení až 3000 W, a hodnoty dodaného/odraženého výkonu se pohybovaly v rozmezí 150–220/10–30 W.

Záření plazmatu bylo fokusováno na vstupní šterbinu dvojitého mřížkového monochromátoru GDM 1000 firmy Carl Zeiss Jena spojkou  $f = 80$  mm. Spektra byla zaznamenávána XY zapisovačem K 101.

Schéma kompletního zařízení znázorňuje obr. 1.

**Tabulka I**

Základní technické parametry obou typů výbojů

Frekvence generátoru [MHz]	27,12	13,56
Max. výkon generátoru [W]	100	1500
Max. zatížení ladicího členu [W]	300	3000
Max. dodaný výkon výboje [W]	100	250 <sup>a</sup>
Odražený výkon [W]	~1–4	~10–30
Průtok pracovního plynu – Ar [l.min <sup>-1</sup> ]	0,3–1,2	
Vnitřní průměr trysky [mm]	0,5–1,5	
Materiál špičky elektrody	mosaz, uhlík	
Integrační doba [s]	0,1–1	
Pozorovací mód	laterální	

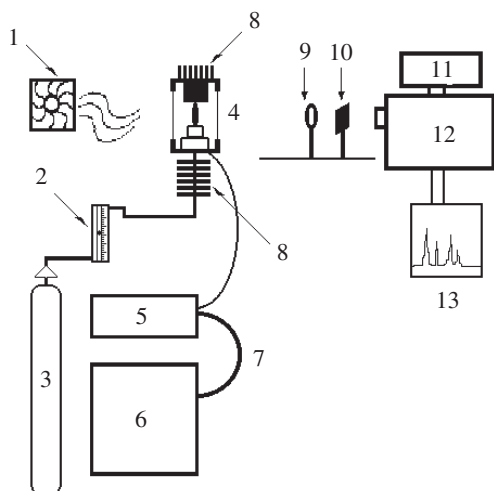
<sup>a</sup> Nad 250 W se objevuje nestabilita výboje

**Tryska**

Podle původních návrhů byla zkonstruována poněkud odlišná verze trysky, která umožňovala zavádění aerosolu vzorku a napojení na detekční systém. Tělo trysky bylo upraveno tak, aby bylo možno měnit špičky s různým vnitřním průměrem a zavádět aerosol vzorku.

Dále byla vyrobena speciální teflonová komora s okénky (obr. 2), která brání přístupu vzduchu k výboji. Při pokusech

\* Tato práce získala 3. místo v soutěži o cenu firmy Merck za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie 2.2.2000 v Brně



Obr. 1. Schéma zařízení radiofrekvenční plazmové trysky; 1 – ventilátor, 2 – průtokoměr, 3 – zásobník s argonem, 4 – cela s výbojem, 5 – ladicí člen, 6 – radiofrekvenční generátor, 7 – koaxiální kabel, 8 – žebrový chladič, 9 – čočka, 10 – filtr, 11 – zesilovač, 12 – monochromátor, 13 – XY-zapisovač

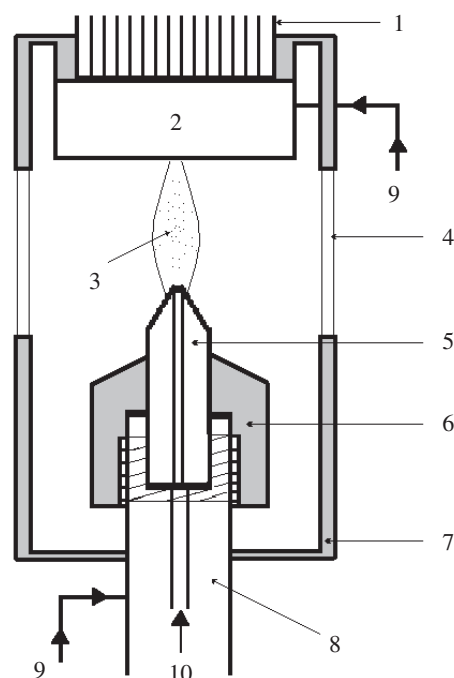
s výbojem v atmosféře se výboj z hlediska OES jeví jako značně nestabilní, ale hořet je schopen.

## Výsledky a diskuse

### Konstrukční úpravy a vlastnosti výboje

Hned na počátku se ukázalo, že frekvence 27,12 a 13,56 MHz vyzařované z obvodů plazmové trysky při nedokonalém impedančním přizpůsobení způsobují značné rušení dalších elektronických přístrojů, které byly umístěny v místnosti s RPJ. Proto bylo provedeno vř uzemnění všech kovových součástí aparatury do společného bodu a vstupy zesilovače signálu fotonásobiče byly odrušeny keramickými kondenzátory. I přes uvedená opatření není odstínění dokonalé a při špatném přizpůsobení výboje dochází k rušení měřicí aparatury. Při prvních experimentech se zjistilo, že při delším provozu dochází ke značnému zahřívání elektrod a proto bylo nutno elektrody opatřit žebrovými chladiči s nuceným chlazením ventilátorem. V tomto uspořádání již nedochází k přehřívání komory ani při několikahodinovém provozu.

Při použití vv generátoru by však výkon neměl překročit 300 W – nad tento výkon je už chlazení opět nedostatečné a může dojít k roztavení špičky elektrody a výboj je nestabilní. Pro experimenty s výkony nad 250 W by bylo nutné provést úpravy zlepšující chlazení elektrod. Pro měření byly k dispozici dvě sady vyměnitelných špiček z mosazi a grafitu o různém vnitřním průměru 0,5–1,5 mm. Při použití mosazné špičky byl výboj stabilnější zvláště při použití vv generátoru. U grafitové špičky při zvýšení výkonu generátoru nad 200 W došlo k jejímu značnému odprášení, zatím co mosazná špička zvládla tyto výkony bez jakéhokoliv pozorovatelného úbytku. Časem však i u mosazné elektrody dochází k postupnému opálení a vzniku černého povlaku oxidů, jehož větší vrstva způsobuje mírné zhoršení stability výboje.



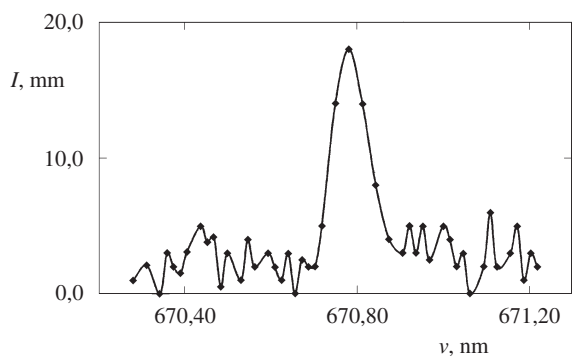
Obr. 2. Detail plazmové trysky; 1 – chladič, 2 – protielektroda, 3 – výboj, 4 – okénko, 5 – vyměnitelná špička, 6 – převlečná matice, 7 – teflonová komůrka, 8 – tělo trysky, 9 – přívod rf energie, 10 – přívod pracovního plynu s aerosolem vzorku

Dále byl studován vliv průměru trysky na tvar výboje. Bylo pozorováno, že tento parametr nemá zásadní vliv na průměr výboje. Průměr výbojového sloupce je stále stejný, ale při použití trysky s větším průměrem výboj nehoří z celého průměru trysky, ale na okraji, a to i při zvýšení průtoku argonu. Při použití trysek s malým vnitřním průměrem dojde při zvýšení průtoku argonu ke značnému syčení výboje a tento má tendenci se pohybovat po protielektrodě. Trysky s větším průměrem snášejí vyšší průtoky lépe. Při použití trysek s větším vnitřním průměrem bylo nutno kvůli stabilitě výkon snížit na hodnotu okolo 150 W. Během počátečních experimentů byla rovněž měněna vzdálenost mezi elektrodami a ukázalo se, že tento parametr nemá zásadní vliv na chování výboje.

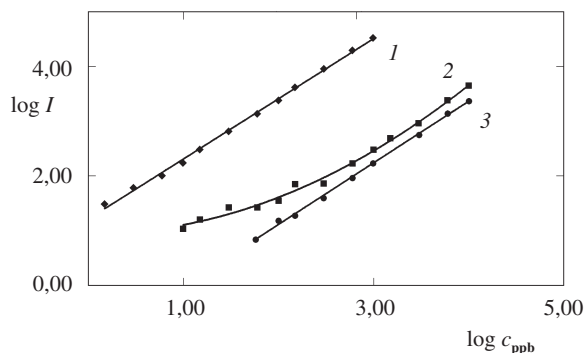
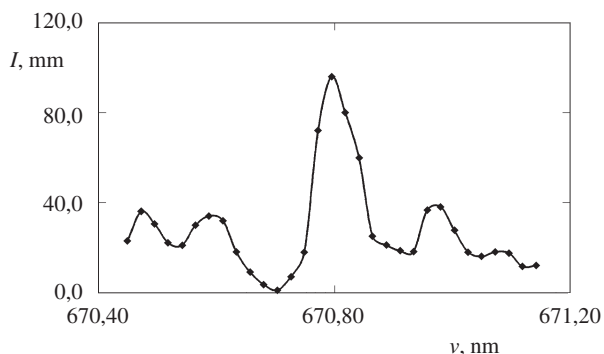
S vv generátorem (13,56 MHz) se rovněž sledoval vliv příkonu na chování výboje (s vv generátorem to nebylo možné, neboť ten neumožňoval příkon měnit). Mosazné trysky snášely vyšší výkony lépe (u grafitových výboj prskal). Při dalším zvyšování výkonu (nad 200 W) výboj častěji prská, dochází k jeho „běhání“ po horní protielektrodě, případně může dojít k odtavování elektrody. Pokud se zvyšuje výkon, tak je možné výboj částečně stabilizovat snížením průtoku argonu.

Bylo pozorováno, že při zvýšení množství aerosolu zaváděného do výboje, nebo při zvýšení koncentrace analytu se snižuje stabilita výboje, kterou lze do určité míry korigovat zvýšením výkonu (u generátoru 13,56 MHz) – což opět způsobuje problémy s chlazením a od určité hodnoty opět převládne nestabilita způsobená příliš velkým výkonem, o které bylo hovořeno výše.

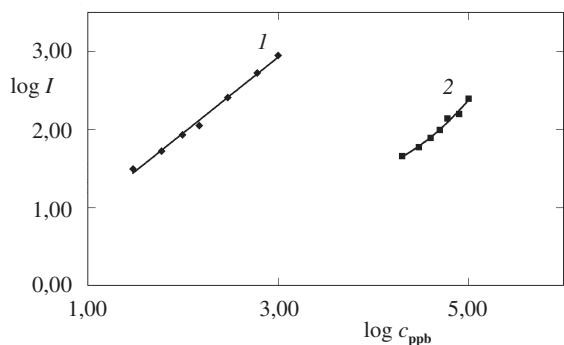
Zajímavý jev byl pozorován u výboje s generátorem 13,56 MHz – pokud do výboje není zaváděn vzorek, výboj hoří



Obr. 3. Signál roztoku obsahující 1 ppb Li, generátor 27,12 MHz

Obr. 4. Kalibrační závislost pro Li, K a Rb, generátor 27,12 MHz; 1 – Li (670,78 nm),  $R^2 = 0,9980$ ; 2 – K (766,49 nm),  $R^2 = 0,9934$ ; 3 – Rb (780,02 nm),  $R^2 = 0,9982$ 

Obr. 5. Signál roztoku obsahující 100 ppb Li, generátor 13,56 MHz

Obr. 6. Kalibrační závislost pro Li a Rb, generátor 13,56 MHz. 1 – Li (670,78 nm),  $R^2 = 0,9940$ ; 2 – Rb (780,02 nm),  $R^2 = 0,9861$ 

přímo ze středu otvoru mosazné špičky a má světle modrou barvu. Jakmile se začne zavádět vzorek, výboj se zbarví do červena (což způsobuje přítomný vodík z vody) a dojde k vychýlení výbojového sloupce z osy trysky a ten pak hoří zcela na kraji otvoru ve špičce. Tímto jevem však nedochází ke zhoršení stability výboje.

Průtoky pracovního plynu (Ar) se pohybovaly u nv-RPJ okolo  $0,9 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ , u vv-RPJ bylo nutno kvůli stabilitě průtoků snížit na  $0,3 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Při vyšších průtocích (nad  $0,6 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ ) se zmenšuje stabilita výboje, který prská a dochází k pohybu horního konce výboje po protielektrodě. Pokud se do nv výboje nezavádí aerosol, je možné průtok argonu rovněž snížit až na hodnotu kolem  $0,3 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Tento fakt je zajímavý z hlediska využití výboje jako optický emisní detektor pro plynovou chromatografii.

Celkově lze říci, že stabilita výboje je lepší spíše při nižších průtocích. Tato skutečnost často činila problémy při použití koncentrického zmlžovače, kdy snížením průtoku se rovněž snížila jeho zmlžovací účinnost a jak bude uvedeno dále, tento jev se podepsal dosti výrazným způsobem na odezvě roztoků s nízkou koncentrací. Jako nejvýhodnější se proto ukazují zmlžovače, jejichž účinnost nezávisí na průtoku nosného plynu (např. ultrazvukový).

Nejprve se experimenty prováděly s nv generátorem (27,12 MHz) a jako zmlžovací zařízení byl použit koncentrický zmlžovač. Zde se ukázalo, že výkon výboje, který se pohyboval okolo 100 W, je nedostatečný, neboť výboj při styku s aerosolem zhasl. Byl proto zapůjčen ultrazvukový zmlžovač Cetac U-5000AT<sup>+</sup> s desolvací aerosolu. Desolvací aerosolu byla odstraněna vysoká zátěž výboje a ten již nezhasínal. Rovněž tento zmlžovač poskytuje velké množství aerosolu, takže se podařilo detegovat i roztoky o velmi nízkých koncentracích (řádově 10 ppb).

S použitím vv generátoru (13,56 MHz) byl výkon výboje (asi 200 W) již dostatečný a nebylo nutné používat desolvaci – byl použit koncentrický zmlžovač. Jak je uvedeno dále, s tímto zmlžovačem však už nebylo možné stanovit ty koncentrace alkalických kovů, které se jinak s použitím USN stanovily velmi dobře.

#### Kalibrační křivky

Nejprve bylo zjištěno jakou odezvu poskytují vybrané roztoky alkalických kovů a proměřeny kalibrační závislosti těchto prvků. Z důvodu nízké excitační energie byl vybrán draslík, rubidium a lithium.

Tato měření se prováděla s nv výbojem (generátor 27,12 MHz, výkon výboje 90–100 W), průtok argonu byl  $0,9 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Všechny prvky poskytovaly velice dobré signály (viz např. Li na obr. 3) a kalibrační závislosti byly lineární v poměrně širokém koncentračním rozsahu (obr. 4). Detekční limity byly odhadnuty desetkrát (pro Li, K) a třicetkrát (pro Rb) vyšší než u AAS. Jejich nízká hodnota byla rovněž dána použitím ultrazvukového zmlžovače, který dává velké množství aerosolu.

S vysokovýkonovým výbojem (generátor 13,26 MHz, výkon výboje 150–220 W) se proměřovaly kalibrační závislosti lithia a rubidia (obr. 6). Zde již došlo k výraznému posunu kalibračních křivek k vyšším koncentracím, což je vysvětlováno použitím koncentrického zmlžovače. Zde se odhady meze detekce zvýšily o dva resp. o čtyři řády (pro Li resp. Rb).

**Závěr**

Cílem této práce bylo studium vlastností nového excitačního zdroje – radiofrekvenční plazmové trysky a jejího možného použití v OES. Byly prováděny konstrukční úpravy trysky za účelem zvýšení stability výboje. Dále pak bylo zkoumáno chování výboje s mosaznou a grafitovou elektrodou, při různých průtocích plazmového plynu a různých výkonech budicího generátoru. S použitím dvou generátorů o frekvencích 27,12 a 13,56 MHz byla studována spektra a kalibrační závislosti vybraných prvků.

*Poděkování patří MŠMT, které projektem Laboratoře plazmových zdrojů pro chemickou analýzu č. VS97020 umožnilo vzniknout této práci. Projekt výzkumu radiofrekvenční plazmové trysky je rovněž podporován grantem Grantové agentury České republiky č. 202/98/0791 a 202/98/0666.*

**Použité zkratky a symboly**

AAS	atomová absorpční spektrometrie
ICP	indukčně vázaná plazma
i.d.	vnitřní průměr
nv	nízkovýkonový
OES	optická emisní spektrometrie
rf	radiofrekvenční
RPJ	radiofrekvenční plazmová tryska

USN	ultrazvukový zmlžovač
vf	vysokofrekvenční
vv	vysokovýkonový

**LITERATURA**

1. Klíma M., Janča J., Slavíček P., Kuzmin S.: Sborník odborného semináře KKRK při AMG Kopřivnice, 6.–8. října 1998, 25.
2. Klíma M., Janča J., Slavíček P.: Sborník odborného semináře KKRK v Seči u Chrudimi, 28.–30. září 1999, 61.
3. Pazourek J., Revilla A., Zdráhal Z., Slavíček P., Janča J., Havel J.: Proceedings of ITP 98, Venezia.

**M. Semerád, M. Štěpán, V. Otruba, and V. Kanický**  
(Laboratory of Plasma Sources for Chemical Analysis, Department of Analytical Chemistry, Masaryk University, Brno):  
**Plasma Jet for Emission Spectral Analysis**

Basic spectrochemical properties of radiofrequency plasma jet, a new plasma source, were studied. The plasma jet construction provided for stability of discharge. The behaviour of discharge in dependence on the plasma gas flow and the generator energy output was studied. Spectra of selected elements and their calibration dependence were studied with two generators (27.12 and 13.56 MHz).

Česká společnost chemická, odborná skupina analytické chemie,  
Sekce mladých chemiků při České společnosti chemické  
a Katedra analytické chemie PřF Univerzity Palackého v Olomouci  
ve spolupráci se Spektroskopickou společností Jana Marka Marci  
a firmou Merck, s.r.o. Praha

pořádají ve dnech

**1. a 2. února 2001**

**4. ročník soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci  
v oboru analytické chemie**

**Cena firmy Merck 2001**

Přihlášku zašlete na adresu: Doc. RNDr. Juraj Ševčík, Ph.D.,  
Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého,  
Třída Svobody 8, 77146 Olomouc,  
e-mail: sevcik@risc.upol.cz, tel: 068/563 44 16, fax: 068/523 03 56  
www.upol.cz/ach/soutez

Obratem vám bude zaslán 2. cirkulář s programem soutěže a závazná přihláška.

## VÝUKA CHEMIE

### EXPERIMENTY K DEMONSTRACI VÝROBY PAPIŘU VE VÝUCE CHEMIE

MILAN KRAITR, JITKA ŠTROFOVÁ  
a VÁCLAV RICHTR

Katedra chemie, Západočeská univerzita, Sedláčkova 38,  
306 19 Plzeň, e-mail: kraitr@kch.zcu.cz

Došlo dne 6.XII.1999

Klíčová slova: výukové experimenty, demonstrace výroby papíru, zkoušení vlastností papíru

### Úvod

Papír je jedním z nejvýznamnějších masově vyráběných produktů. Současná světová produkce papíru a lepenky dosahuje 300 mil. t, průměrná roční spotřeba na obyvatele planety činí asi 50 kg (cit.<sup>1</sup>). Spotřeba papíru významně charakterizuje materiální i kulturní úroveň společnosti. Informace o výrobě papíru proto nesporně patří do výuky chemie. Jsou obvykle zařazovány do učiva o polysacharidech jako finální krok technicky nejvýznamnějšího způsobu chemického zpracování dřeva. Výroba papíru navazuje na výrobu vláknin (především buničiny), která má převážně charakter typické chemické výroby. Vlastní výroba papíru bývá neprávem chápána jako proces pouze mechanický, ačkoliv má svůj chemismus a „chemizace“ této výroby se neustále prohlubuje.

Nedostatkem školní interpretace výroby papíru je rovněž absence názorné demonstrace výrobního principu. Při složitosti a „neprůhlednosti“ moderních výrobních postupů a zařízení nebývá žáky dobře pochopena podstata výroby papíru ani při exkurzích do papíren. Ke zlepšení účinnosti výuky tématu výroba papíru, navrhuje jednoduché demonstrace základního výrobního principu a na ně navazující hodnocení některých vlastností připraveného papíru. Výrobu papíru lze bez zvláštního vybavení znázornit materiálově i časově nenáročnými pokusy, které jsou proveditelné v podmínkách střední i základní školy<sup>2</sup>.

### Princip výroby papíru

Technologie výroby papíru je stručně charakterizována např. v publikaci<sup>3</sup>, podrobnější informace přináší např. literatura<sup>4,5</sup>. Proto uvádíme jen nezbytnou rekapitulaci základních principů, jejichž modelem jsou následující demonstrační experimenty.

Papír se vyrábí zplstněním, odvodněním a vysušením vláken z jejich vodné suspenze zvané papírovina. Papírovina vzniká mokřím rozvlákněním a mletím vláknitých surovin (zejména buničiny) a následujícím přidáním přísad pro úpravu vlastností papíru. Podstatu papírenských vláknin tvoří celuloza. Rozvláknění a mletí vláknin spočívá hlavně v podélném štěpení

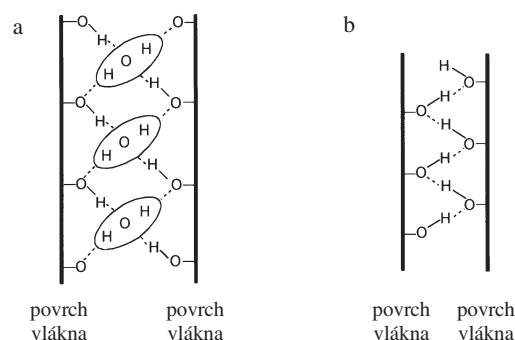
nabotnalých vláken na jemné fibrilární svazečky, což lze přirovnat k rozplétání lana až na jemná vlákénka. Svazečky mají velký specifický povrch a velké množství obnažených hydroxylových skupin v makromolekulách celulosy (v každé glukosové jednotce jsou tři volné hydroxylové skupiny). Ty v hoto- vém vysušeném papíru vytvářejí vodíkové vazby mezi vlákny (obr. 1). Rozvláknění a mletí se v současnosti provádí zejména ve vířivých zařízeních připomínajících domácí mixér a v zařízeních, kde suspenze vláken prochází mezi rotujícími disky.

Přísady do papíroviny se liší podle druhu papíru. Jejich současný sortiment je velmi rozmanitý. Většina papírů obsahuje klíždla na bázi přírodních pryskyřic či syntetických látek. Přírodní pryskyřice se na vlákna fixují přidavkem síranu hlinitého, který mj. tvoří nerozpustné hlinité soli pryskyřičných kyselin a koaguluje volné pryskyřičné kyseliny. Klížení zvětšuje odolnost papíru proti vodě (hydrofobnost). Mnohé papíry, hlavně tiskové, obsahují plnidla (např. kaolin), která mění řadu jejich vlastností, mj. omezením mezivláknenných vodíkových vazeb zvyšují poréznost papíru. Pro výrobu barevných papírů se přidávají obvykle roztoky barviv, která jsou na vlákna fixována různými fixačními prostředky (mj. síranem hlinitým).

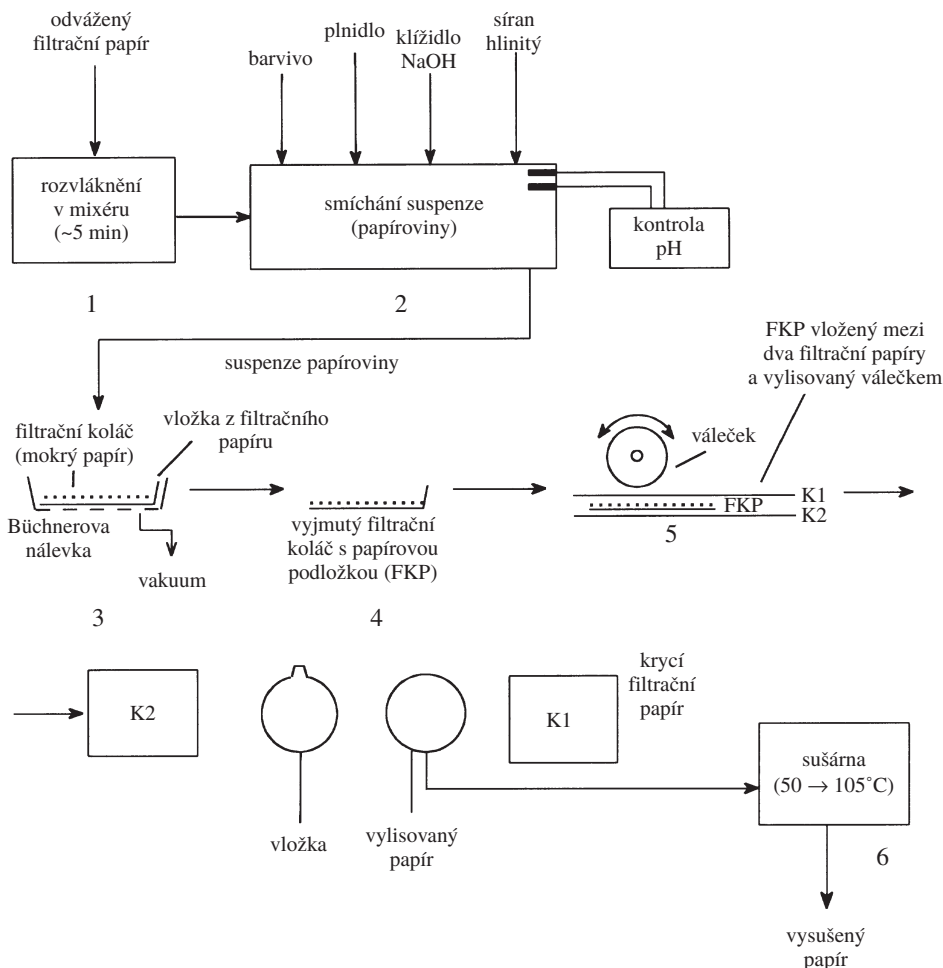
Papírovina zředěná obvykle na 0,5–1 % sušiny natéká na mokrou část papírenského stroje. Odvodnění papíroviny a zplstnění vláken zpravidla probíhá na nekonečném podélném síti (analogie pásového dopravníku) s příčnou vibrací, a to nejprve gravitací (cezením), potom pomocí vakua (odsáváním). Mokřý pás papíru se mezi válci ve styku s plstěnou tkaninou lisuje a potom suší na vyhřátých válcích při teplotě obvykle přes 100 °C. V sušící části papírenského stroje se z papíru odstraní nejen přebytečná voda, ale vytvoří se zde zmíněný systém mezivláknenných vodíkových vazeb, znázorněný na obr. 1b. (Vodíkových vazeb v mokřím papíru se účastní voda, která je v obr. 1a zjednodušeně znázorněna monomolekulární vrstvou.) V sušící části stroje se rovněž dokončuje proces klížení (po roztavení částíček klíždla).

### Modelové experimenty k demonstraci výroby papíru

V našich pokusech vláknitou surovinu představuje filtrační papír. Ten je složen pouze z bělené buničiny, tj. prak-



Obr. 1. Vodíkové vazby v papíru; a – mokřý papír, b – suchý papír



Obr. 2. Schéma demonstrace výroby papíru; 1–2 příprava papíroviny, 3–5 mokrá část papírenského stroje, 6 – sušící část papírenského stroje

ticky čisté celulosy, je málo pevný a snadno rozvláknitelný a neobsahuje žádné přísady (klíživla, plnidla atd.). Modelem rozvláknovacího a mlecího zařízení je domácí mixér. Síťovou část papírenského stroje představuje Büchnerova nálevka s vložkou z filtračního papíru a odsávací baňka s vývěvou, lisovou část papírenského stroje představuje dřevěný či gumový váleček s filtračními papíry místo plstěné tkaniny. Modelem sušící části stroje je laboratorní sušárna, eventuálně i volné vysušení vytvořeného papírového listu (obr. 2).

Didaktická efektivnost pokusů se zvýší, pokud připravené vzorky papíru podrobíme následnému zkoušení jeho vlastností. K tomu je nejvhodnější připravit vedle zkušebního vzorku i vzorek srovnávací (např. klížený a neklížený, plněný a neplněný papír ap.).

Vyzkoušeli jsme různé varianty pokusů modelujících přípravu papíru a hodnocení jeho vlastností, dále uvádíme postupy, které považujeme za optimální z hlediska vystižení reálných technických procesů, snadnosti provedení i úspory času.

Vhodná plošná hmotnost (gramáž) připravených vzorků je  $80\text{--}120\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ . U těchto gramáží lze bez manipulačních problémů operovat s mokrým listem při použití vložky do Büchnerovy nálevky (obr. 2). (Gramáž kolem  $120\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$  dokonce

umožňuje při opatrné manipulaci vyjmout z Büchnerovy nálevky i bez papírové podložky mokrý list bez jeho porušení.) Pro demonstraci rozdílů mezi klíženým a neklíženým papírem je však vhodnější nižší gramáž.

*Postup:* Vypočtená navážka filtračního papíru (cca  $0,5\text{--}1,5\text{ g}$  podle rozměrů užitých Büchnerovy nálevky – vhodné jsou průměry  $9\text{--}12,5\text{ cm}$ ) se rozstříhá na malé kousky a rozmíchá v  $70\text{--}100\text{ cm}^3$  vody a po chvíli stání se 5 minut rozvláknuje v kuchyňském mixéru s nožovým rotorem u dna (hustota suspenze do  $1\%$  a.s.). Suspenze vláken se převede do vysoké kádinky ( $150\text{--}250\text{ cm}^3$ ) a zředí na  $100\text{--}150\text{ cm}^3$ . Přidá se  $0,1\text{--}0,15\text{ g}$  kaolinu na  $0,5\text{ g}$  vláken a dobře promíchá tyčinkou. Přidá se  $0,3\text{ cm}^3$   $0,5\%$  vodného roztoku methylenové modři nebo malachitové zeleně a po promíchání pryskyřičné klíživlo (disperze přírodní pryskyřice). Dávka pro  $0,5\text{ g}$  vláken obsahuje  $10\text{--}15\text{ mg}$  pryskyřice (kalafuny). Disperzi připravíme rozpuštěním jemně rozetřené kalafuny v ethanolu za studena – pro jednu dávku  $1\text{ cm}^3$  ethanolu – a zředěním stejným objemem vody. (Tento postup sice není v technické praxi užíván, je však ze všech postupů, které jsme vyzkoušeli, nejrychlejší a pro kvalitativní demonstrace umožňuje dostatečné zaklížení vzorků.) Po důkladném promíchání se změří pH-metrem nebo indikátorovými papírky hodnota pH papíro-

viny, důležitá mj. pro dobré zaklizení a vybarvení papíru. Z byrety se po kapkách přidává roztok NaOH ( $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), až pH suspenze vláken dosáhne hodnoty asi 9. Pak se po kapkách přidá roztok  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  ( $c = 20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) do pH asi 4,5. (Předchozí alkalizace suspenze zajistí, že přídavek  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  bude dostatečný pro fixaci pryskyřice na vlákna.)

Po promíchání a asi 2 minutovém stání se suspenze naleje na Büchnerovu nálevku s papírovou vložkou s několikacentimetrovým výčnělkem. (Ten usnadní její vyjmutí i s vytvořeným mokřým listem bez jeho poškození.) Nalítá suspenze se potřesením rovnoměrně rozvrství a po chvíli se uvede do chodu vodní vývěva při postupném zvyšování podtlaku. Když z nálevky přestane kapat voda, vyjme se vytvořený mokřý list papíru i s podloženou vložkou. Vložka s mokřým listem se vylišuje mezi dvěma filtračními papíry opakovaným mírným přitlačením válečku. Odvodněný a vyrovnaný list mokřého papíru se opatrně oddělí od mokré podložky a na suché papírové podložce vloží do sušárny vyhřáté na 50–60 °C. Sušárna se poté nastaví na 105 °C. Po dosažení této teploty se papír vyjme a použije pro případné navazující hodnocení jeho vlastností. Doporučený postup sušení modeluje režim sušení na papírenském stroji, který sleduje mj. optimalizaci mechanických vlastností papíru a jeho zaklizení. Pro kvalitativní demonstrace není nezbytný a může být nahrazen vložením mokřého papíru do sušárny vyhřáté na konečnou sušící teplotu, což vede k úspoře času. Jinou možností je volné sušení na vzduchu.

## Hodnocení vlastností připravených papírů

Velmi jednoduše, rychle a bez materiálových nároků můžeme hodnotit vliv přísady klízidla a barviva do papíroviny na vlastnosti papíru.

**Klížení papíru** lze hodnotit popisováním inkoustem, které je založeno na rozpíjení a prosakování inkoustu u neklíženého papíru. Doporučený postup je zjednodušenou analogií v papírnách užívané orientační zkoušky zaklizení<sup>7</sup>. Pro účely školního pokusu se obojdeme bez speciálních zkušebních zařízení a inkoustů. Uspokojivé výsledky a jasně patrné rozdíly mezi klíženým a neklíženým papírem dosáhneme s běžně dostupnými prostředky – obyčejným modrým inkoustem a redispérem s hrotem o průměru 0,5–2,5 mm. Vzorek se popíše rovnoběžnými čarami o délce asi 5 cm a pak čarami příčnými. Neklížené vzorky i při nestandardních podmínkách zkoušky ukazují ve srovnání s klíženými výrazné rozpíjení a prosakování na druhou stranu, které roste s tloušťkou čar. Zřetelné je již rozpíjení (tvorba kaňky) při trvajícím dotyku pera s neklíženým papírem.

**Fixaci barviva** na vláknech můžeme posoudit při namočení vysušeného papíru méně až středně sytým vybarveným roztokem methylenové modři nebo malachitové zeleně. Nepozorujeme výrazný barevný výluh ani barvení bílého filtračního papíru dotykem namočeného barevného vzorku.

Vliv přídavku plnidla na chemické složení papíru posoudíme ze stanovení popela v papíru plněném i v neplněném referentním vzorku, které lze provádět, je-li škola vybavena analytickými vahami. Neplněný papír má malý obsah popela, většinou nižší než 1 % (cit.<sup>7</sup>). Papíry plněné kaolinem mají při doporučených podmínkách pokusu poměrně vysoké zadržetí plnidla a obsahují 10–20 % popela. Pro stanovení popela

spálením papíru na kahanu (resp. v elektrické peci) je třeba použít aspoň 0,5 g vzorku. Vzorek v porcelánovém kelímku přikrytém víčkem nejprve mírným plamenem zuhelníme a pak při plném žáru kahanu (asi 900 °C) spálíme. Po vychlazení v exsikátoru vážíme. Prázdný kelímek předem zvažíme po vyžhání za stejných podmínek.

Analogicky můžeme stanovit obsah vody v papíru vysušením vzorku ve vážence uzavíratelné víčkem v sušárně při 105 °C. Vysušené papíry přechovávané volně na vzduchu obsahují většinou kolem 5 % vody v závislosti na relativní vlhkosti vzduchu v místnosti i na složení papíru. Stanovení vlhkosti papíru je vhodné provést souběžně se stanovením popela. Tato dvě stanovení nám poslouží jako model chemické analýzy hygroskopického vzorku, kde musíme odlišit výsledek analýzy (např. obsah popela) ve vzorku vlhkém a po přepočtu na absolutně suchý vzorek (tato hodnota je vždy vyšší). Současné obě stanovení jsou nejjednoduššími a nenáročnými stanoveními gravimetrického typu.

## Závěr

Navržený soubor demonstračních experimentů je jednoduchým a materiálově nenáročným modelem výroby papíru a hodnocení jeho vlastností. Experimenty jsou vhodné pro školní použití i pro vysokoškolské cvičení z didaktiky chemie. Umožňují provedení učitelské, žákovské nebo jejich kombinaci, komplexní provedení souboru pokusů nebo jeho součástí. Předem připravený pokus zhotovení zkušebního vzorku se všemi přísadami a srovnávacího vzorku lze provést v jedné vyučovací hodině. Papír bez přísad se zkráceným režimem sušení lze připravit za 20 minut. Hodnocení klížení a fixace barviva u připravených papírů zabere v následující hodině jen několik minut. Tyto experimenty jsou obzvlášť vhodné jako paralelní žákovský pokus. Stanovení popela a vlhkosti v papíru je vhodné provést jako 1–2 hodinové žákovské cvičení.

## LITERATURA

1. Dráždil M.: Papír *Celulosa* 54, 29 (1999).
2. Kraitr M., Štrofová J., Richtr V.: *51. zjazd chemických spoločností*. Zborník príspevkov, abstrakt K-P9. Vydavateľstvo STU, Bratislava 1999.
3. Neiser J., Hauzar I., Kraitr M., Nessler J., Smolek P.: *Základy chemických výrob*. SPN, Praha 1988.
4. Bučko J., Šutý L., Košík M.: *Chemické spracovanie dreva*. Alfa, Bratislava 1988.
5. Blažej A., Krkoška P.: *Technológia výroby papiera*. Alfa, Bratislava 1989.
6. Hnětkovský V.: *Papírenská příručka*. SNTL, Praha 1983.
7. Souček M.: *Zkoušení papíru*. SNTL, Praha 1977.

**M. Kraitr, J. Štrofová, and V. Richtr** (*Department of Chemistry, Faculty of Education, University of West Bohemia, Plzeň*): **Experiments for Paper Manufacture Demonstration in Chemistry Teaching**

Simple experiments for demonstration of paper manufacture and tests of physical and chemical properties of paper are presented. The experiments are suitable both for secondary and primary schools as well as for university teaching.



## DISKUSE

### Ke státním maturitám z chemie

Jako učitel chemie na gymnáziu jsem velmi uvítal oznámení, že termín zavedení tzv. státních maturit se posouvá. Jejich obsah shrnutý v první verzi návrhu pro veřejnou diskusi z února 2000 vypadal hrozivě vzhledem k velkému objemu znalostí vyžadovaných ve všech vyučovacích předmětech. Cílové požadavky přesahovaly rozsah platných osnov a standardů učiva pro gymnázia, zahrnovaly učivo uváděné jen v některých variantách používaných učebnic. Vzhledem k tomu, že podobně byly zpracovány cílové požadavky pro řadu vyučovacích předmětů, byla by důsledkem celková změna ve výuce na našich středních školách směrem k encyklopedismu, který je jinak ze všech stran kritizován. Ministr školství se v příloze Akademie Lidových novin vyjádřil, že před zavedením státních maturit bude dostatek času k tomu, aby byly změněny učební osnovy jednotlivých vyučovacích předmětů tak, aby odpovídaly požadavkům státních maturit. V této situaci jsem ocenil, že se problematikou nové maturity z chemie chtějí blíže zabývat i Chemické listy.

Koncem května jsme nečekaně obdrželi novou verzi katalogů cílových požadavků ke státní maturitě – 2. návrh pro veřejnou diskusi. S potěšením mohu konstatovat, že věcný rozsah byl v chemii zřetelně redukován tak, že nyní odpovídá rozsahu učebních osnov a standardů učiva chemie pro gymnázia a obsahu nejběžnějších učebnic. Podobný je i první dojem mých kolegyní a kolegů z katalogů cílových požadavků dalších vyučovacích předmětů. V chemii to konkrétně znamená, že není např. požadována znalost výpočtů na základě stavové rovnice ideálního plynu, znalost základů termodynamiky a stavových funkcí  $U$ ,  $H$ ,  $S$ ,  $G$ , znalost rovnovážné konstanty  $K_p$ , rovnice autoprotolýzy amoniaku a ethanolu, průběhu trimerace (tetramerace) alkinů nebo oxidace anthracenu, což byly požadavky uvedené v původní verzi katalogu cílových požadavků ke společné části maturitní zkoušky z chemie. Takto vymezený rozsah učiva může tvořit základ pro další diskuse. Je ale třeba, aby byly cílové požadavky postupně rozpracovány detailně až ke konkrétním znalostem, které se budou v testech zkoušet. Někde takové vymezení již najdeme (např. názvy sedmi aminokyselin, jejichž vzorce má maturant znát), jinde takové rozpracování zatím chybí (vymezení konkrétních heterocyklických sloučenin). Katalog cílových požadavků vyvolává ale řadu dalších otázek.

V obecné předmluvě ke katalogům různých předmětů je řečeno, že „Obsahem katalogů jsou konkrétní cílové požadavky, které jednoznačně stanoví nároky na žáka. Pro žáky a učitele musí být zřejmé, jak mohou těchto cílů dosáhnout“. Avšak úplná jednoznačnost a přesnost je v pedagogice asi jen snem a zdá se, že dá hodně práce se mu alespoň přiblížit. Můžeme si klást např. následující otázky:

- Odpovídá obsah Katalogu cílových požadavků ke společné části maturitní zkoušky jeho názvu?
- Jsou dobře vymezeny kategorie cílových kompetencí a jasně stanoven jejich význam pro novou maturitní zkoušku?
- Jsou cílové požadavky formulovány logicky a přesně?

Název textu je sice Chemie – katalog cílových požadavků ke společné části maturitní zkoušky, ale autoři sami uvádějí, že cílové kompetence i tematické okruhy jsou zpracovány pro maturitní zkoušku z chemie jako celek, to je pro její společnou část (testy) i profilovou část (ústní maturitu zajišťovanou jednotlivými školami). Cílové kompetence jsou dokonce v Úvodu charakterizovány jako „soubor cílových způsobilostí z chemie, které by měl žák maturující z chemie ovládat“. Dodejme, že zřejmě půjde o způsobilosti, jejichž dosažení žák prokáže u maturity (ústní maturity nebo v písemném testu), ale také o způsobilosti, jejichž dosažení žák prokázal např. již tím, že prošel celou střední školou a k maturitě se vůbec propracoval (např. absolvoval určitý počet hodin praktických cvičení v chemické laboratoři). Jde tedy říci, že zde nejde přímo o požadavky k maturitní zkoušce, ale o podrobnější rozpracování základních pedagogických dokumentů. Je to svým způsobem logický a potřebný krok, neboť naše učební osnovy i standardy učiva jsou formulovány velmi stručně a vymezení cílových kompetencí v nich je velmi neurčité, ale je namísto otevřeně říci, o co vlastně jde. Takto zpracované cílové požadavky zatím podají o připravovaných maturitních testech jen matnou představu.

Právě uvedené potvrzuje členění cílových kompetencí do čtyř kategorií. Kompetence dvou nejvyšších kategorií vyjadřují hlavně takové požadavky na žáky, které u maturity zkoušet nejsou. Kategorie C – Pozorování a experimentování (např. „žák dovede provést základní práce v chemické laboratoři“) je ověřitelná jen během praktické výuky laboratorních prací (příp. při praktické maturitě na střední odborné škole). Podobně kompetence kategorie D – Komunikace (např. „vyhledávat chemické informace ...v odborných časopisech, z hromadných sdělovacích prostředků, internetu“) není dobře ověřitelná u maturity. Navíc již v úvodním rozdělení cílových kompetencí do kategorií A až D nacházíme rozpory: V nejnižší kategorii A má žák „umět vyjádřit vlastní názor na používání různých chemických poznatků a metod v praxi“ – nejde zde o schopnost komunikace, čili o kompetenci nejvyšší kategorie D? Má kategorie cílových kompetencí určitý vztah k typu testových položek? Zatím se zdá, že význam kategorií je velmi obecný a slouží především k upřesnění cílů výuky jako celku.

Po konkrétním dopadu na obsah testových položek ve státní maturitě se musíme opakovaně ptát i u specifických cílů, které vznikly rozpracováním cílových kompetencí na konkrétní obsah učiva. Těžko např. hodnotit, jak maturant nakreslí model molekuly uhlovodíku nebo derivátu uhlovodíku podle strukturního vzorce. Pokud se neomezíme na několik nejjednodušších sloučenin, začne hrát velkou roli to, jaký má konkrétní žák kreslířský talent. Navíc: jde zde skutečně o kompetenci typu „Pozorování a experimentování“? Sporné jsou specifické cíle v kategorii Komunikace, které vyžadují vyhledávání informací z odborné literatury a z chemických tabulek. Zpracování údajů z odborné literatury by nejspíše mělo charakter referátu nebo seminární práce – ale máme něco podobného k maturitě běžně zavádět? Pokud snad ano, pak by se stejně jednalo o část školní maturity a ne o její společnou

část ve formě testu. Běžné Matematické, fyzikální a chemické tabulky pro střední školy obsahují z chemie poměrně málo. Zdá se, že řada požadavků na vyhledávání v tabulkách by spíše odpovídala odborným chemickým tabulkám, které se na gymnáziích jako základní učebnice nepoužívají.

Závěrem lze hodnotit, že Chemie – katalog cílových požadavků ke společné části maturitní zkoušky, 2. návrh pro veřejnou diskusi, je kvalitně zpracovaným podkladovým materiálem, který však zatím nevede přímo k vytvoření nových maturit ve formě testů. Je třeba nejdříve vyjasnit, které požadavky se opravdu bezprostředně vztahují na společnou (externí) část maturity (připravované testy) a které požadavky se týkají ústních maturit na školách nebo průběhu výuky chemie během celé střední školy. Je třeba zvážit význam rozlišování kategorií cílových kompetencí pro tvorbu testových položek a případně jejich třídění zpřesňovat. Je třeba velmi konkrétně vymezovat poznatky, které se budou v maturitních testech objevovat. Pro konkrétní představu o maturitních testech je nutné poskytnout žákům rozsáhlé ukázky testů s konkrétní formulací položek, výčet cílových požadavků je pro studenty nedostatečná informace.

Miroslav Melichar,  
Gymnázium Soběslav

## LITERATURA

*Chemie – Katalog cílových požadavků ke společné části maturitní zkoušky. Návrh pro veřejnou diskusi.* MŠMT – Centrum pro reformu maturitní zkoušky (CERMAT). Praha, únor 2000.

*Chemie – Katalog cílových požadavků ke společné části maturitní zkoušky z chemie. 2.návrh pro veřejnou diskusi.* MŠMT – Centrum pro reformu maturitní zkoušky (CERMAT). Praha, květen-červen 2000.

## Hnědé uhlí a jeho perspektiva

Těžba vysokopopelnatého a vysokosírného hnědého uhlí pro energetické využití půjde do plánovaného útlumu, neboť s najetím jaderné elektrárny Temelín se budou odstavovat elektrárny spalující hnědé uhlí a vyžadující nákladné odsiřování spalin. Neměl by vzniknout žádný nadbytek elektrické energie, protože se v podstatě jedná o záměnu primárního energetického zdroje při výrobě elektrické energie.

Těžba nízkopopelnatého a nízkosírného hnědého uhlí vhodného jako chemická surovina pro chemický průmysl by měla být regulována podle potřeb chemického průmyslu.

Výzkum chemického využití uhlí byl však koncem sedmdesátých a začátkem osmdesátých let v ČSFR zastaven s odůvodněním, že chemické zpracování uhlí bude ekonomické až tehdy, kdy bude ropa nabízena k prodeji za 45 USD za barel, a že všechny potřebné organické sloučeniny lze syntetizovat z primárních ropných uhlovodíků. V současnosti se barel ropy nabízí okolo 30 USD/barel a není daleká doba, kdy bude požadováno 45 USD/barel.

Ve východním Německu byli však prozíravější a výzkum chemického zpracování uhlí nezastavili, zdokonalovali jak technologii, tak zařízení, protože zpracováním hnědého uhlí

jako chemické suroviny lze produkovat meziproducty pro farmaceutický průmysl, pro výrobu barviv, pesticidů i polymerů, humátové koncentráty mohou sloužit jako hnojivo v zemědělství.

Otázka zní: jak napravit chybu? Obnovit výzkum a vývoj chemického zpracování uhlí nebo uvažovat o koupi licence a dovozu zařízení? Moderní chemické zpracování hnědého uhlí, sestávající se z flotace, několikastupňové extrakce, případně superkritické extrakce, různými polárními a nepolárními extrakčními činidly, s vloženou hydrogenační rafinací, je zajímavá, i když složitá, technologie respektující jak ekologii, tak minimalizující spotřebu energie.

V současnosti je chemický průmysl ČR, ostatně jako všechny průmysly a celé národní hospodářství v ekonomické krizi.

Neexistuje prognóza rozvoje chemického průmyslu a průmyslu jako celku, ostatně ani nejsou organizováni specialisté, kteří by tuto činnost prováděli jako poradenskou např. pro poslaneckou sněmovnu, protože tyto instituce byly bez rozmyslu začátkem devadesátých let zrušeny, ačkoliv podobné instituce existují v SRN, ve Francii, ve Velké Británii, v USA i v Japonsku. Musíme pouze doufat, že se vstupem do Evropské unie budou znovu zřízeny prognostické národohospodářské ústavy, protože jsou pro rozvoj i technicky vyspělých národních hospodářství důležité. Vzhledem k tomu, že k této nápravě může dojít až v roce 2003 nebo až v roce 2005, musíme si položit otázku jak dál v současnosti roku 2000? Primární energetické zdroje a nerostné bohatství jsou majetkem státu, který však v současnosti nemá dostatek finančních prostředků na výzkum a vývoj a který ani nemá k dispozici modernizované podklady pro prognózu rozvoje jak chemického, tak průmyslu celkem.

Proto v současnosti existuje jediná možnost: zastavit těžbu nízkopopelnatého a nízkosírného hnědého uhlí, které se nachází např. v hlubinném dolu Kohinoor, ale zakonzervovat důl tak, aby jeho těžba byla obnovitelná např. za pět nebo deset let. Rozhodně nelze doporučit prodej tohoto dolu a jemu podobných zdrojů do soukromých rukou, aby nedošlo k exportu, velmi nevýhodnému exportu chemické suroviny za nízkou cenu energetického hnědého uhlí. To, že hlubinné hnědé uhlí z dolu Kohinoor je ceněno jako méněhodnotné energetické uhlí místo jako chemická surovina, je pravá příčina ekonomické neefektivnosti hlubinného dolu na hnědé uhlí.

Věra Duřová

## Je účelné zabývat se v ČR chemickým využitím uhlí?

S názorem, že bychom se měli věnovat chemickému zpracování našeho uhlí jako domácí suroviny se setkávám dost často. S tímto názorem nesouhlasím a chci uvést několik důvodů.

Zásoby ropy se skutečně tenčí. V posledních asi 20 letech byly vyčerpané zásoby přibližně kompenzovány novými nalezišti, a tak se celkové zásoby ropy udržovaly na přibližně stejné úrovni. V současné době však již pozorujeme skutečný pokles zásob. Nárůst cen ropy v posledních měsících nepovažuji za jev vyvolaný poklesem zásob, příčiny fluktuace cen si netroufám analyzovat. Takových cenových výkyvů nahoru i dolů bylo v posledních 30 letech několik. Jsem přesvědčen, že ropa bude hrát v chemii hlavní roli ještě několik

desítek let. Zásoby zemního plynu vydrží ještě déle, a tak chemické využití uhlí není na pořadu dne.

Velké firmy věnují výzkumu chemického zpracování uhlí jistou pozornost. Ve skutečnosti se však uhlí zpracovává na chemikálie pouze v Jihoafrické republice, kde výstavba průmyslového komplexu Sasol byla motivována embargem na dovoz ropy. Avšak i po skončení apartheidu a embarga na ropu je Sasol v provozu a podrobná studie jeho efektivity by byla velmi zajímavá.

V ČR byl průmyslový chemický výzkum dosti redukován a vyvíjíme malou aktivitu i ve velmi aktuálních oblastech. Náš stát je chudý a přepych výzkumu chemického zpracování uhlí s perspektivou desítek let si asi nemůžeme dovolit. A i kdybychom měli dost finančních prostředků, jsou dva dobré důvody proč se chemickým využitím uhlí nezabývat.

- Představa, že ČR je bohatá na uhlí, je nepravdivá. Světové zásoby uhlí jsou skutečně velké, avšak ČR má relativně malé zásoby a to ještě málo kvalitního uhlí. Až se někdy v budoucnosti rozvine chemické využití uhlí, bude to především tam, kde je levný zdroj kvalitního uhlí. A to bohužel není případ ČR. Ostatně v globalizovaném světě nebude lokalita tak důležitá.
- V chemickém zpracování uhlí, podobně jako v případě ropy, půjde o velké procesy, které se vyvíjejí u silných mezinárodních společností. Takové společnosti v ČR nemáme a i dnes kupujeme „know-how“ na takové procesy jako je katalytické krakování, polyethylen, polypropylen apod. Už vůbec se mi nelíbí myšlenka Ing. Duřové, že těžba uhlí

na dole Kohinoor je neefektivní, protože se uhlí prodává pro energetické účely. Kdyby prý se uhlí chemicky zpracovávalo, byla by těžba na tomto dole ekonomická. Takové odvážné tvrzení by se mělo doložit čísly. Zatím lze za nejefektivnější využití uhlí asi považovat zplyňování na syntézní plyn, ostatně na tomto principu je postaven jihoafrický komplex Sasol. Zplyňování uhlí s následným paroplynovým cyklem výroby elektrické energie se považuje za slibnou cestu uhlí do energetiky. Takto byl přebudován i náš hnědouhelný kombinát Vřesová. I když je tedy dost podkladů na zplyňování uhlí, nové výrobní syntézního plynu a vodíku se budují na bázi zemního plynu nebo levných těžkých ropných zbytků.

V Chemopetrolu Litvínov byla již před 30 lety zastavena výroba kapalných paliv z uhlí. Nicméně tam až do roku 1998 existoval relikt z druhé světové války a to izolace fenolů z hnědouhelného dehtu. Toto chemické využití uhlí bylo oprávněně zrušeno, protože ze 100 tis. tun dehtu (roční produkce) bylo izolováno 6000 t nekvalitních fenolů s ohromnou spotřebou tepla a s velkou ekologickou zátěží. A po složitých operacích zůstalo 94 % dehtu stále palivem. I odstavení „fenolky“ se setkala s námitkami zastánců chemického využití uhlí.

Chci se zmínit o jednom nadějném směru využití uhlí, především hodonínského lignitu, na výrobu humózních přísad do hnojiv. Aktivita týmu prof. Lapčíka z bněské Techniky by neměla ujít pozornosti výrobců hnojiv.

Jsem přesvědčen, že vývoj procesů na chemické využití uhlí nepatří k prioritám našich výzkumníků.

*Josef Pašek*

## KALIFORNSKÁ BIOTECH COMPANY

s laboratořemi a výrobou farmaceutických substancí v Praze

**hledá**

***vedoucího oddělení Quality Control (Analytická chemie)***

Odborné předpoklady: angličtina a znalost PC nutné.  
Písemné nabídky s profesním životopisem zašlete na adresu:  
Interpharma Praha, a.s., Komořanská 955, 143 10 Praha 12  
fax: 02-402 51 44, e-mail: interpha@login.cz

---

## OSOBNÍ ZPRÁVY

---

### Prof. Ing. Michal Ilavský, DrSc., má šedesátiny

Dne 21. listopadu 2000 oslaví své šedesátiny prof. Ing. Michal Ilavský, DrSc., bezpochyby jedna z nejvýznamnějších osobností současné české makromolekulární vědy. Narodil se v Liptovském Petru a po školní docházce ve Važci a maturitě v Popradě vystudoval v letech 1957–1962 pražskou Fakultu technické a jaderné fyziky ČVUT se specializací jaderná fyzika. Tehdy se právě dokončovala moderní budova Ústavu makromolekulární chemie ČSAV na pražských Petřínách. Perspektiva zajímavé práce na pracovišti vedeném profesorem Ottou Wichterlem a samozřejmě také sňatek s Marií Mazurkovou z významné pražské rodiny způsobily, že v Praze zakotvil už natrvalo. V letech 1962–1966 absolvoval v ústavu řádnou vědeckou aspiranturu, a na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy obhájil disertační práci. Název disertace *Viskoelastické chování esterů kyseliny polymethakrylové* předznamenal jeho vědecké zaměření i na příští léta. Velmi dobře pochopil principy viskoelastivity a obecně reologie polymerů, která v šedesátých letech prožívala zlatou dobu neobyčejného rozmachu po celém světě. Ilavský se do tohoto světového proudu aktivně zapojil řadou významných studií jak v oblasti teorie, tak i při promyšlených experimentech, v nichž poprvé u nás použil kombinaci rheologického a časově závislého optického měření. Jeho odborná kvalifikace mu brzy otevřela cestu na přední světová pracoviště reologie polymerů. Z řady zahraničních pobytů si zaslouží alespoň zmínku spolupráce s profesorem Slonimským v mos-

kevském Ústavu organokovových sloučenin Akademie věd v letech 1964–65, dlouhodobý pobyt na Syracuse University v americkém státě New York (1970–71) a v posledních letech pak pobyty v postavení hostujícího profesora na několika významných evropských pracovištích (Max-Planck Institut für Polymerforschung, Mainz; Universität Ulm; Delft University of Technology). Všechny tyto pobyty se posléze zhodnotily také v řadě publikací v předních mezinárodních časopisech.

V roce 1987 získal na Matematicko-fyzikální fakultě UK v Praze vědeckou hodnost DrSc. a od roku 1994 působí na této fakultě trvale, nejprve jako docent a vedoucí katedry makromolekulární fyziky, od roku 1998 pak ve funkci řádného profesora. Prof. Ilavský ovšem stále spolupracuje s Ústavem makromolekulární chemie AV ČR, kde má částečný úvazek. Na obou těchto pracovištích vychovává mladé doktorandy, přednáší a nadále pilně publikuje. Právě publikační aktivita prof. Ilavského si zaslouží zvláštní zmínku na závěr. Počet jeho publikací dosáhl bezmála dvou set a citační index přesáhl číslo 1000. Prof. Ilavský tak může být vzorem jak efektivně plánovat, uskutečnit, interpretovat a ovšem posléze také publikovat vědecký experiment. Následující známé citáty dokonale vyjadřují jeho vědeckou strategii:

*Work, finish, publish* (Michael Faraday). *Doing an experiment is not more important than writing* (E. G. Boring).

Přejeme tedy jubilantovi i do dalších let neutuchající inspiraci, pracovní elán a také pevné zdraví.

Miroslav Raab

## OD RADIKÁLOVÝCH A FOTOCHEMICKÝCH REAKCÍ K BIOKOMPATIBILNÍM LÁTKÁM

**VLADIMÍR CÍRKVA**

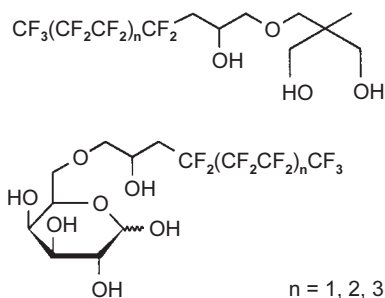
Ústav chemických procesů, Akademie věd České republiky, Rozvojová 135, 165 02, Praha 6, e-mail: cirkva@icpf.cas.cz

Přednáška nositele Baderovy ceny za rok 2000

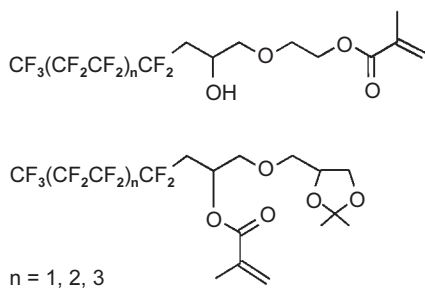
Výzkum biokompatibilních látek<sup>1</sup> se v poslední době stal hlavním a progresivním směrem na poli organické i bioorganické chemie. Snahou je připravit výhodným způsobem nové syntetické látky, které budou mít podobné či srovnatelné vlastnosti v porovnání s přírodními materiály, případně vlastnosti výhodnější. Zvýšená pozornost je věnována materiálům s dobrou propustností kyslíku, které se mohou stát vhodnými náhradami pro cévy, tkáně, srdeční chlopně a v nejspodnější řadě také materiály pro nové kontaktní čočky. Do této oblasti patří i příprava nových krevních náhrad ve spojitosti s nedostatkem krve ve světě pro náročné operace.

Použití fluoru jako modifikujícího substituentu v biologicky aktivních molekulách je dobře známo<sup>2</sup>. U sloučenin s delším fluorovaným řetězcem se projevuje zvýšená propustnost pro plyny či celkové snížení povrchového napětí. Těchto fyzikálně-chemických vlastností bylo využito při přípravě několika nových biokompatibilních látek a materiálů<sup>3</sup>.

Výzkum s cílem připravit nové biokompatibilní látky začal studiem radikálových a fotochemických adicí na fluorované olefiny v systémech s alkanoly<sup>4</sup>, THF<sup>5</sup> a 1,3-dioxolany<sup>6</sup>. Vedle nových příprav byla studována také regioselektivita reakce, nově bylo objeveno několik efektů<sup>7,8</sup> (sterický vliv, délka a typ fluorovaného řetězce či silný vliv terminálního



Obr. 1. Příklady nových fluorovaných biotenzidů pro krevní náhrady



Obr. 2. Nové fluorované monomery pro kontaktní čočky

atomu chloru u chlorfluorpropenů). Požadovaný fluoralkylový řetězec byl do molekuly zaveden také pomocí epoxidů, které byly připraveny novou selektivní metodou<sup>9,10</sup>. Reaktivita<sup>11</sup> těchto epoxidů byla využita při syntéze nových biokompatibilních tenzidů pro krevní náhrady (obr. 1) a amfifilních monomerů pro kontaktní čočky s vysokým transportem kyslíku (obr. 2).

## LITERATURA

1. Církva V.: *Disertační práce*. VŠCHT, Praha 1997.
2. Banks R. E., Smart B. E., Tatlow J. C.: *Organofluorine Chemistry, Principles and Commercial Applications*. Plenum Press, New York 1994.
3. Lowe K. C.: *Artif. Cells, Blood Substitutes, Immob. Biotechnol.* 28, 25 (2000).
4. Církva V., Polák R., Paleta O.: *J. Fluor. Chem.* 80, 135 (1996).
5. Paleta O., Církva V., Kvičala J.: *J. Fluor. Chem.* 80, 125 (1996).
6. Církva V., Paleta O.: *J. Fluor. Chem.* 94, 141 (1999).
7. Církva V., Böhm S., Paleta O.: *J. Fluor. Chem.* 102, 159 (2000).
8. Paleta O., Církva V., Budková Z., Böhm S.: *J. Fluor. Chem.* 86, 155 (1997).
9. Církva V., Améduri B., Boutevin B., Kvičala J., Paleta O.: *J. Fluor. Chem.* 74, 97 (1995).
10. Církva V., Améduri B., Boutevin B., Paleta O.: *J. Fluor. Chem.* 83, 151 (1997).
11. Církva V., Améduri B., Boutevin B., Paleta O.: *J. Fluor. Chem.* 84, 53 (1997).

## KVANTOVÁ CHEMIE II; VOLBA METOD PRO URČENÍ STRUKTURY A VÝPOČTY REAKTIVITY

**ZDENĚK HAVLÁS, MARTIN LEPŠÍK a JIŘÍ VONDRÁŠEK**

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Výzkumné centrum struktury a dynamiky komplexních molekulových systémů a biomolekul, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Hledání speciálních bodů na energetických hyperplochách poskytuje informaci o struktuře a energii stabilních struktur a o reaktivitě. Vzhledem k množství kvantově chemických metod je nutné znát jak jednotlivé aproximace ovlivňují kvalitu předpovědi a jak jsou počítačově náročné.

Přednáška bude ilustrovat použití nejdůležitějších metod včetně těch, které zahrnují korelační energii, a výběr báze na kvalitu výsledků u dimeru vody. Tento model zahrnuje jak silné, tak i slabé vazby a je dostatečně malý na to, aby bylo možné použít i velice přesných metod a velkýchází. Výsledkem bude ukázat, jaké metody jsou vhodné pro určení struktury s ohledem na požadovanou přesnost. Zároveň bude ukázáno, jak rychle roste výpočetní náročnost se zvyšující se kvalitou výpočtů. Výpočty metodami DFT, HF, MP2, MP4, CCSD a CCSD(T) s bázemi od malých až po náročné (aug-cc-pVTZ) budou porovnány s přesnými experimentálními hodnotami.

V přednášce budou zrekapitulovány použité základní pojmy z kvantové chemie. Výpočty reaktivity jsou mnohem ná-

ročnější. V přednášce ukážeme nejen na komplikace v hledání sedlových bodů, ale budou probírány i specifické problémy s volbou metod a jako ukázkou uvedeme některé kroky při řešení fotochemické reakce.

## STECHEOMETRICKÉ REAKCE ZIRKONACYKLŮ A KATALÝZA KOMPLEXY PALLADIA A NIKLU

### MARTIN KOTORA

*Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 6, 128 43 Praha 2*

Rozvoj metallocenových polymeračních katalyzátorů podnítl rovněž zájem o vývoj nových metodologií pro syntézu cyklopentadienů a fulvenů. Příímá reakční cesta k jejich přípravě by mohla spočívat v [2+2+1] cykloadici alkinů nebo v ko-cykloadici alkinů s jinými nenasycenými sloučeninami. Tomuto jistě přímočarému a atraktivnímu přístupu byla však zatím věnována minimální pozornost a to vzbudilo náš zájem o tuto oblast.

Vhodnou výchozí látkou pro syntézu cyklopentadienů se ukázaly být zirkonacyklopentadieny, které lze snadno připravit redukcí zirkonocenu v přítomnosti alkinů. První metoda je založena na reakci zirkonacyklopentadienů s propinoáty za nízkých teplot a dává pentasubstituované cyklopentadieny<sup>1</sup>. Druhá a obecnější je založena na reakci alkinů s 3-halopropenoáty v přítomnosti CuCl a poskytuje jak penta-, tak i hexasubstituované cyklopentadieny (schéma 1)<sup>2</sup>. Tyto reakce mohou být formálně považovány za [2+2+1] cykloadice. Ačkoliv tyto reakce umožnily připravit řadu cyklopentadienů s různými funkčními skupinami, nutnost použít stechiometrického množství zirkonocenu si vynutila nalézt metodu vyžadující použití pouze katalytického množství přechodného kovu.

Tento úkol se podařilo vyřešit přechodem od použití sloučenin zirkonia k reakcím katalyzovaným sloučeninami Ni a Pd. To umožnilo vyvinout nejen žádanou metodu pro přípravu pentasubstituovaných cyklopentadienů, ale také novou metodu pro přípravu pentasubstituovaných fulvenů. Příprava cyklopentadienů spočívá v reakci alkinů s halopropenoáty v přítomnosti katalytického množství NiBr<sub>2</sub> a Zn jako redukčního

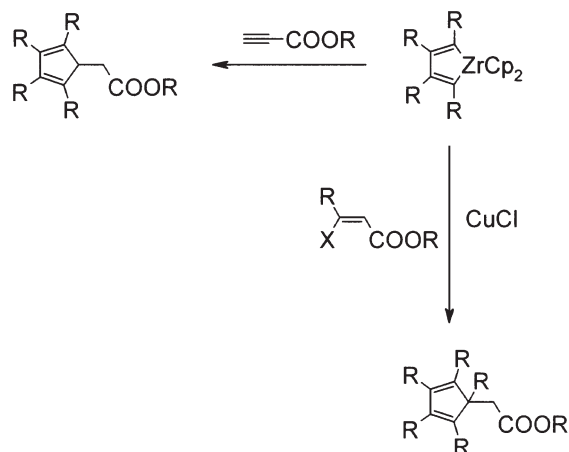


Schéma 1

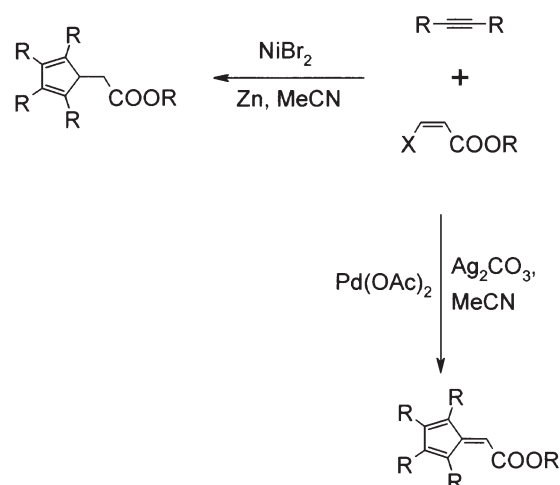


Schéma 2

činidla<sup>3</sup>. Toto byla vůbec první katalytická metoda pro přípravu pentasubstituovaných cyklopentadienů. Navíc se zjistilo, že průběh reakce závisí na následujících faktorech: přítomnost fosfinových ligandů, teplota a charakter halogenu v použitém halopropenoátu. K dalším změnám došlo při použití palladiových katalyzátorů, kdy se ukázalo, že místo cyklopentadienů jsou jediným produktem reakce fulveny. Ukázalo se, že katalytické množství Pd(OAc)<sub>2</sub> v přítomnosti Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jako báze efektivně katalyzuje reakce různé substituovaných alkinů s vinylydiody nesoucími elektronodonorové i elektronakceptorové substituenty. Tato reakce tak umožnila připravit celou řadu různě substituovaných fulvenů.

### LITERATURA

1. Takahashi T., Sun W.-H., Xi C., Kotora M.: Chem. Commun. 1997, 186.
2. Kotora M., Xi C., Takahashi T.: Tetrahedron Lett. 39, 4321 (1998).
3. Kotora M., Ishikawa M., Tsai F.-Y., Takahashi T.: Tetrahedron 55, 4969 (1999).

### ORTHO-EFEKT NEZNÁMÝ-ZNÁMÝ

#### JIŘÍ KULHÁNEK

*Katedra organické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, n. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, e-mail: jiri.kulhanek@upce.cz*

*Ortho*-efekt patří mezi nepříliš oblíbené problémy, které řeší organicko-fyzikální a korelační chemici. Strohé konstatování odlišného chování substituentů v poloze *ortho* a tedy nemožnost popisu tohoto chování Hammettovou rovnicí znamenala pro *ortho*-substituované deriváty benzenu odsunutí na pokraj zájmu chemiků 30. let. Jisté oživení v tomto smyslu znamenala až 70. léta, kdy se na stránkách odborných časopisů objevily práce pokoušející se popsat právě chování *ortho*-derivátů. *Ortho*-substituce se vyznačuje natolik specifickými projevy v porovnání se substitucí v jiných polohách, že se pro

něj vžil pojem *ortho*-efekt. Výraz efekt není zcela přesný, neboť *ortho*-efekt v sobě zahrnuje efektů více. I z tohoto důvodu byly učiněné pokusy popisu *ortho*-efektu nepříliš úspěšné.

Problematiku *ortho*-efektu lze řešit metodicky rozdílnými postupy. Jeden je založen na principu modelovém, druhý pak na principu chemometrickém. Jako model byla zvolena historicky osvědčená substituovaná benzoová kyselina. V případě modelovém pak převážně s alkyly<sup>1-3</sup> jako substituenty, pro odstranění dalších specifických interakcí. Při tomto řešení byly stanoveny hodnoty disociačních konstant jak v nevodných rozpouštědlech, tak v plynné fázi. Byla provedena separace polárního a sterického efektu jednotlivých alkylskupin a analyzována konformace příslušných *ortho*-derivátů.

Při chemometrickém principu<sup>4-6</sup> byla rovněž na modelu substituované benzoové kyseliny nalezena jako nejvýznamnější intramolekulární interakce mezi substituentem a reakčním centrem intramolekulární vodíková vazba a sterická interakce prostřednictvím solvatačních obalů. Při určitých kombinacích chemické struktury reakčního centra a substituentu může docházet i ke vzniku chemické vazby a uzavření kruhu. Všechny uvedené interakce jsou navíc ovlivněny rozpouštědlovými efekty.

*Práce byla podporována Grantovou agenturou ČR, číslo grantu 203/98/0602.*

#### LITERATURA

1. Kulhánek J., Exner O.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 1998, 1397.
2. Fiedler P., Kulhánek J., Decouzon M., Gal J.-F., Maria P.-Ch., Exner O.: Collect. Czech. Chem. Commun. 64, 1433 (1999).
3. Kulhánek J., Decouzon M., Gal J.-F., Maria P.-Ch., Fiedler P., Jiménez P., Roux M.-V., Exner O.: Eur. J. Org. Chem. 1999, 1589.
4. Pytela O., Liška J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 59, 2005 (1994).
5. Kulhánek J., Pytela O.: Collect. Czech. Chem. Commun. 62, 913 (1997).
6. Pytela O., Kulhánek J.: J. Phys. Org. Chem., v tisku.

#### RADIOIMUNOANALÝZA A METODY PŘÍBUZNÉ

##### LADISLAV LEŠETICKÝ

*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, e-mail: lesetic@natur.cuni.cz*

1. Názvosloví a klasifikace metod  
Definice a vymezení metod. Saturací analýza  
Radioreagenční metody  
Z důvodů především historických se pro analytické metody, které využívají jednak radioaktivně (nebo jinak) značenou sloučeninu, jednak imunochemickou reakci používají různé, často ne zcela průhledné termíny (RIA, EIA, IRMA, ELISA...)  
Kompetitivní a nekompetitivní vazebná analýza
2. Princip „vazebné analýzy“ (binding assay, ligand assay)

- 2.1. Značená sloučenina – způsoby značení. Výhody a nevýhody značek. Volba radionuklidu
- 2.2. Antigen (A<sub>b</sub>) a haptenu. Imunisece
- 2.3. Protilátka (A<sub>b</sub>). Polyklonální a monoklonální protilátky
3. Hlavní varianty
  - 3.1. Metoda značeného ligandu. Současná inkubace. Sekvenční inkubace. Vytěšňovací analýza
  - 3.2. Metoda značeného ligatu. Sendvičová analýza s ligandem nebo ligatem na pevné fázi
  - 3.3. Radioreceptorová analýza
4. Provedení analýzy
  - 4.1. Inkubace
  - 4.2. Separace volné a vázané frakce
  - 4.3. Měření (radioaktivity)
  - 4.4. Výpočet výsledku, interpretace
  - 4.5. Automatizace. Výhled do budoucna

#### SYNTEZA C<sub>2</sub>-SYMETRICKÝCH NERACEMICKÝCH 1,1'-BINAFTYLOVÝCH DERIVÁTŮ SUBSTITUČNÝMI REAKCIAMI V POLOHÁCH 2,2'

##### MARTIN PUTALA

*Katedra organickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: putala@fns.uniba.sk*

Axiálne chirálne 1,1'-binaftylové deriváty sú pre svoje výnimočné stereochemické vlastnosti predmetom širokého záujmu. Počet prác venovaných štúdiu ich syntézy, vlastností a využitia ročne presahuje 200. Osobitná pozornosť je sústredená na C<sub>2</sub>-symetrické 2,2'-substituované 1,1'-binaftylové deriváty, ktoré sú až na určité výnimky (ktoré budú diskutované) konfiguračne dostatočne stále.

Využitie týchto derivátov je podmienené tiež ich ľahkou dostupnosťou v enantioméne čistom stave ako aj možnosťou štruktúrnych modifikácií. Ako neracemické je ich možné pripraviť tromi základnými metódami<sup>1</sup>: 1) stereoselektívnym couplingom dvoch 2-substituovaných naftalénových jednotiek v polohách 1; 2) štiepením racemických binaftylových derivátov na stereoizoméry získané nestereoselektívnym couplingom dvoch naftalénových jednotiek (tento prístup je vhodný pre deriváty obsahujúce polárne skupiny); 3) stereokonzervatívnymi substitučnými reakciami v polohách 2,2' iných ľahko dostupných neracemických 2,2'-substituovaných 1,1'-binaftylových derivátov.

Posledná uvedená metóda je významná najmä pre syntézu takých derivátov, ktoré nie sú priamo dostupné prvými dvoma metódami. Rovnako môže predstavovať vhodnejšiu, alternatívnu cestu k niektorým iným neracemickým 2,2'-substituo-

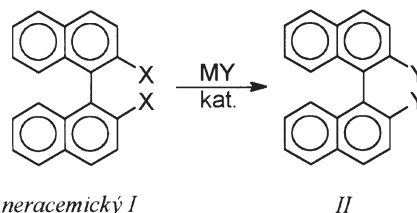


Schéma 1

Tabuľka I

Stereokonzervativita substitučních reakcí v polohách 2 a 2' na C<sub>2</sub>-symetrických neracemických 1,1'-binaftylových derivátůch

I	Kat.	M	II	SV	Lit.
X	(činidlá)		Y		
Substitúcie bisdiazónovej soli					
N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	–	K	SeCN	sk	2
N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	HgBr <sub>3</sub> <sup>-</sup>	K	Br	sk	3
N <sub>2</sub> <sup>+</sup>	HgI <sub>3</sub> <sup>-</sup>	K	I	sk	3
Cez organokovové intermediáty					
Br	(1, BuLi)	Cl	PPh <sub>2</sub>	r	4
Br	(1, BuLi)	Cl, F	SiR <sub>3</sub>	čr	5
Br	(1, BuLi; 2, CuBr <sub>2</sub> )		Bin	čr	6
Br	(1, BuLi; 2, CpO)		Cp	sk	7
Prechodnými kovmi sprostredkované reakcie					
OTf	Ni/dppe	H	PPh <sub>2</sub>	sk	8
OTf	Ni/dppe	H	AsPh <sub>2</sub>	sk	9
OTf	Pd/dppp (CO/MeOH)		CO <sub>2</sub> Me	sk	10
OTf	Ni/dppe	MgI	Me	sk	11
I	Ni/dppe	MgI	Me	sk	12
I	Ni/dppe	ZnMe	Me	sk	12
I	Pd/AsPh <sub>3</sub>	SnMe <sub>3</sub>	Me	r	12
I	Pd/dppf	ZnCl	Fc	sk	13
I	Pd/dba	B(OH) <sub>2</sub>	Fc	r	13
I	Pd/PPh <sub>3</sub>	SnMe <sub>3</sub>	Fc	r	13
I	Pd/dppf	ZnCN	CN	sk	14
I	CuI/Pd/PPh <sub>3</sub>	K	CN	čr	14
Prešmyk					
O-CS-NMe <sub>2</sub>			S-CO-NMe <sub>2</sub>	sk	15

SV – stereochemický výsledok, sk – stereokonzervatívne (miera zachovania sereogénnej informácie >90 %), ČR – čiastočná racemizácia, r – racemizácia (miera zachovania sereogénnej informácie <10 %), Bin – Y,Y = 1,1'-binaftalén-2,2'-diyl, CpO – 3,4-dialkylcyklopent-2-én-1-ón, Cp – Y = 3,4-dialkyl-1-hydroxycyklopent-2-én-1-yl, Fc – Y,Y = ferocén-1,1'-diyl

vaným 1,1'-binaftylovým derivátom. Avšak substitúcia v polohách 2 a 2' vyžaduje osobitnú pozornosť, aby sa nedošlo k racemizácii, keďže zaniká a vzniká väzba v polohách, kde stericke odpudzovanie týchto substituentov je rozhodujúce pre konfiguračnú stabilitu. Jedná sa tak o stereochemický aspekt substitučních reakcií funkcionalizovaných arénov, jedinečný pre tieto binaftylové deriváty.

Ako vhodné substráty I, na ktorých bola sledovaná stereokonzervativita substitučních reakcií v polohách 2 a 2', boli použité bisdiazóniová soľ (X = N<sub>2</sub><sup>+</sup>), bistriflát (X = OTf), dibromid (X = Br) a diiodid (X = I). Výsledky sú zhrnuté v nasledovnej tabuľke. Diskutovaný bude aj pravdepodobný mechanizmus – konfiguračná stabilita intermediátov a z toho vyplývajúci stereochemický výsledok reakcií.

Táto práca bola podporovaná grantami 1/7013/20 VEGA SR a UK/1528/97, 13904/98, 13724/99, 179/2000, 180/2000.

## LITERATÚRA

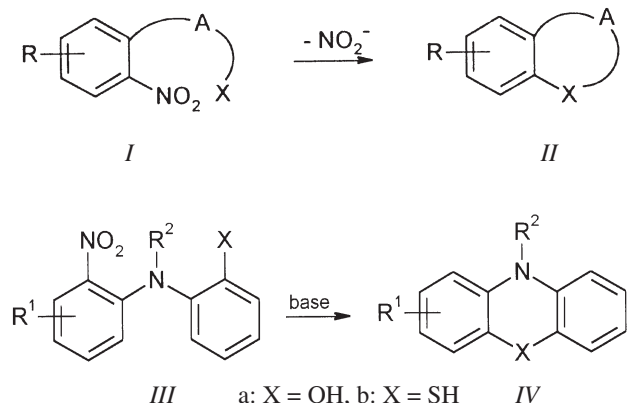
- Putala M.: Enantiomer 4, 243 (1999).
- Tomoda S., Iwaoka M.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1988, 1283.
- Brown K. J., Berry M. S., Murdoch J. R.: J. Org. Chem. 50, 4345 (1985).
- Myashita A., Takaya H., Souchi T., Noyori R.: Tetrahedron 40, 1245 (1984).
- Hoshi T., Shionori H., Suzuki T., Ando M., Hagiwara H.: Chem. Lett. 1999, 1245.
- Rajca A., Safronov A., Rajca S., Wongsritatanakul J.: J. Am. Chem. Soc. 122, 3351 (2000).
- Halterman R. L., Ramsey T. M.: Organomet. Chem. 530, 225 (1997).
- Cai D. W., Payack J. F., Hughes D. L., Verhoeven T. R., Reider P. J.: J. Org. Chem. 59, 7180 (1994).
- Kojima A., Boden C. D. J., Shibasaki M.: Tetrahedron Lett. 38, 3459 (1997).
- Ohta T., Ito M., Inagaki K., Takaya H.: Tetrahedron Lett. 34, 1615 (1993).
- Takahashi O., Kameda M., Maruoka K.: J. Am. Chem. Soc. 121, 6519 (1999).
- Kasák P., Putala M.: nepublikované výsledky.
- Kasák P., Mikláš R., Putala M.: pripravené do tlače.
- Kasák P., Putala M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 65, 729 (2000).
- Cossu S., De Lucchi O., Fabbri D., Valle G., Painter G. F., Smith R. A. J.: Tetrahedron 53, 6073 (1997).

### NUKLEOFILNÍ AROMATICKÉ DENITROCYKLIZAČNÍ REAKCE A JEJICH MÍSTO V SYNTÉZE HETEROCYKLICKÝCH SLOUČENIN

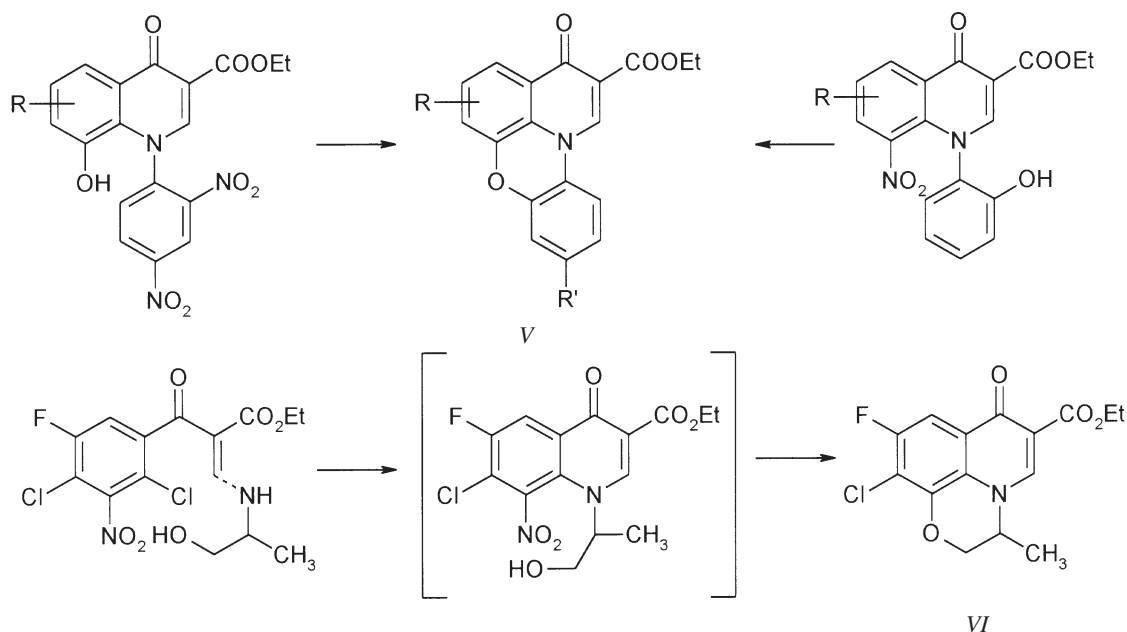
## STANISLAV RÁDL

Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Kouřimská 17, 130 60 Praha 3, e-mail: radl@vufb.cz

Je obecně známo, že vhodně aktivovaná nitroskupina může sloužit jako odstupující skupina při reakci s řadou nukleofilů. Pokud reakce probíhá intramolekulárně, dochází k tvorbě nového kruhu. Proto se tato verze obvykle označuje jako nukleofilní denitrocyklizační reakce. Obecně lze tuto reakci







znázornit jako přeměnu *I* na *II*. Protože odstupující nitroskupina je ve výchozí látce *I* vázána na aromatickém nebo heteroaromatickém jádře, bývá v označení této reakce používáno i adjektivum aromatická.

Reaktivita nitroskupiny v těchto reakcích je obvykle srovnatelná nebo vyšší než reaktivita odpovídajících chlorderivátů, někdy je ale dosaženo i reaktivity odpovídající reaktivitě příslušných fluorderivátů. Jako nukleofily *X* slouží hlavně anionty O, S, RN, vzácněji i karbanionty. Výhodnost denitrocyklizační strategie většinou netkví v samotném cyklizačním stupni, ale ve snadnosti syntézy příslušného meziprojektu, který je podroben cyklizačnímu stupni. Často totiž přítomnost nitroskupiny odstupující ve stupni nukleofilní cyklizace je nutná pro provedení předcházejícího stupně, který svým silným elektronegativním působením vlastně umožňuje.

Dosud popsané příklady denitrocyklizačních reakcí zahrnují tvorbu pětičlenných, šestičlenných, ale výjimečně i sedmi a osmičlenných heterocyklů. Některé typy denitrocyklizačních reakcí jsou preparativně využívány již delší dobu, i když obvykle nejsou metodou volby. Jedná se hlavně o Turpinovu metodu syntézy fenoxazinů *IVa* a o obdobnou syntézu fenothiazinů *IVb*.

I přes jednoduchost provedení, a často i výhodnost výchozích surovin, jsou denitrocyklizační reakce poměrně málo probádány. Kromě Turpinovy reakce, která bývá zahrnuta do obsáhlejších kompendií zabývajících se heterocyklickou chemií, syntéza ostatních heterocyklů dostupných touto metodou není odpovídajícím způsobem zpracována ve formě přehledů. Některé tyto reakce jsou zahrnuty do obsáhlejšího přehledu zabývajícím se obecně syntetickými metodami, v nichž se uplatňuje participace *ortho*-substituovaných benzenových derivátů<sup>1</sup>. Stručně byla tato problematika shrnuta v minireview<sup>2</sup>. Kromě komplexního literárního přehledu denitrocyklizačních reakcí přednáška zahrnuje také podrobnější zkušenosti získané na pracovišti autora týkající se jednak syntézy analog antibakteriálních chinolonů (například 3-oxo-3*H*-pyrido[3,2,1-*k,l*]phenoxazinů<sup>3</sup> *V* a 7-oxo-7*H*-pyrido[1,2,3-*d,e*][1,4]benzoxazinů<sup>4</sup> *VI*), jednak syntézy derivátů chindolinu<sup>5</sup>.

Přednáška by měla přispět k lepší informovanosti o této reakci chemikům, aby ve vhodných případech tuto reakci zahrnuli do okruhu metodik zvažovaných při plánování syntézy.

#### LITERATURA

1. Preston P. N., Tennant G.: Chem. Rev. 72, 527 (1972).
2. Rádl S.: Janssen Chimica Acta 11, 12 (1993).
3. Rádl S., Zikán V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 54, 505 (1259).
4. Rádl S., Kovářová L., Moural J., Bendová R.: Collect. Czech. Chem. Commun. 56, 1937 (1991).
5. Rádl S., Konvička P., Váchal P.: J. Heterocycl. Chem., v tisku.

#### HETEROPENTALENY – STRUKTURA, REAKTIVITA, APLIKACE

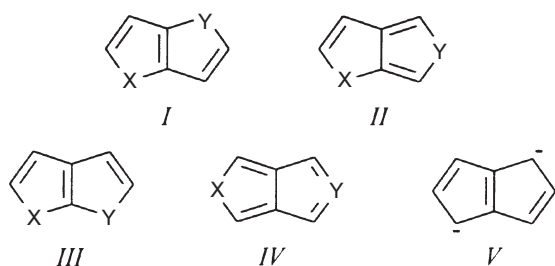
##### JIŘÍ SVOBODA

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: Jiri.Svoboda@vscht.cz

Diheteropentaleny jsou aromatické heterocyklické sloučeniny se dvěma pětičlennými kruhy, ve kterých je v každém kruhu jeden atom uhlíku nahrazen heteroatomem, nejčastěji N, O, S, Se, vzácněji Te a P (cit.<sup>1</sup>). Formálně lze odvodit čtyři základní struktury s centrální C–C vazbou (*I–IV*) izoelektronické s 10 $\pi$ -elektronovým dianiontem pentalenu (*V*).

Informace o jednotlivých členech této skupiny jsou velmi nevyvážené, vyplývají především z rozdílné stability heterocyklických systémů. Teoretické aspekty aromaticity byly zkoumány jen okrajově. Pouze některé základní sloučeniny se podařilo syntetizovat.

V poslední době se pozornost upírá k využití těchto pla-



nárních elektronově bohatých sloučenin v oblasti materiálové chemie. V přednášce budou diskutovány některé zajímavé aspekty chemie především 1,4-diheteropentalenů včetně jejich využití jako potenciálních ferroelektrických kapalných krystalů.

#### LITERATURA

1. Krutošíková A., v knize: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II* (Katritzky A. R., Rees C. W., Scriven E. F., ed.), sv. 7, str. 1. Pergamon Press, Oxford 1996.

#### CHEMIE A BIOLOGICKÁ AKTIVITA FLAVONOLIGNANŮ ZE *Silybum marianum*

**DANIELA WALTEROVÁ<sup>a</sup> a VLADIMÍR KŘEN<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, e-mail: walter@tunw.upol.cz, <sup>b</sup>Mikrobiologický ústav, Laboratoř biotransformací, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, e-mail: Kren@biomed.cas.cz

*Silybum marianum* je více než dvě tisíciletí známá léčivá rostlina používaná v tradiční medicíně k léčbě řady jaterních onemocnění. Standardizovaný extrakt ze semen *S. marianum*, silymarin, deklarovaný v různých zemích jako lék nebo potravní doplněk, obsahuje 70–80 % silymarinového komplexu (směs flavonolignanů silybinu, silychristinu, silydianinu, isosilybinu, dehydrosilybinu a několika flavonoidů, např. taxifolinu) a 30–20 % polymerních a různě oxidovaných polyfenolických sloučenin. Hlavní komponenta silymarinového komplexu, silybin (3,5,7-trihydroxy-2-[3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxan-6-yl]-4-chromanon), je směsí dvou diastereomerů v přibližném poměru 1:1.

Poznátky o biologické aktivitě flavonolignanů pocházejí z četných farmakologických studií uskutečněných především se silymarinem a silybinem<sup>1</sup>. Účinky *in vivo* zahrnují hepatoprotektivní efekt vůči akutní i chronické intoxikaci experimentálními, průmyslovými a přírodními toxiny i poškození jater některými léky, hypolipidemický a hypercholesterolemický efekt, omezení lipoperoxidačních pochodů při experimentálním diabetu, inhibici indukovaných zánětlivých a proliferativních procesů. V řadě *in vitro* experimentů byla demonstrována schopnost silymarinu a silybinu zhaset radikály, dokumentovány antioxidační vlastnosti a cytoprotektivní účinky v různých modelech buněčného poškození, popsán inhibiční vliv na aktivity oxygenas a peroxidas. Byl prokázán stimulač-

ní efekt silybinu (a silychristinu, nikoliv silydianinu a isosilybinu) na aktivitu RNA polymerasy I vedoucí k akcelerované syntéze ribosomální RNA a buněčných proteinů. Byla demonstrována kompetitivní vazba silybinu na estradiolový receptor a jeho přímá interakce s proteinovými i lipidovými komponentami buněčných membrán.

Na našem pracovišti jsme se zaměřili na studium biologické aktivity dalších komponent silymarinového komplexu (čistých flavonolignanů silychristinu, silydianinu, isosilybinu, dehydrosilybinu, polymerní fenolické frakce) a glykosylovaných derivátů silybinu, které byly připraveny<sup>2</sup> s cílem zvýšit rozpustnost a biodostupnost, eventuálně modifikovat účinnost výchozí látky. V porovnání se silybinem, event. i silymarinem, byla vyhodnocena schopnost uvedených sloučenin zhaset radikály, inhibovat lipoperoxidaci buněčných membrán, studován jejich cytoprotektivní účinek vůči chemicky indukovanému buněčnému poškození hepatocytu a vliv na expresi a aktivitu vybraných izoform cytochromu P450.

Přes rozsáhlé znalosti o biologické aktivitě silymarinu a jednotlivých flavonolignanů není detailní mechanismus terapeutického účinku silymarinu objasněn. Výsledky klinických experimentů se silymarinem jsou nejednoznačné a obtížně vyhodnitelné (zvláště u alkoholiků)<sup>3</sup>. Rozdíly v biologické aktivitě jednotlivých komponent silymarinu a studovaných derivátů silybinu budou diskutovány v souvislosti s otázkou budoucího uplatnění silymarinu jako nutraceutika či terapeutického přípravku a perspektivy využití čistých flavonolignanů, event. derivátů připravených jejich modifikací v léčbě jaterních onemocnění.

Autoři děkují Grantové agentuře ČR za podporu projektu 303/98/0414.

#### LITERATURA

1. Morrazoni P., Bombardelli E.: *Fitoterapia* 64, 3 (1995).
2. Křen V., Kubisch J., Sedmera P., Halada P., Příkrylová V., Jegorov A., Cvak L., Gebhardt R., Ulrichová J., Šimánek V.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1997, 2467.
3. Flora K., Hahn M., Rosen H., Benner K.: *Am. J. Gastroenterol.* 93, 139 (1998).

#### FEROMONY DRUHU *Homo sapiens*

#### JAN ŽDÁREK

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, zdarek@uochb.cas.cz

Během kmenového vývoje lidského druhu získaly dominantní úlohu při dorozumívání podněty zrakové a sluchové, což do značné míry souvisí se změnou způsobu pohybu – ze čtyřnohého stromového živočicha se vyvinul dvounohý vzpřímený tvor. Chemická komunikace, která je původním způsobem dorozumívání mezi organismy a dodnes převládá u drtivé většiny ostatních tvorů od kvasinek po savce, pozbyla během antropogeneze dominantní význam a v souvislosti s tím se redukovaly i čichové schopnosti člověka. U moderního člověka lze dokonce pozorovat společensky podmíněné tendence

aktivně potlačovat vlastní biologické olfaktorické signály (deodoranty), popřípadě je nahrazovat umělými (parfémy). Znamená to tedy, že lidé už postrádají schopnost vysílat a přijímat sociální chemické zprávy a že tedy chemické signály ztratily v biologii člověka jakoukoliv komunikační úlohu? Vědecky podložený výzkum této problematiky začal teprve začátkem sedmdesátých let a dodnes na tuto otázku nemáme zcela uspokojivou odpověď. Existují ovšem indicie, že tomu tak není a že se ani člověk v podstatě nevyvíká z obecně platné závislosti organismů na vnitrodruhových chemických komunikačních prostředcích zvaných feromony.

Termín poprvé použili Karlson a Lüscher<sup>1</sup> v roce 1959 pro označení látek vysílaných do prostředí jedním živočichem a ovlivňujících chování nebo fyziologické reakce jiného jedince téhož druhu. Do té doby se jim nejčastěji říkalo ektohormony. Podle způsobu působení rozlišujeme feromony spouštěče (vnímají je smyslové orgány, stimulují náhlé změny chování) a feromony působky (působí prostřednictvím neuroendokrinních orgánů, vyvolávají dlouhodobé fyziologické změny).

Představa, že i člověk vydává feromony, je dráždivá, ale důkazy dlouho chyběly. Biologické testy na lidských subjektech jsou obtížné a možnosti komerčního využití, popř. zneužití takových látek svádějí k tomu, aby výsledky výzkumu byly utajovány. Teprve v posledním desetiletí došlo v této oblasti výzkumu k určitému průlom, takže dnes můžeme existenci lidských feromonů pokládat za prokázanou, i když o jejich biologické úloze panují stále jen dohady. Lidské tělo, podobně jako těla ostatních živočichů, vydává do prostředí emanace pocházející z různých jeho částí. Jsou to především sekrety různých typů kožních žláz (potní, apokrinní, tukové), jejichž směs představuje pro každého jedince specifickou čichovou pečeť. Žlázy jsou zvláště koncentrovány na určitých, často ochlupených místech (podpaždí, pubická krajina, okolí prsních bradavek, horní ret). Biochemické složení sekretů závisí na faktorech genetických, hormonálních, metabolických, potravních, psychologických, sociálních i environmentálních. Je logické, že kožní sekrety byly podrobeny jako první badatelské skrutině s cílem objasnit jejich možnou komunikační funkci. Výsledkem byla identifikace různých steroidních látek – vomeroferinů –, jež poskytly podklady pro syntézu více než 1200 analogů<sup>2</sup>.

S výzkumem struktury biologických látek musí jít ruku v ruce i studium jejich funkce a s tím souvisejících receptorů. Dalším úkolem bylo proto pátrání po orgánu, pomocí něhož by mohl člověk feromony vnímat. Savci k tomu většinou (i když ne výlučně) používají tzv. vomeronasální orgán (VNO, Jacobsonův orgán). Je to malá tubulární struktura ústící do nosní dutiny, která je vystlaná receptorovými buňkami napojenými na akcesorický čichový lalok mozku a přední část hypothalamu – neuroendokrinního centra řídicího řádu podvědomých činností souvisejících s reprodukcí a chováním. Jsou to tedy zcela jiné oblasti mozku než na jaké je napojen čichový epitel nosu (čichový lalok). U dospělého člověka byl VNO donedávna považován za nefunkční vývojový rudiment, i když byla jeho existence známa už od začátku 18. století. Teprve před několika lety byl publikován experimentální důkaz, že působení vomeroferinu PDD (pregna-4,20-dien-3,6-dionu) na VNO člověka vyvolává změny v jeho autonomním nervovém systému a v periodicitě vylučování neurohormonů hypofýzy regulujících hladinu ženských<sup>3</sup> i mužských<sup>4</sup> pohlavních hormonů, a že tedy existuje potenciálně funkční spojení

mezi VNO, hypothalamem, hypofýzou a gonádami i u člověka. Anatomický důkaz pro existenci nervového spojení mezi VNO a mozkem člověka však zatím chybí, stejně jako chybí anatomický důkaz samotné existence akcesorického čichového laloku. Objev by v akademické obci patrně získal na větší přesvědčivosti, kdyby jeho autory nebyli právě lidé silně angažovaní v lukrativních kosmetických a farmaceutických firmách propagujících využití lidských feromonů v obou odvětvích. Popsané výsledky ovšem nic nevypovídají o tom, zda člověk skutečně používá tento hypotetický akcesorický systém pro vnímání a zpracování chemických signálů vylučovaných jinými jedinci svého druhu.

Existuje ovšem celá řada nepřímých experimentálně podložených důkazů pro existenci chemických komunikačních vazeb mezi příslušníky lidského druhu. Bylo např. dokázáno, že matka rozezná vlastního novorozence po čichu stejně jako kojeneček dává přednost vůni prsu nebo podpaždí vlastní matky před vůněmi matek cizích. Identifikační funkce tělních emancí byla demonstrována i u dospělých lidí. Nejprůkaznější byl vliv předpokládaných feromonů prokázán v těch případech, kdy ovlivňují reprodukční fyziologii jiných osob téhož nebo opačného pohlaví, což jsou účinky dobře známé a již dříve prozkoumané u různých savců<sup>5</sup>.

Nejdále známým a zatím asi nejpropracovanějším příkladem možné feromonové komunikace u člověka je tzv. „dormitory effect“, jehož podstatou je obecně známý poznatek, že se menstruační cykly obyvatelk ženských obytoven po určité době společného pobytu synchronizují. Někdy se označuje též jako McClintock's effect, podle McClintockové, která první tento účinek ještě jako studentka psychologie experimentálně prokázala a výsledky publikovala v časopise Nature již v roce 1971 (cit.<sup>6</sup>). Později na základě výsledků studia reprodukčního chování potkanů vypracovala model založený na alternativních účincích dvou hypotetických feromonů, jednoho, který prodlužuje, a druhého, který zkracuje fáze ovariálních cyklů. Zcela nedávno platnost modelu ověřila (ve spoluautorství s Sternovou<sup>7</sup>) i u člověka. Badatelky zjistily, že výměšky kožních žláz z podpaždí žen, které jsou ve folikulární fázi menstruačního cyklu (tj. na jeho začátku), zkracuje folikulární fázi příjemkyň, zatímco emanace získané během ovulace dárkyň folikulární fázi příjemkyň prodlužuje; spolupůsobení obou faktorů pak vede k synchronizaci menstruačních cyklů. Dokázaly tím, že těkavé látky jednoho člověka ovlivňují prostřednictvím neurohormonálních mechanismů biologický rytmus ovulace jiného jedince a lze je proto považovat za lidské feromony. Jejich skutečná biologická úloha (selektivní výhodnost pro přežití) však není zřejmá. Jiným experimentálně doloženým příkladem lidského feromonu–působku jsou mužské podpažní sekrety, které menstruační cyklus žen zpravidla zkracují<sup>8</sup>.

Kromě steroidních vomeroferinů byly ve výměšcích kožních žláz a v moči nalezeny 16-androsteny (původně identifikované jako kančí feromon 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol a 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-on), které u žen ovlivňují frekvenci interakcí s muži<sup>9</sup>. Dalším potenciálním zdrojem lidských feromonů jsou vaginální sekrety. Ty obsahují směs nižších mastných kyselin, které u opic stimulují páření (feromon kopulin), u člověka však jednoznačné výsledky neposkytly.

Studium funkce smyslových buněk VNO člověka na molekulární úrovni nepřineslo zatím jednoznačné závěry<sup>10</sup>. Pořídalo se sice nalézt dva lidské geny velmi podobné genům,

kteří kódují receptorové proteiny ve VNO potkana, problém je ale v tom, že lidské geny obsahují sekvence, jež by produkovaly zkrácené receptorové proteiny a ty by byly pravděpodobně nefunkční. Jsou to tedy pseudogeny.

Objev feromonové komunikace u člověka může mít dalekosáhlé praktické důsledky. Identifikované aktivní složky tělních emanací nebo jejich syntetické analogy vomeroferiny, které by byly schopny ovládat reprodukční fyziologii v nanogramových množstvích prostřednictvím přímého působení na hypothalamus, slibují být přijatelnou alternativou hormonální antikoncepce před menopauzou nebo hormonální substituce po menopauze, prostředkem k manipulaci hladiny pohlavních hormonů při léčbě rakoviny prostaty nebo prsu, náhradou za antidepresiva a jiné léky na duševní poruchy nebo předmenstruační syndrom, popř. mohou pomáhat při léčbě obezity. Není proto divu, že už vznikly společnosti, které se výzkumem lidských feromonů zabývají komerčním způsobem a že hodnota jejich akcí i roční obrat jejich produktů dosahují úctyhodných čísel. A to je právě jeden z důvodů, proč se na publikované výsledky v této oblasti musíme dívat maximálně kritickým pohledem.

## LITERATURA

1. Karlson P., Lüscher M.: *Nature* 183, 55 (1959).
2. Jennings-White C., Monti-Bloch L., Berliner D. L.: *International Symposium on Olfaction and Taste XII* (1997).
3. Monti-Bloch L., Jennings-White C., Diaz-Sanchez V.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58, 259 (1996).
4. Monti-Bloch L., Diaz-Sanchez V., Jennings-White C., Berliner D. L.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 237 (1998).
5. Johns, M. A., v knize: *Chemical Signals, Vertebrates and Aquatic Invertebrates* (Muller-Schwarze D., Silverstein R. M., ed.), str. 341. Plenum Press, New York 1980.
6. McClintock M. K.: *Nature* 229, 244 (1971).
7. Stern K., McClintock M. K.: *Nature* 392, 177 (1998).
8. Cutler W. B., Preti G., Krieger A., Huggins G. R., Garcia C. R., Lawley H. J.: *Horm. Behav.* 20, 463 (1986).
9. Cowley J. J., Brooksbank B. W. L.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39, 647 (1991).
10. Dulac C., Axel R.: *Cell* 83, 195 (1995).

## HETEROCYKICKÁ ANALOGA INKRUSTOPORINU

JIRÍ KUNEŠ, VOJTĚCH BALŠÁNEK,  
MARCEL ŠPULÁK a MILAN POUR

Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové, e-mail: balsanek@faf.cuni.cz

Připravili jsme sérii analog antifungálního sekundárního metabolitu (-)inkrustoporinu<sup>1,2</sup> (*I*) s thienylovým jádrem v poloze 3 s cílem zjistit vliv zavedení heteroarylového zbytku na antimykotickou aktivitu.

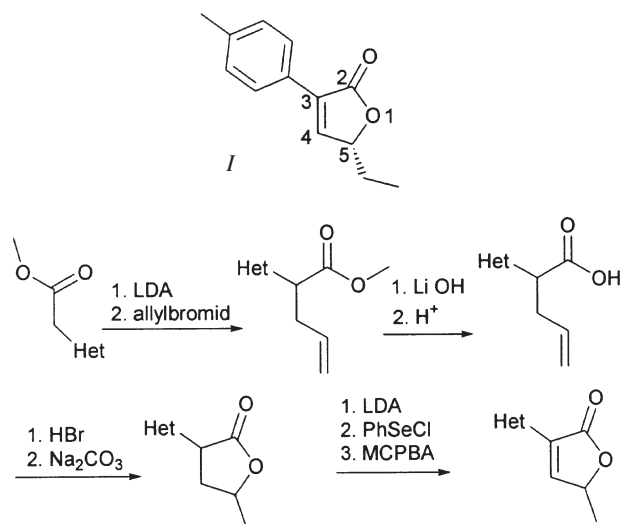


Schéma 1A

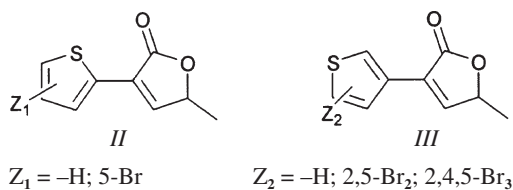


Schéma 1B

Racemické 5-methyl-3-thienyl-5*H*-furan-2-ony (*II*, *III*) jsme připravovali podle schématu 1A.

Vzhledem k vyšší antimykotické aktivitě halogenovaných derivátů v řadě 5-methyl-3-fenyl-5*H*-furan-2-onů jsme rovněž připravili bromované thienylderiváty. Methylestery příslušných thienyloctových kyselin jsme bromovali za různých podmínek do 1., 2. a 3. stupně. Tyto methylestery jsme výše zmíněným způsobem převedli na laktony *II* a *III*.

Připravené látky byly testovány na antimykotickou aktivitu. Ze zjištěných aktivit vyplývá, že náhrada fenylu izosterním thienylem, jakož i substituce thienylového jádra halogeny nevede k látkám o výrazně vyšší účinnosti.

Práce byla podporována granty 27/1999/B GA UK a VŠ 97124.

## LITERATURA

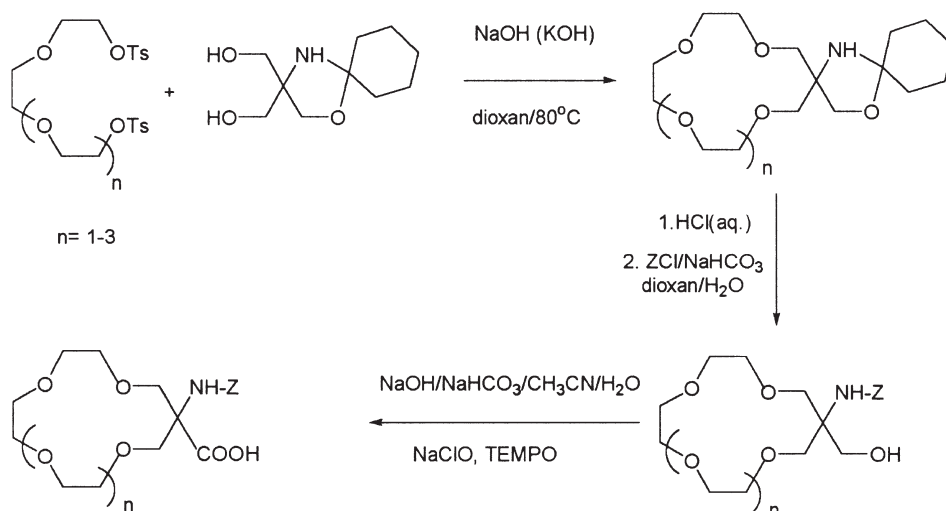
- Zapf S., Anke T., Sterner O.: Acta Chem. Scand. 49, 233 (1995).
- Yajima A., Mori K.: Liebigs Ann. 1996, 1091.

$\alpha$ -AMINOKYSELINY S ORTHOGONÁLNĚ  
ANELOVANÝM OLIGO-(OXYETHYLENOVÝM)  
MAKROCYKLEM A JEJICH ANHYDRODERIVÁTY

JIRÍ ZÁVADA<sup>a</sup>, MARTIN BĚLOHRADSKÝ<sup>a</sup>  
a IVANA CÍSAŘOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: martinb@uochb.cas.cz, <sup>b</sup>Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2

V rámci grantového projektu se zabýváme aminokyselinami, které obsahují jako nový strukturální prvek crowntherový makrocyklus, orthogonálně anelovaný k amino a karboxy skupině. Toto uskupení kombinuje schopnost aminokyselin



koordinovat přechodové kovy se schopností crownů komplexovat kationty alkalických kovů a kovů alkalických zemin. Nyní byly připraveny základní mono- $\alpha$ -aminokyseliny s třemi různě velkými crownetherovými jednotkami. Klíčovými kroky při jejich přípravě jsou makrocyclizační reakce ditosylátu oligoethylenglykolu s chráněným tris(hydroxymethyl)aminomethanem a oxidace vznikajícího aminoalkoholu za katalýzy nitroxylovým radikálem TEMPO (schéma 1B).

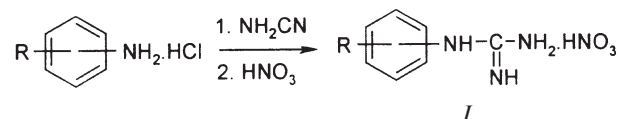
Ze získaných aminokyselin byly připraveny standardním postupem přes chráněný dipeptid odpovídající dioxopiperaziny, u nichž očekáváme zajímavé samoskladebné vlastnosti.

### ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA NA JÁDRĚ SUBSTITUOVANÝCH FENYLGUANIDINIUMNITRÁTŮ

KAREL PALÁT<sup>a</sup>, GABRIELA BRAUNEROVÁ<sup>b</sup>, MILAN ŠLOSÁREK<sup>b</sup> a JIŘÍ JANOTA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: braunero@faf.cuni.cz, palat@faf.cuni.cz, <sup>b</sup>Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

V rámci systematického výzkumu antimykobakteriálních látek na naší katedře byla připravena série substituovaných fenylguanidiniumnitrátů *I*. Tyto sloučeniny byly připraveny reakcí substituovaných fenylamoniových solí s kyanidem<sup>1,2</sup> v tavenině za vzniku substituovaných fenylguanidiniů. Jejich okyselením byly získány příslušné guanidiniumnitráty.



R = alkyl, alkylsulfanyl, alkyloxy

Látky byly testovány na antimykobakteriální aktivitu proti kmenům *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. avium* a *M. intracellulare*. Nejúčinnější látky vykazovaly antimykobakteriální aktivitu řádově jednotek až desítek  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

*Naše práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 111600001 Ministerstva školství a mládeže ČR.*

#### LITERATURA

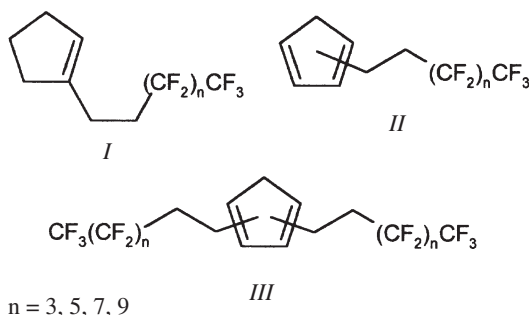
1. Mc. Kee R. M.: Am. Chem. J. 26, 209 (1901).
2. Kämpf A.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 37, 1682 (1904).

### MONO- A BIS[(PERFLUORALKYL)ETHYL]-CYKLOPENTADIENY JAKO INTERMEDIÁTY PRO FLUOROFILNÍ KATALYZÁTORY

TOMÁŠ BRÍZA<sup>a</sup>, JAROSLAV KVÍČALA<sup>a</sup>, OLDŘICH PALETA<sup>a</sup> a JAN ČERMÁK<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: kvicalaj@vscht.cz, <sup>b</sup>Ústav chemických procesů ČSAV, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6

Komplexy přechodných kovů s cyklopentadienovými ligandy obsahujícími jeden polyfluoralkylový řetězec nejsou dostatečně fluorofilní pro použití ve fluorových dvoufázových systémech<sup>1,2</sup>. Cílem naší syntézy proto byly cyklopentadieny substituované dvěma polyfluoralkylovými řetězci. První metodou vycházející z radikálové adice na alkenylcyklopentanol jsme získali modelové [(perfluoralkyl)ethyl]cyklopenteny *I*, vzhledem k vedlejším reakcím však nebylo možné získat bispolyfluoralkylované produkty. Druhá metoda využívající přímé nukleofilní substituce cyklopentadienylovým aniontem poskytla žádané mono- a bis[(perfluoralkyl)ethyl]cyklopentadieny *II* a *III*.



*Práce byla provedena za podpory grantu GA ČR 203/99/0135.*

#### LITERATURA

1. Hughes R. P., Trujillo H. A.: Organometallics 15, 286 (1996).
2. Auerová K., Čermák J., Nguyen H. T. T., Blechta V.: 31<sup>st</sup> Symposium on Catalysis. Praha 1999.

### CESTA K HETEROCYKLIČKÝM ANALOGŮM PROTITUBERKULÓZNĚ AKTIVNÍCH DERIVÁTŮ 3-ARYL-2H-1,3-BENZOXAZIN-2,4-DIONŮ

KAREL WAISSER, OTAKAR BUREŠ a HYNEK DOSTÁL

Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové, e-mail: bures@faf.cuni.cz, waisser@faf.cuni.cz

Deriváty 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4-dionů lze považovat za perspektivní širokospektré antimykobakteriální slou-

čeniny. Vliv substitučních obměn na vázaném fenylu v poloze 3 je již znám<sup>1</sup>. K dořešení zbývá vliv substitučních analogů v cyklu B a dále vliv jiných heteroatomů. Z velké části se jedná o nepopsané sloučeniny. Při přípravě jejich heterocyklických analogů jsme uvažovali o uplatnění podobných postupů jako u derivátů 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4-dionů<sup>2</sup>. Potkali jsme se však s řadou potíží. Při přípravě derivátů chinazolinu<sup>3</sup>, na rozdíl od derivátů benzoxazinu, nejdříve vznikaly 2-[(ethoxykarbonyl)amino]benzanilidy, které byly následně termicky cyklizovány na 3-fenylchinazolin-2,4(1H,3H)-diony. Při pokusech o přípravu analogických derivátů pyrido[2,3-e]-1,3-oxazin-2,4-dionů reakce za podobných podmínek neproběhla a 3-[(ethoxykarbonyl)oxy]pikolinanilidy vznikali teprve po převedení hydroxyskupiny výchozích pikolinanilidů na anion (pomocí NaH). Následná termická cyklizace do teploty 280 °C neprobíhala. Na dalších modifikacích postupů pracujeme.

*Práce byla podporována granty GA UK 234/2000/BCH, FRVŠ 1304/G/2000 a projektem MŠMT MSM 11600001.*

#### LITERATURA

1. Waissner K., et al.: Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 331, 3 (1998).
2. Wagner G., et al.: Pharmazie 21, 161 (1996).
3. Waissner K., et al.: Collect. Czech. Chem. Commun. 64, 1902 (1999).

#### VAZEBNÉ VLASTNOSTI ACETYLCHOLINESTERASY INHIBOVANÉ FLOUROORGANOFOSFÁTY

**JIŘÍ CABAL, JIŘÍ PATOČKA, JIŘÍ BIELAVSKÝ a JIŘÍ KASSA**

*Katedra toxikologie, Vojenská lékařská akademie, 500 01 Hradec Králové, e-mail: cabal@pmfhk.cz, patocka@pmfhk.cz, bielavsky@pmfhk.cz, kassa@pmfhk.cz*

Vojensky významné organofosfáty, sarin, soman a cyklosin způsobují fosforylaci aktivního místa acetylcholinesterasy. Kovalentní navázání organofosfátu na enzym je příčinou změny vazebních vlastností pro další látky vstupující do aktivního místa enzymu. Bylo sledováno, jak uvedené organofosfáty mění afinitu šesti vybraných reaktivátorů fosforylované acetylcholinesterasy se strukturou pyridiniumaldoximu. Změny afinity byly kvantifikovány jako poměr disociačních konstant enzym-reaktivátorového komplexu fosforylovaného a intaktního enzymu.

Sarinem způsobené změny afinity byly nevýrazné v rámci jednoho řádu a zřejmě i bez zřetelného vlivu struktury reaktivátorů. Soman ovlivnil všechny disociační konstanty vyrovnaným cca pětinašobným nárůstem jejich hodnoty. S ohledem na to, že uvedené tři organofosfáty se od sebe liší pouze tvarem a velikostí *O*-alkyl skupiny, lze z toho usuzovat, že pinakolylová skupina somanu je již tak objemná, že snižuje afinitu všech reaktivátorů bez ohledu na jejich strukturu. Značně selektivní bylo působení *O*-cyklohexylové skupiny cyklosinu a to jak ve skupině novějších reaktivátorů s vysokou afinitou k enzymu (HLo-7, HI-6, BI-6), tak ve skupině tradičních

reaktivátorů (2-PAM, obidoxim, MMC-4). U reaktivátorů ne-soucích karboxamidovou skupinu došlo ke snížení afinity u HLo-7 o více jak řád. U 2-PAM způsobil cyklosin pokles afinity téměř o dva řády, přestože 2-PAM má z testovaných reaktivátorů nejmenší molekulu. Roli zde zřejmě hraje to, že 2-PAM je mezi testovanými reaktivátory jediný monokvarterní látkou. Zajímavého výsledku bylo dosaženo u MMC-4, který má z použitých reaktivátorů nejmenší afinitu k intaktnímu enzymu. Je-li však enzym fosforylován cyklosinem, vzrůstá afinita tohoto reaktivátoru o více jak dva řády. Přítomnost cyklosinu v aktivním místě enzymu zřejmě zlepšuje vzájemnou kompatibilitu povrchu enzymu se strukturou reaktivátoru.

#### SKALÁRNÍ SPIN-SPINOVÁ INTERAKCE PŘES VODÍKOVÉ VAZBY

**JIŘÍ CZERNEK<sup>a</sup> a MICHAL ČAJAN<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>*Oddělení speciálních a bioanalogických polymerů, Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6, e-mail: czernek@imc.cas.cz,* <sup>b</sup>*Laboratoř struktury a dynamiky biomolekul a Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno*

Koncepce vodíkových vazeb byl donedávna chápána<sup>1</sup> jako elektrostatická interakce mezi donorem protonu XH a akceptorem Y, jež spolu vytvářejí vodíkový můstek XH...Y. Nicméně nejmodernější techniky nukleární magnetické rezonance jsou pro celou řadu systémů schopny určit velikost skalárních spin-spinových štěpících konstant  $J_{XY}$  a  $J_{HY}$  svědčící o kovalentním charakteru vazby. Od úvodního sdělení prezentovaného S. Grzesiekem na XVIII. Mezinárodní konferenci magnetické rezonance biologických systémů v Tokiu v srpnu 1998 byly uvedené interakce předmětem usilovného experimentálního i teoretického studia. V předních chemických časopisech lze nalézt asi třicet prací (včetně přehledů, např. cit.<sup>2</sup>), které se touto problematikou zabývaly. Stanovení a analýza skalárních spin-spinových interakcí totiž nemá pouze koncepční význam spočívající v důkazu kovalentního charakteru vodíkových vazeb. Tím, že měření štěpících konstant  $J_{XY}$  a  $J_{HY}$  umožňuje přímou detekci vodíkových vazeb v jednotlivých reziduiích biomolekul ve vodných roztocích, lze od nich očekávat praktickou pomoc při řešení problémů strukturní biologie<sup>3</sup>. Jako nejdůležitější se jeví možnost určit hodnotu vzdálenosti X-Y (případně úhlu X-H-Y či dalších geometrických charakteristik) pro vybraný fragment makromolekuly v roztoku.

Součástí přednášky je přehled biologicky zajímavých systémů, pro něž byly  $J_{XY}$  a  $J_{HY}$  studovány, a uvedení principu příslušných NMR experimentů. Poté je diskutována problematika intermolekulárních (formálně) třívazebních <sup>31</sup>P-<sup>15</sup>N a dvou-vazebních <sup>31</sup>P-<sup>1</sup>H štěpících konstant v systému N-H...O<sup>-</sup>-P. Tyto skalární spin-spinové interakce byly nedávno popsány<sup>4</sup> u komplexu lidského proteinu Ras p21 s GDP. Jelikož *ab initio* kvantově chemický přístup SOS-DFPT dokáže spolehlivě popsat spin-spinovou interakční síť i v relativně rozměrných systémech, např. v anhydrodeoxythymidinech<sup>5</sup>, použili jsme jej pro výpočet<sup>6</sup> zmíněných  $J_{PN}$  a  $J_{PH}$ . Výpočty byly provedeny pro modely skládající se z vybraného rezidua bíl-

koviny a vhodného esteru kyseliny fosforečné. Shoda SOS-DFPT hodnot pro model s naměřenými daty byla v případě experimentálně nejdůležitějšího fragmentu Ala-18 vynikající. Proto byla teoreticky prozkoumána závislost  $J_{PN}$  a  $J_{PH}$  na vzdálenosti N-O a úhlu P-O-H. Výsledky ukazují na značnou citlivost štěpících konstant vůči změnám obou geometrických parametrů, což v sobě skrývá velký potenciál pro řešení třírozměrné struktury komplexů bílkovin s fosfáty.

*Práce byla podporována grantem AV ČR 14/96K (reg. č. K2055603).*

#### LITERATURA

1. Jeffrey G. A., Saenger W.: *Hydrogen Bonding in Biological Structures*. Springer-Verlag, Berlin 1991.
2. Gemmecker G.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 39, 1224 (2000).
3. Molloy E. T., Pardi A.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 298 (2000).
4. Mishima M., Hatanaka M., Yokohama S., Ikegami T., Wälchli, Ito Y., Shirikawa M.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 5883 (2000).
5. Czernek J., Lang J., Sklenář V.: *J. Phys. Chem. A* 104, 2788 (2000).
6. Czernek J., Čajan M.: *Chem. Phys. Lett.*, zasláno do tisku.

#### MAPOVÁNÍ STRUKTURY

##### 1-FLUOR-1-LITHIOALK-1-ENŮ V ROZTOKU

**JIŘÍ CZERNEK<sup>a</sup>, JAROSLAV KVÍČALA<sup>b</sup>,  
RICHARD HRABAL<sup>c</sup>, STANISLAV BŮHM<sup>b</sup>  
a OLDŘICH PALETA<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Oddělení speciálních a bioanalogických polymerů, Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6, e-mail: czernek@imc.cas.cz, <sup>b</sup>Ústav organické chemie, <sup>c</sup>Laboratoř NMR spektroskopie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Znalost struktury 1-fluor-1-lithioalk-1-enů (FLE) v roztoku, již lze zkoumat metodami <sup>13</sup>C NMR (cit.<sup>1</sup>) a <sup>19</sup>F NMR (cit.<sup>2</sup>) a *ab initio* kvantově chemickými přístupy, je žádoucí pro lepší pochopení jejich reaktivity.

Jsou prezentovány výsledky systematického kvantově

chemického studia charakteristik klastrů 1-fluor-1-lithioethenu, *cis*- a *trans*-1,2-difluor-1-lithioethenu a 1,2,2-trifluor-1-lithioethenu se třemi molekulami dimethyletheru (DME). Byly určeny geometrie klastrů kombinací B3LYP/6-31+G\* metody s Onsagerovým modelem na úrovni dipólu<sup>3</sup> a HF/6-31+G\* přístupem, dále MP2(Frozen)/6-31+G\*\* interakční energie FLE s DME a vybrané NMR parametry metodou SOS-DFPT-IGLO. Důraz je kladen na popis vlivu jednotlivých atomů fluoru v molekule FLE na hodnoty <sup>19</sup>F a <sup>13</sup>C chemických posunů. Vypočtené chemické posuny atomů fluoru jsou konfrontovány s našimi experimentálními daty. Pro *trans*-1,2-difluor-1-lithioethen budou diskutovány interakční energie s 1–4 molekulami DME a energetické rozdíly mezi různými konfiguracemi rozpouštědla.

*Práce byla podporována grantem GA ČR č. 203/99/1630 a AV ČR 14/96K (reg. č. K2055603).*

#### LITERATURA

1. Pelter, A., Kvíčala, J.: *Tetrahedron Lett.* 38, 4877 (1997).
2. Pelter, A., Kvíčala, J., Parry, D. E.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1995, 2681.
3. Wong, M. W., Wiberg, K. B., Frisch, M. J.: *J. Chem. Phys.* 95, 8991 (1991).

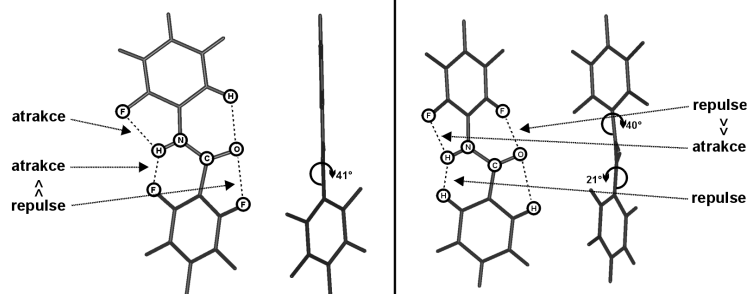
#### STRUKTURA AROMATICKÝCH AMIDŮ A JEJICH KONFORMAČNÍ CHOVÁNÍ

**MICHAL ČAJAN<sup>a,b</sup>, JAROSLAV KOČA<sup>a,b</sup>  
a IVAN STIBOR<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Laboratoř struktury a dynamiky biomolekul, <sup>b</sup>Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: cajan@chemi.muni.cz, <sup>c</sup>Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Amidická funkční skupina často tvoří základ neutrálních ligandů schopných komplexovat aniony. Jednoduché aromatické amidy odvozené od benzanilidu do této skupiny bezsporu patří také<sup>1</sup>.

Experimentální i teoretický popis interakcí v komplexu, prokázal přítomnost vodíkové vazby mezi anionem a amidickým vodíkem<sup>2,3</sup>. Teoretické studie navíc naznačují nezanedbatelný vliv bezprostředního okolí vazebného místa (amidic-



Obr. 1. Intramolekulární ne vazebné interakce v molekulách benzanilidů a jejich konformační důsledky



kého vodíku), tedy substituentů v *ortho* polohách obou aromatických jader. Toto okolí může komplexaci ovlivnit dvojným způsobem. Především se jedná o interakci molekuly s anionem, která může být v závislosti na charakteru těchto substituentů atraktivní nebo repulsivní. Druhým faktorem jsou intramolekulární nezávislé interakce projevující se mezi centrální amidickou skupinou a na ní vázanými aromatickými jádry, resp. substituenty v jejich *ortho* polohách. Tyto nezávislé interakce v molekule samotného amidu způsobují, že konformer odpovídající globálnímu energetickému minimu vždy není, jak by bylo možné předpokládat, planární. Některé z těchto interakcí a jejich konformační důsledky jsou naznačeny na obr. 1. Bylo zjištěno, že komplexační vlastnosti amidu jsou mimo jiné značně závislé právě na míře této neplanarity<sup>4</sup>. Přesný popis intramolekulárních interakcí v molekule ligandu je tedy pro studium struktury a vlastností jeho komplexních sloučenin zcela nezbytný.

V současné době je běžně dostupná celá řada metod molekulového modelování. Ne všechny jsou ovšem schopny zmíněné jevy, např. interakce -H...H-, správně charakterizovat. Prezentovány a porovnány budou možnosti celé škály teoretických metod (molekulová mechanika, semiempirické kvantové chemické metody, DFT, *ab initio* kvantové mechanické metody). Vzájemně kvalitativní srovnání uvedených metod bude doplněno i experimentálními strukturálními studii.

#### LITERATURA

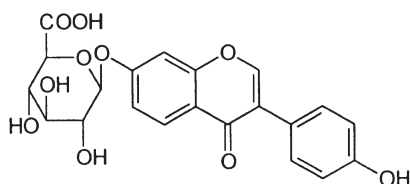
1. Stibor I., Hefeed D. S. M., Lhoták P., Hodačová J., Koča J., Čajan M.: *Gazz. Chim. Ital.* 127, 673 (1997).
2. Beer P. D., Drew M. G. B., Graydon A. R., Smith, D. K., Stokes S. E.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1995, 403.
3. Kavallieratos K., Bertao C. M., Crabtree, R. H.: *J. Org. Chem.* 64, 1675 (1999).
4. Čajan M., Stibor I., Koča J.: *J. Phys. Chem. A* 103, 3778 (1999).

#### SYNTEZA GLYKOSIDŮ DAIDZEINU

**IVAN ČERNÝ<sup>a</sup>, PAVEL DRAŠAR<sup>a</sup>,  
VLADIMÍR POUZAR<sup>a</sup>, OLDŘICH LAPČÍK<sup>b</sup>  
a RICHARD HAMPL<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: cerny@uochb.cas.cz, <sup>b</sup>Endokrinnologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1

Isoflavonoidy představují potravní faktory s mírně estrogenními účinky, přítomné v některých luštěninách, zejména v sóji. Zájem o tyto látky je motivován jejich pozitivním pů-



sobením při některých onkogenních či imunitních procesech, diskutuje se i vliv na kardiovaskulární choroby. Tyto látky se často vyskytují vázané ve formě glykosidů a v této formě se i metabolizují.

Úkolem bylo prověřit dosud publikované postupy přípravy matečných isoflavonoidů a připravit syntetický standard glukuronidu daidzeinu pro testování imunoanalytických systémů. Nejprve byly připraveny vhodně chráněné deriváty daidzeinu. Byly zkoušeny skupiny esterového typu a silylované deriváty. Vlastní glykosylace byla pak nejprve testována na přípravě D-glukosidu<sup>1</sup> a získané poznatky byly využity při přípravě cílového D-glukuronidu.

*Podporováno grantem GA ČR 203/99/1456.*

#### LITERATURA

1. Lewis P., Kaltia S., Wähälä K.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1998, 2481.

#### STEROIDNÍ OLIGOMERY ŘETĚZENÉ AMIDICKOU VAZBOU

**IVAN ČERNÝ, MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ,  
PAVEL DRAŠAR a VLADIMÍR POUZAR**

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: cerny@uochb.cas.cz

Spojování steroidních jednotek do větších molekulových struktur představuje cestu k agregátům svou velikostí srovnatelným s buněčnou membránou, a tedy použitelným např. k výstavbě modelů iontových kanálů. Syntéza těchto látek je do značné míry ovlivněna jejich vlastnostmi, zejména rozpustností a ta je závislá na způsobu vazby mezi jednotlivými jednotkami steroidů. Cílem modelové studie bylo vypracovat metodu schopnou připravit molekulu složenou až ze čtyř steroidních jednotek spojených lineárně v polohách 3 a 17 amidickou vazbou.

Jako základ byla použita etienová kyselina (3β-hydroxyandrost-5-en-17-karboxylová kyselina), která po převedení na methyl ester a několikastupňovou transformací<sup>1</sup> poskytla analog s azidoskupinou v poloze 3. Aktivace karboxyskupiny jako aktivní ester s *N*-hydroxysukcinimidem pak poskytla základní stavební jednotku, která byla opakovaně kondenzována s aminokomponentou vzniklou redukcí azidoskupiny tetrahydridoboritanem sodným v přítomnosti Ni solí. Jako poslední byl připojen vždy aktivní ester ethienové kyseliny. Tím byly připraveny modelové di, tri a tetrasteroidy, jejichž vlastnosti budou dále studovány.

*Podporováno grantem 4/91 UOCHB a COST OC D12.20.*

#### LITERATURA

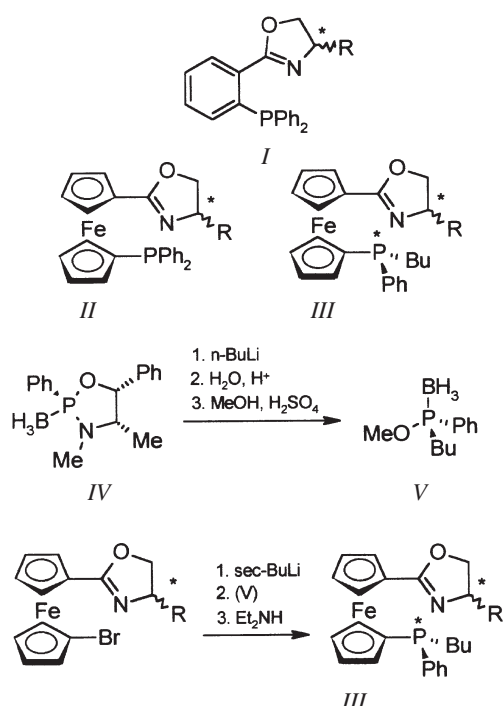
1. Freiberg L. A., Cole W.: US 3,246,018 (Cl. 260-397.1), April 12, 1966; *Chem. Abstr.* 64, 19725 (1966).

**PŘÍPRAVA DIASTEROMERNĚ ČISTÝCH  
1-BUTYLFENYLFOSFINO-1'-  
-OXAZOLINYLFERROCENŮ**

**DUŠAN DRAHOŇOVSKÝ<sup>a</sup>, PETR ŠTĚPNIČKA<sup>b</sup>  
a DALIMIL DVOŘÁK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup>Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2

V řadě úspěšných chirálních ligandů (*I*)<sup>1</sup> a (*II*)<sup>2</sup> použitelných pro palladiem katalyzovanou asymetrickou allylovou substituční reakcí byla syntetizována struktura (*III*)<sup>3</sup> nesoucí dvě stereogenní centra. Problém se získáním diastereomerně čistých ligandů (*III*) byl úspěšně vyřešen syntézou přes chirální oxazafosfolidin (*IV*) a fosfinit (*V*).



**LITERATURA**

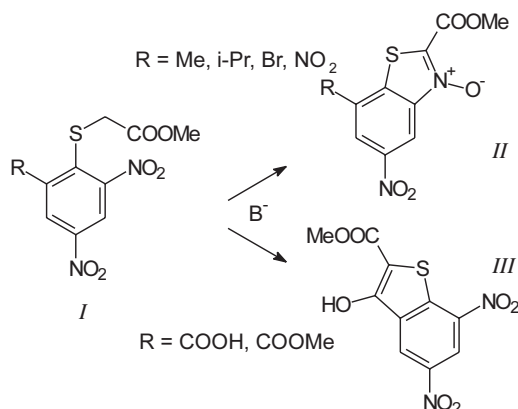
1. Pfaltz A.: Acta Chem. Scand. 50, 189 (1996).
2. (a) Zhang W., Yoneda Y., Kida T., Nakatsujii Y., Ikeda I.: Tetrahedron: Asymmetry 9, 3371 (1998); (b) Park J., Quan Z., Lee S., Ahn K. H., Cho Ch.: J. Organomet. Chem. 584, 140 (1999); (c) Drahoňovský D., Štěpnička P., Dvořák D.: Chem. Listy 92, 945 (1998).
3. Drahoňovský D., Štěpnička P., Dvořák D.: Chem. Listy 93, 754 (1999).

**KINETIKA A MECHANISMUS  
INTRAMOLEKULÁRNÍHO ATAKU KARBANIONTU  
NA SKUPINY -NO<sub>2</sub> A -COOR**

**KATEŘINA DUDOVÁ, MAREK JANÍK  
a PETR ŠIMŮNEK**

Katedra organické chemie, Univerzita Pardubice, n. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, e-mail: katerina.dudova@seznam.cz, p.simunek@email.cz

Byla připravena řada 2,4-dinitro-6-substituovaných chlorbenzenů. Jejich reakcí s methylthioglykolátem za přítomnosti triethylaminu byly získány výchozí látky *I*, které byly dále použity pro studium kinetiky cyklizačních reakcí v bazických methanolicých pufrch na konečné produkty *II*, *III*.



Všechny látky byly identifikovány pomocí <sup>1</sup>H NMR spektrometrie. Kinetická měření byla prováděna pomocí UV VIS spektrofotometrie při 25 °C za podmínek reakce pseudoprvního řádu. Byl sledován vliv substituce na benzenovém jádře a složení methanolicých pufrů na rychlost cyklizačních reakcí. V případě 6-methyl, isopropyl, brom a nitro derivátu byl konečným produktem cyklický *N*-oxid *II*. Pokud substituentem na benzenovém jádře v poloze 6 byla karboxylová či methoxykarboxylová skupina byl z konečné reakční směsi izolován namísto očekávaného cyklického *N*-oxidu produkt *III*, který vznikl atakem karbaniontu na danou karboxylovou (resp. methoxykarboxylovou) skupinu (tj. Dieckmannovou kondenzací).

Práce byla podporována vnitřním grantem Univerzity Pardubice IG 300048.

**LITERATURA**

1. Janík M., Macháček V., Pytela O.: Collect. Czech. Chem. Commun. 62, 1429 (1997).

**KALIX[4]PYRROLY A PORFYRINY SE STEROIDNÍ  
SUBSTITUCÍ V *meso*-POLOHÁCH JAKO NOVÉ  
KOMPLEXAČNÍ ČINIDLO NA CUKRY VE VODĚ  
S FLUORESCENČNÍMI VLASTNOSTMI**

**MYKHAYLO DUKH<sup>a</sup>, VLADIMÍR POUZAR<sup>a</sup>,  
IVAN ČERNÝ<sup>a</sup>, MAREK URBANSKÝ<sup>a</sup>,  
VLADIMÍR M. KRÁL<sup>b</sup> a PAVEL DRAŠAR<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>Vysoká škola chemicko-technologická, 166 28 Praha 6

Byla připravena serie kalix[4]pyrrolů (*meso*-oktaalkylporfyrinogenů) a porfyrinů a zkoumány jejich fyzikálně chemické vlastnosti, které by vedly k možnosti jejich praktického využití jako sensorových elementů. Byla nalezena velmi zajímavá asociační konstanta u porfyrinu substituovaného v *meso*-poloze nechráněnou chloovou kyselinou vůči sacharidům ve vodném prostředí dosahující hodnot až  $10^4$ – $10^5$  M<sup>-1</sup>. Důležité je, že tato komplexační schopnost je doprovázena významnou fluorescenční spektrální charakteristikou, která předurčuje tuto skupinu látek jako fluorescenční receptory.

Práce byla podporována GA ČR, granty č. 203/97/0695, 301/98/K042, grantem ÚOCHB AV ČR č. 04/91 a v rámci projektu COST č. OC D12.20.

**LITERATURA**

1. Sessler J. L., Gale P. A., Genge J. W.: Chem. Eur. J. 4, 1095 (1998).
2. Dukh M., Černý I., Urbanský M., Pouzar V., Král V., Drašar P.: CZ PV3098-99 (31. 08. 1999).
3. Rusin O., Král V.: Chem. Commun. 1999, 2367.
4. Král V., Rusin O., Shishkanova T., Volf R., Matějka P., Volka K.: Chem. Listy 93, 546, (1999).
5. Král V., Sessler J. L., Zimmermann R. S., Seidel D., Lynch V., Andriolletti B.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 39, 1055 (2000).
6. Dukh M., Pouzar V., Černý I., Urbanský M., Král V. M., Drašar P.: Calix[4]pyrroles and porphyrins with steroidal moieties in meso positions; novel fluorescence receptors.

European Colloquium on Heterocyclic Chemistry XIX, Aveiro: A-37, 2000.

7. Drašar P., Dukh M., Urbanský M., Černý I., Pouzar V., Král V. M.: Chem. Listy 93, 747 (1999).

**SYNTEZA PYRROLOVÝCH MAKROCYKLŮ  
S KOMBINOVANÝMI SUBSTITUENTY  
V *meso*-POLOHÁCH, STEROIDNÍCH KALIXFYRINŮ**

**MYKHAYLO DUKH<sup>a</sup>, VLADIMÍR POUZAR<sup>a</sup>,  
VLADIMÍR M. KRÁL<sup>b</sup>, IVAN ČERNÝ<sup>a</sup>  
a PAVEL DRAŠAR<sup>a</sup>**

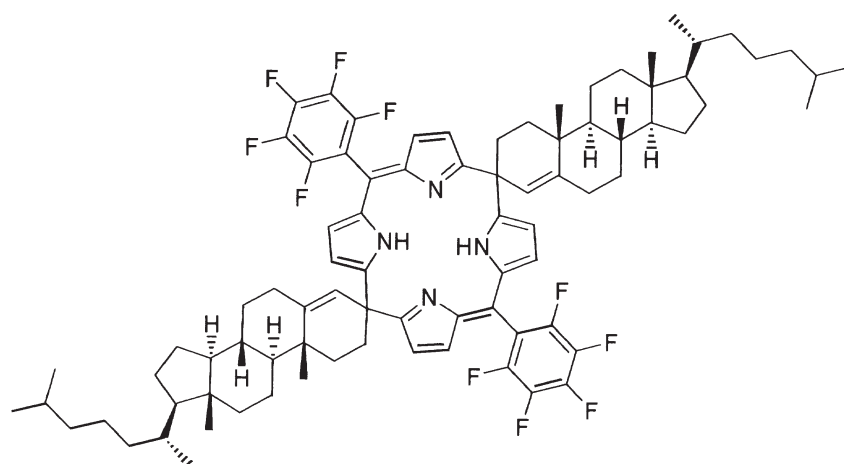
<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup>Vysoká škola chemicko-technologická, 166 28 Praha 6

Nová skupina makrocyclických látek – kalixpyriny; strukturně látek příbuzných porfyrinům a kalixpyrrolům byla popsána v letošním roce<sup>1</sup>. V návaznosti na tyto práce byla vypracována syntéza kalixfyrinů obsahujících různé druhy substituentů v *meso*-polohách makrocyklu. Kyselou katalyzovanou kondenzací cholest-4-en-3-onu s pyrrolem poskytnou 3,3-di(pyrrolyl)-cholest-4-en, který, opět za kyselých katalýz poskytuje s pentafluorobenzaldehydem a následně působením DDQ kalix[4]fyrin substituovaný symetricky „křížem“ ve dvou *meso*-polohách pentafluorofenylovou skupinou a v zbylých dvou je spiro-anelován cholest-4-en. Jde o prvou syntézu spiro-anelovaných cyklických kalixfyrinů.

Podporováno grantem 4/91 UOCHB a COST OC D12.20.

**LITERATURA**

1. Král V., Sessler J. L., Zimmerman R. S., Seidel D., Lynch V., Andriolletti B.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 39, 1055 (2000) a citace tam uvedené.
2. Dukh M., Černý I., Urbanský M., Pouzar V., Král V. M., Drašar P.: Chem. Listy, Symposia 93, s63 (1999).
3. Dukh M., Pouzar V., Černý I., Urbanský M., Král V. M., Drašar P.: Chem. Listy 94, 797 (2000).



4. Dukh M., Pouzar V., Černý I., Urbanský M., Král V. M., Drašar P.: Calix[4]pyrroles and porphyrins with steroidal moieties in meso positions; novel fluorescence receptors. *European Colloquium on Heterocyclic Chemistry XIX*, Aveiro: A-37, 2000.

### STRUKTURA A DYNAMIKA DNA GUANINOVÉHO KVADRUPLEXU GGGGTTTTGGGG ŘEŠENÁ METODAMI MOLEKULOVÉHO MODELOVÁNÍ

EVA FADRŇÁ<sup>a</sup>, NAĎA ŠPAČKOVÁ<sup>b</sup>,  
JÍŘÍ ŠPONER<sup>b</sup> a JAROSLAV KOČA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoř struktury a dynamiky biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: evaf@chemi.muni.cz, jkoca@chemi.muni.cz, <sup>b</sup>Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Královopolská 135, 612 65 Brno, e-mail: spackova@ibp.cz, sponer@ibp.cz

Molekuly deoxyribonukleové kyseliny mohou nabývat různých tvarů, kromě známých kanonických duplexů (A, B, Z) to mohou být například kvadruplexy tvořené sekvencemi bohatými na guanin (G-DNA)<sup>1,2</sup>. Tyto motivy se vyskytují v genomu v oblastech genové regulace a v telomerických sekvencích. Příkladem je struktura, která je tvořena dvěma řetězci DNA uspořádanými tak, že tvoří guaninový kvadruplex (stem), jehož středem prochází kanál, a jeho konce jsou překlenuty dvěma thyminovými smyčkami. Geometrie kvadruplexu byla potvrzena rentgenovou krystalografií<sup>1</sup> a NMR (cit.<sup>2</sup>) a ukázala různé možnosti uspořádání thyminových smyček.

Molekulové modelování pomocí programu AMBER vycházelo z rentgenové struktury<sup>1</sup>. Molekulová dynamika zahrnující PME vyjádření elektrostatických interakcí ukázala stabilitu guaninového stemu, k níž je nezbytná přítomnost Na<sup>+</sup> iontů v kanálu<sup>3</sup>. Konformační chování nejflexibilnější částí molekuly, tedy thyminových smyček, bylo podrobenu studiu pomocí programu CICADA<sup>4,5</sup>.

Metodika CICADA nalezla řadu konformerů, mezi nimi nízkoenergetické konformace thyminových smyček, stabilizované sítí vodíkových vazeb. Stabilita vybraných konformerů byla studována molekulovou dynamikou v explicitním solventu. Analýza MD trajektorií sledovala variabilitu konformačního chování thyminových smyček a jejich vliv na transport iontů do/z kanálu procházejícího kvadruplexem.

Nejnovější vývoj výzkumu kvadruplexů ukazuje důležitost poznání mechanismu transportu iontů, což může přispět k pochopení genové regulace a jejího selhávání.

### LITERATURA

1. Kang C. H., Zhang X., Ratliff R., Moyzis R., Rich A.: *Nature* 356, 126 (1992).
2. Smith F. W., Feigon J.: *Nature* 356, 164 (1992).
3. Špačková N., Berger I., Šponer J.: *J. Am. Chem. Soc.* 121, 5519 (1999).
4. Koča J.: *J. Mol. Struct. (Theochem)* 308, 13 (1994).
5. Fadrná E., Koča J.: *J. Phys. Chem. B* 101, 7863 (1997).

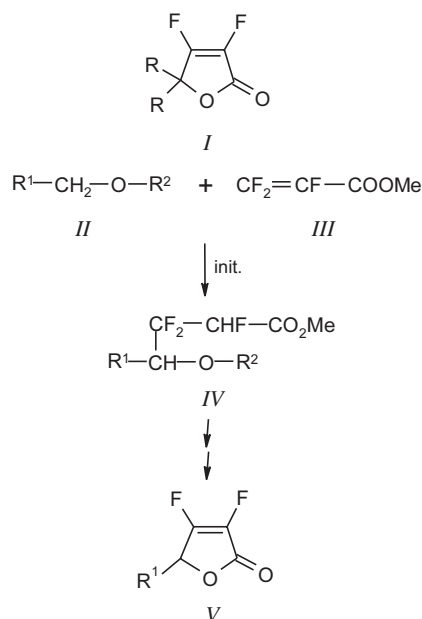
### SYNTEZA 4-ALKYL-2-FLUOR-BUT-2-EN-4-OLIDŮ: NEOBÝKLÁ REGIOSELEKTIVITA RADIKÁLOVÉ ADICE ETHERŮ A PODEZŘENÍ NA 1,3-PŘESUN VODÍKU

JAN HAJDUCH, STANISLAV BÖHM  
a OLDŘICH PALETA

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Fluorované butenolidy mohou sloužit jako syntetické intermediáty<sup>1-3</sup>. U 4,4-dialkyl-2,3-difluor-but-2-en-4-olidů (*I*) jsme našli<sup>2,3</sup> zajímavou reaktivitu ve vztahu k tvrdým a měkkým nukleofilům, zahrnující vinylovou substituci fluoru a nový přesmyk<sup>2</sup>. Tyto reakce byly využity v syntézách analogů přírodních látek<sup>2,3</sup>, jako jsou např. disacharidy, kyselina tetronová a nukleosidy.

S ohledem na butenolidy typu *I* lze očekávat zajímavé chemické i biochemické vlastnosti u cílových butenolidů *V*, které v určité strukturní variaci představují analoga vitamínu C. Jedním ze stupňů syntézy butenolidů *V* je radikálová adice etherů na methyl-trifluorakrylát. Během vývoje syntézy jsme zjistili neobvyklou regioselektivitu této adice vzhledem k etherům, která může být vysvětlena 1,3-přesunem vodíku v primárně generovaném etherovém radikálu. Adukty *IV* byly převedeny ve dvou stupních na cílové butenolidy *V*.



### LITERATURA

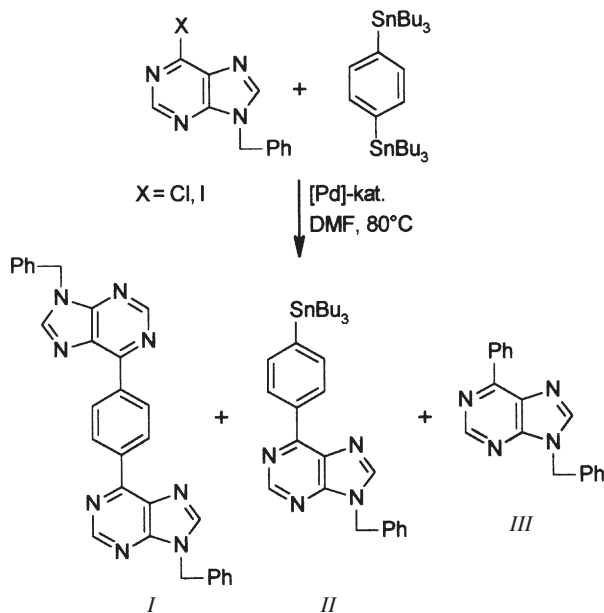
1. Kvíčala J., Vlasáková R., Plocar J., Paleta O., Pelter A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65, 773 (2000).
2. Paleta O., Pelter A., Kebrle J., Duda Z., Hajduch J.: *Tetrahedron* 56, 3197 (2000).
3. Paleta O., Pelter A., Kebrle J.: *Tetrahedron Lett.* 49, 9259 (1994).
4. Paleta O., Duda Z., Holý A.: *Chem. Listy* 91, 667 (1997).

## KAPLING SUBSTITUOVANÝCH 6-HALOGENPURINŮ S 1,4-BIS(TRIBUTYLČÍN)BENZENEM

**MARTINA HAVELKOVÁ a DALIMIL DVOŘÁK\***

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Dvě molekuly purinu spojené v poloze 6 1,4-fenylenovým zbytkem představují analogii Watson-Crick duplexu. Byla vypracována metoda přípravy těchto látek založená na Stilleho kaplingu<sup>1</sup> 1,4-bis(tributylčín)benzenu s 6-halogenpuriny. Přitom, podle reakčních podmínek vznikají v přítomnosti Pd-katalyzátoru kromě požadovaného produktu *I* i sloučeniny *II* a *III* v různém poměru.



Práce byla provedena s podporou grantu 203/00/0036 GA ČR.

### LITERATURA

- Mitchell T. N.: *Synthesis* 1992, 803.

## KONFORMAČNÍ ANALÝZA METHYLTETROFURANOSIDŮ POMOCÍ MOLEKULOVÉ DYNAMIKY

**HELENA HEISSIGEROVÁ a IVAN RAICH**

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: hhelenka@yahoo.com, Ivan.Raich@vscht.cz

Práce se zabývá studiem konformačního chování methyl- $\alpha$ - a  $\beta$ -D-erythro- a -threofuranosidů s využitím molekulární dynamiky na úrovni molekulové mechaniky.

Byly provedeny molekulární dynamické simulace studovaných látek ve vakuu a ve vodném roztoku. Vodný roztok byl

modelován pomocí krychlové periodické buňky vyplněné molekulami TIP3P vody. Simulace o délce 51 ps byly prováděny za konstantní teploty 300 K, objemu a počtu částic (NVT). Sběru dat předcházela zahřev systému z 0 na 300 K a 10 ps ekvilibrace. Simulace byly prováděny s použitím programu HyperChem s implementovaným silovým polem MM+. Z nasbíraných dat byly spočítány všechny zajímavé strukturální parametry, zastoupení jednotlivých konformací a jejich časové návaznosti. Pomocí dvou tvarů Karplusovy rovnice byly spočítány vicinální interakční konstanty, které byly porovnány s experimentálními NMR daty.

Pro porovnání a zhodnocení vlivu různých experimentálních podmínek na výsledky simulace byly provedeny další 50 ps simulace navazující na základní 51 ps simulace. Takto byl testován vliv výchozí struktury a délky simulace. Dále byly porovnány výsledky simulací solvatovaných a nesolvatovaných systémů.

Pro názornější porovnání výsledků simulací s experimentálními daty byly provedeny *ab initio* výpočty NMR a IČ parametrů pro studované látky pomocí programu Gaussian 98W. Dále byly výsledky simulací porovnány s daty získanými metodou systematického mapování konformačního prostoru<sup>1</sup>.

### LITERATURA

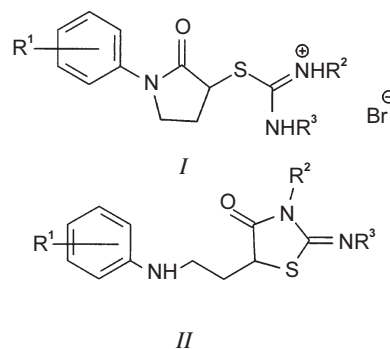
- Ludiková J.: *Diplomová práce*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 1999.

## SYNTEZA A REAKTIVITA SUBSTITUOVANÝCH S-(1-FENYLPYRROLIDIN-2-ON-3-YL)- -ISOTHIURONIOVÝCH SOLÍ

**LUDMILA HEJTMÁNKOVÁ<sup>a</sup>,  
VLADIMÍR MACHÁČEK<sup>b</sup> a MILOŠ SEDLÁK<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>VÚFB a.s., Kouřimská 17, 130 00 Praha, vufb.pce@worldonline.cz, <sup>b</sup>Katedra organické chemie, Univerzita Pardubice, n. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, e-mail: Vladimir.Machacek@upce.cz, Milos.Sedlak@upce.cz

Reakcí substituovaných 3-brom-1-fenylpyrrolidin-2-onů<sup>1</sup> s thioamocovinou, 1-methylthioamocovinou a 1,3-dimethylthioamocovinou byly připraveny odpovídající isothiuroniové soli *I*. Zjistili jsme, že v mírně alkalickém prostředí se uvolňuje báze, jejíž aminoskupina intramolekulárně nukleofilně atakuje amidický karbonyl pyrrolidinového cyklu přičemž dochází



R<sup>1</sup>: H, 4-NO<sub>2</sub>, 4-Cl, 4-OCH<sub>3</sub>, 3-CF<sub>3</sub>      R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>: H, CH<sub>3</sub>

k jeho otevření a vzniku substituovaných iminothiazolidinonů *II*. Látky obsahující iminothiazolidinový cyklus představují farmaceuticky významnou skupinu perorálních antidiabetik<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>H NMR spekter je patrné, že iminothiazolidinon *Iib* ( $R^1$ : 4-NO<sub>2</sub>,  $R^2$ : H,  $R^3$ : CH<sub>3</sub>) se v roztoku dimethylsulfoxidu nachází ve formě dvou tautomerů lišících se exocyklickou dvojnou vazbou C=N, tautomer s exocyklickou dvojnou vazbou pak existuje ve formě dvou geometrických izomerů s rozdílnou konfigurací methylskupiny.

Dále jsme podrobněji studovali kinetiku vzniku iminothiazolidinonů *Iia* ( $R^1$ : 4-NO<sub>2</sub>,  $R^2$ : H,  $R^3$ : H), *Iib*, *Iic* ( $R^1$ : 4-NO<sub>2</sub>,  $R^2$ : CH<sub>3</sub>,  $R^3$ : CH<sub>3</sub>) při teplotě 25 °C v tris(hydroxymethyl)amínomethanových pufrách (pH 7,1; I = 1 mol.l<sup>-1</sup>), kde jsme zjistili, že reakce je specificky bazicky katalyzovaná a hodnoty rychlostních konstant aproximovaných na nulovou koncentraci pufru jsou pro jednotlivé deriváty následující: *Iia*:  $k = (1,60 \pm 0,13) \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , *Iib*:  $k = (1,12 \pm 0,09) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , *Iic*:  $k = (2,21 \pm 0,11) \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Při studiu reaktivity dalších isothiuroniových solí *Iid* ( $R^1$ : 4-OCH<sub>3</sub>,  $R^2$ : H,  $R^3$ : CH<sub>3</sub>) a *Iie* ( $R^1$ : 4-Cl,  $R^2$ : H,  $R^3$ : CH<sub>3</sub>) jsme zjistili, že v tomto případě je vznik substituovaných iminothiazolidinonů *Iid* a *Iie* obecně bazicky katalyzován. Z uvedeného vyplývá, že kinetika i mechanismus vzniku iminothiazolidinonů *II* jsou silně závislé na substituci výchozích isothiuroniových solí *I*.

#### LITERATURA

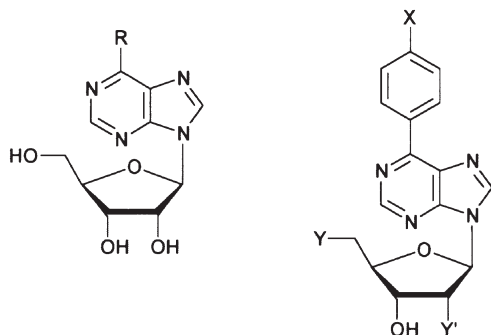
1. Sedlák M.: Chem. Listy 93, 734 (1999).
2. Akarawa K., et al: Chem. Pharm. Bull. 45, 1984 (1997).

### SYNTEZA A CYTOSTATICKÁ AKTIVITA 6-ARYL- A 6-BENZYLPUŘINOVÝCH NUKLEOSIDŮ

MICHAL HOCEK<sup>a\*</sup>, ANTONÍN HOLÝ<sup>a</sup>,  
IVAN VOTRUBA<sup>a</sup> a HANA DVORÁKOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, 166 10 Praha 6, e-mail: hocek@uochb.cas.cz, <sup>b</sup>Laboratoř NMR spektroskopie, Vysoká škola chemicko-technologická, 166 28 Praha 6

Nedávno byla v naší laboratoři objevena nová skupina cytostatických látek – substituované 6-fenylpurinové ribonukleosidy<sup>1</sup>. Strukturálně-aktivitní studie ukázaly, že z této skupiny látek pouze 6-(4-substituované fenyl)purinové ribonukleosidy vykazují významnou cytostatickou aktivitu *in vitro* proti některým buněčným kulturám leukemií a nádorů (IC<sub>50</sub> = 0,45–



R = aryl, hetaryl, benzyl; X = H, F, OCH<sub>3</sub>; Y = OH, H; Y' = H, OH

10 μmol.l<sup>-1</sup>), zatímco 6-fenylpurinové báze i 2-amino-6-fenylpurinové nukleosidy jsou neaktivní. V tomto příspěvku bude prezentováno rozšíření této studie na další 6-aryl(substituované fenyl-, naftyl- a hetarylderiváty) a substituované 6-benzylpurinové ribonukleosidy a rovněž studie vlivu modifikace na cukerné části (příprava 2'- a 5'-deoxyribonukleosidů a acyklonukleosidů). Syntézy spočívaly v přípravě vhodných chráněných nukleosidů odvozených od 6-chlorpurinu následované „cross-coupling“ reakcemi s arylboronovými kyselinami<sup>2</sup> nebo organozinečnatými reagenty<sup>3</sup>. Cytostatická aktivita uvedených látek bude také předmětem diskuse.

Tato práce byla podporována GA ČR, grant 203/00/0036.

#### LITERATURA

1. Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: J. Med. Chem. 43, 1817 (2000).
2. Havelková M., Hocek M., Česnek M., Dvořák D.: Synlett 1999, 1145.
3. Hocek M., Masojídková M., Holý A.: Collect. Czech. Chem. Commun. 62, 136 (1997).

### ANTIMYKOBAKTERIÁLNĚ ÚČINNÉ DERIVÁTY 3-ARYL-2H-1,3-BENZOXAZIN-2(3H)-2,4-DIONŮ

KAREL WAISSER<sup>a</sup>, PAVEL HOLÝ<sup>a</sup>, JIŘÍ GREGOR  
a JARMILA KAUSTOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, waisser@faf.cuni.cz, holy@faf.cuni.cz, <sup>b</sup>Krajská hygienická stanice, Partyzánské n. 7, 728 92 Ostrava

Deriváty 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-2,4-dionů jsou antimykobakteriálně aktivní sloučeniny. Aktivita vzrůstá s růstem lipofilitu a elektronakceptorních vlastností substituentů na fenylu v poloze 3. Cílem této práce bylo získané rovnice z předchozí studie<sup>1</sup> doplněním skupiny o další látky zpětně ověřit a výsledky použít k upřesnění parametrů *a*, *b* a *c* v regresní rovnici  $\log(1/\text{MIC}_{\text{Mycobacterium}}) = a \cdot \sigma + b \cdot \pi + c$ . Pro tento účel byly připraveny látky ze skupiny salicylanilidů a 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-2,4-dionů<sup>1</sup>.

Antimykobakteriální aktivita (MIC) *in vitro* byla stanovena vůči kmenům *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80, *M. avium* CNCTC My 330/88 a klinicky izolovanému kmeni *M. kansasii* 6509/96 na KHS v Ostravě. Regresní rovnice QSAR byly vypočteny multi-regresním programem vytvořeným v Microsoft Excel prof. p. Klemmerou. Hodnoty Hammetových konstant  $\sigma$  a hydrofóbních substituentových konstant  $\pi$  byly převzaty z literatury<sup>2,3</sup>.

Práce byla podporována grantem GA UK 234/2000/BCH/FaF a FRVŠ 1304/G/2000 a výzkumným záměrem VZ MSM 111 6 0000 1.

#### LITERATURA

1. Waisser K., et al.: Collect. Czech Chem. Commun. 64, 1902 (1999).
2. Kuchař M., Rejcholec V.: Využití kvantitativních vztahů

mezi strukturou a biologickou aktivitou, str. 51, 85. Academia, Praha 1987.

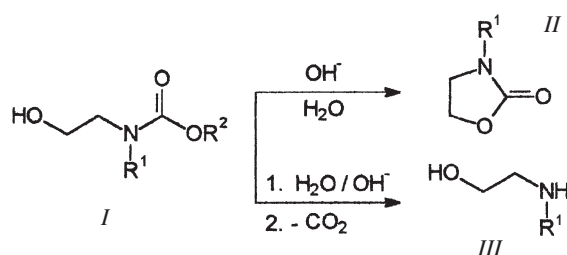
- Hansch C., Leo A., Hoekman D.: *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. ACS, Washington D.C. 1995.

### VLIV N-SUBSTITUCE NA PRŮBĚH SOLVOLÝZY N-(2-HYDROXY ETHYL) KARBAMÁTŮ

**OLDŘICH HRABÍK, JAROMÍR MINDL,  
JAROMÍR KAVÁLEK a VOJESLAV ŠTĚRBA**

*Katedra organické chemie, Univerzita Pardubice, n. Čs. legií 565, Pardubice 532 10, e-mail: oldrich.hrabik@upce.cz*

N-Hydroxyalkylkarbamáty jsou biologicky aktivní látky, které nacházejí využití jako pesticidy. Substituované alkyl-, nebo aryl-N-(2-hydroxyethyl)karbamáty (I) cyklizují na substituované 2-oxazolidony (II), nebo podléhají hydrolyze a následné dekarboxylaci na N-alkyl-, nebo N-arylethanolaminy (III),



kde R<sup>1</sup> = H, CH<sub>3</sub>, Ph a R<sup>2</sup> = alkyl, nebo aryl.

Reakce pro případ R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>, Ph probíhá v alkalickém vodním prostředí tzv. „concerted“ mechanismem, a to bez ohledu na odstupující R<sup>2</sup>.

Pro případ, kdy R<sup>1</sup> = H dochází u arylesterů i alkylerů k hydrolyze mechanismem E1cB přes N-(2-hydroxyethyl)isokyanát, který následně hydrolyzuje na alkalický N-(2-hydroxyethyl)karbamát, nebo cyklizuje na N-substituovaný 2-oxazolidon.

#### LITERATURA

- Sugimoto H., Yonaga M., Karibe N., Limura Y., Nagato S.: EP 468187 (Cl C07-D265/18), 1990; Chem. Abstr. 116, P 23643 (1992).

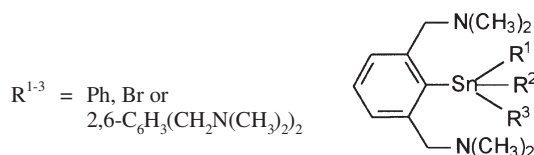
### NEW AND SURPRISING STRUCTURES OF SOME ORGANOTIN(IV) COMPOUNDS

**ROMAN JAMBOR<sup>a</sup>, ALEŠ RŮŽIČKA<sup>a</sup>,  
IVANA ČÍSAŘOVÁ<sup>b</sup>, and JAROSLAV HOLEČEK<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Department of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 95, 532 09 Pardubice, Czech Republic, e-mail: jamborini@atlas.cz <sup>b</sup>Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University of Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

In our lab, it was studied, within the investigation of biological and catalytic properties of organotin(IV) compounds,

the ability of this type of compounds to increase their coordination number from usually four to five or six due to formation of one or more donor-acceptor connection(s) between the central tin atom and the donor atom(s) presented at the other part of molecule. The formation of this type of intramolecular bond is accompanied with the changes of different NMR spectra parameters in different types of solvents ( $\delta(15\text{N})$ ,  $\delta(119\text{Sn})$ ,  $J(119\text{Sn}, 15\text{N})$ ) (Ref.<sup>1</sup>) and in the solid state ( $\delta(119\text{Sn})$ ) (Ref.<sup>2</sup>). All these parameters can be taken as direct or non-direct proofs of donor-acceptor bond and its strength. The most reliable verification of this connection is the X-ray diffraction on single crystal, which can give us the realistic scan of molecule. We have prepared and characterized a lot of compounds with potential donor-acceptor N-Sn intramolecular connection(s) with 4 different ligands (C,N-chelating), but only three of them are structurally other than we expected. These different compounds are derivatives of one of so called „pincer“ ligands (2,6-bis(dimethylaminomethyl)benzene).



R<sup>1-3</sup> = Ph, Br or  
2,6-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

The research was supported by Grant Agency of Czech Republic (grant no. 203/00/0920) and the Ministry of Education of Czech Republic under the project LN 00A28.

#### REFERENCES

- Růžička A., Pejchal V., Holeček J., Lyčka A., Jacob K.: Collect. Czech. Chem. Commun. 63, 977(1998).
- Růžička A., Jambor R., Brus J., Holeček J., Čísařová I.: to be published.

### CHROMOLITH<sup>TM</sup> – ZAČÁTEK NÁSTUPU MONOLITICKÝCH KOLON

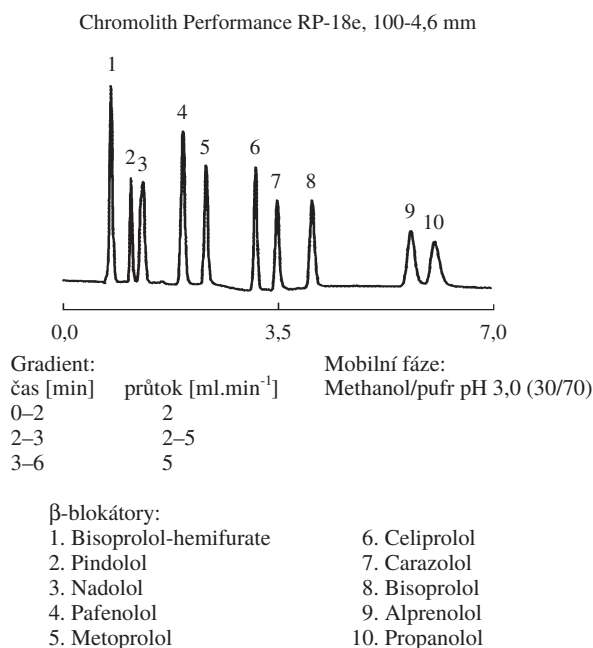
**MILAN KALINA**

*Merck spol. s r.o., 251 01 Jazlovce-Říčany, kalina@merck.cz*

V současné době jsou patrné snahy výrobců o zvládnutí tzv. monolitické technologie výroby kolon. Z důvodu podílu na trhu se tyto snahy koncentrují zejména v oblasti kolon na bázi silikagelu. Kolona Chromolith<sup>TM</sup> je sériově vyráběnou kolonou tohoto druhu vůbec.

Chromolith<sup>TM</sup> je kolona vyrobená tzv. monolitickou technologií, tzn. že stacionární fáze se neskládá z individuálních částic, nýbrž že je to „tyčka“, mající určitou porézní strukturu a z ní vyplývající výhodné fyzikálně chemické vlastnosti. Takováto „monolitická“ kolona, na rozdíl od „částicových“, nebo „sypaných“ kolon, vyniká mechanickou stabilitou a výbornou průchodností pro mobilní fázi. Díky zcela unikátní porézní struktuře umožňuje použití několikanásobně vyšších průtoků ve srovnání s klasickými kolonami. Výsledný zpětný tlak se přesto pohybuje v akceptovatelných mezích 80–120 bar.

Chemické vlastnosti jsou totožné se sorbentem Purospher



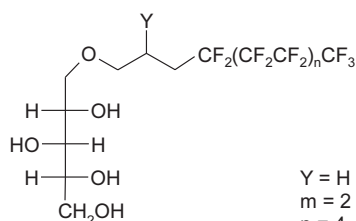
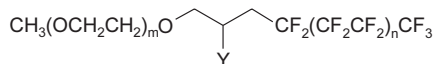
RP-18e. Prenositelnost metod je tedy optimální, ve většině případů je třeba jen mírně korigovat retenční časy. Vlastnosti nové stacionární fáze mají zajímavý důsledek: koncentrační gradient, výrazně zpomalující sériové analýzy, lze do jisté míry nahradit průtokovým gradientem, neovlivňujícím čas sériové analýzy rekondicionací kolony.

### SYNTEZY NOVÝCH PERFLUORALKYLOVANÝCH AMFIFILNÍCH LÁTEK S POLYETHEROVOU HYDROFILNÍ ČÁSTÍ A STUDIUM JEJICH HEMOKOMPATIBILITY

**ROBERT KAPLÁNEK<sup>a</sup>, MILAN KODÍČEK<sup>b</sup>, KATEŘINA DAŇKOVÁ<sup>b</sup>, IVANA FERENČÍKOVÁ<sup>b</sup>, KAREL KEFURT<sup>c</sup> a OLDŘICH PALETA<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, <sup>b</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, <sup>c</sup>Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Perfluoralkylované amfifilní látky vykazují jedinečné vlastnosti jako tenzidy v oblasti přípravy několikafázových a několikaskložkových koloidních systémů obsahujících emul-



ze perfluorovaných uhlovodíků pro přenašeče kyslíku (umělou krev), gely propustné pro kyslík, nosiče léčiv apod.<sup>1</sup>

S ohledem na výše uvedené aplikace jsme syntetizovali nový typ amfifilních látek, a to derivátů monometylovaných polyetherů, určených pro studium vlastností zahrnující testy hemokompatibility. Látky jsme připravili reakcemi monoetherů s perfluoralkylovanými epoxidy<sup>2</sup> a radikálovými adicemi perfluoralkyljodidů na allylethery<sup>1</sup>. Vysoká hemokompatibilita nových polyetherových sloučenin je porovnána s derivátem xylitolu jako standardem.

Práce byla podporována grantem č. 203/98/1174 GA ČR.

### LITERATURA

- Riess J. G., Greiner J., v knize: *Carbohydrates as Organic Raw Materials II* (Descotes G., ed.), str. 209. Weinheim, New York 1993 – a reference tamtéž uvedená; Krafft M. P., Riess J. G., *Biochemie* 80, 489 (1998).
- Círka V., Paleta O., Améduri B., Boutevin B.: *J. Fluor. Chem.* 84, 53 (1997) a reference tamtéž uvedená.

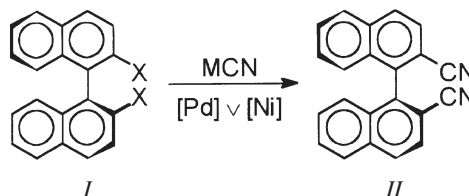
### STEREOKONZERVATIVNÁ KYANÁCIA 1,1'-BINAFTYLOVÝCH 2,2'-DIELEKTROFILOV AKO ALTERNATÍVNA METÓDA PRÍPRAVY HOMOCHIRÁLNEHO 1,1'-BINAFTYL-2,2'-DIKARBONITRILU A NÁSLEDNÉ TRANSFORMÁCIE KYANO SKUPINY

**PETER KASÁK a MARTIN PUTALA\***

*Katedra organickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: kasak@pobox.sk, putala@fns.uniba.sk*

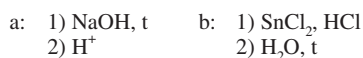
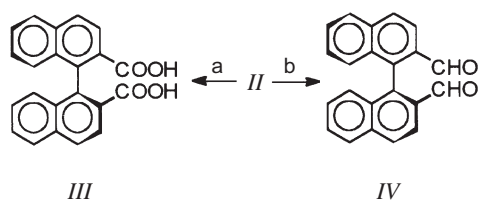
Kyanodehalogenácia (kvanácia) arylhalogenidov a aryltriflátov katalyzovaná komplexami prechodných kovov (Pd, Ni)<sup>1</sup> je efektívnou, synteticky významnou reakciou. 1,1'-Binaftylové 2,2'-dielektrofilily predstavujú elektrónovo čiasťočne obohatený, stéricky výrazne tienený substrát (zvlášť objemný substituent v *orto*-polohe). Navyše substitúcia v polohách 2,2' neracemických C<sub>2</sub>-symterických 1,1'-binaftylových derivátov je osobitne zaujímavá s ohľadom na zachovanie stereogénnej informácie v priebehu reakcie<sup>2</sup>.

Zo študovaných 1,1'-binaftylových 2,2'-dielektrofilov *I* (cit.<sup>3</sup>) boli najlepšie výsledky pozorované pri kvanácii diiodidu *Ib*. Optimalizáciou podmienok nájdená kombinácia kvanáčného činidla, katalyzátora a rozpúšťadla [Zn(CN)<sub>2</sub>, Pd(dppf)<sub>2</sub>, DMF] bola rozhodujúca ako pre výťažok (94 %), tak aj pre



a: X = N<sub>2</sub><sup>+</sup>, b: X = I, c: X = Br, d: X = OTf





zachovanie stereogénnej informácie (92 % e.e.) získaného 1,1'-binaftyl-2,2'-dikarbonitrilu *II*. Podrobnejšie budú diskutované podmienky a výsledky jednotlivých pokusov.

Dinitril *II* bol následne úspešne premenený<sup>3</sup> na príslušnú dikarboxylovú kyselinu *III* a dialdehyd *IV* vo vysokých výťažkoch (84–87 %).

Práca bola podporovaná grantami I/7013/20 VEGA SR a UK/80/2000.

#### LITERATÚRA

1. Brandsma L., Vasilievsky S. F., Verkruijsse H. D.: *Application of Transition Metal Catalysts in Organic Synthesis*, str. 149. 1998.
2. Putala M.: *Enantiomer* 4, 243 (1999).
3. Kasák P., Putala M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65, 729 (2000).

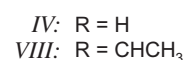
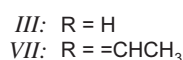
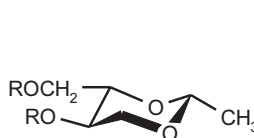
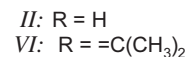
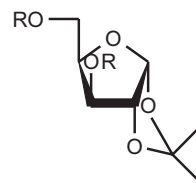
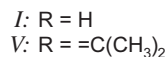
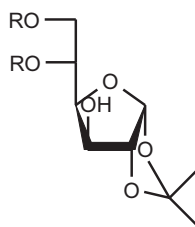
#### REDISTRIBUCE CHRÁNICÍCH ACETALOVÝCH SKUPIN PŘI REAKCÍCH KATALYZOVANÝCH LEWISOVÝMI KYSELINAMI U SACHARIDOVÝCH ACETALŮ

KAREL KEFURT<sup>a</sup>, ŠÁRKA BAMBASOVÁ<sup>a</sup>,  
LUKÁŠ ŠNÁBL<sup>a</sup>, BARBORA VYMĚTALÍKOVÁ<sup>a</sup>  
KATEŘINA BUCHALOVÁ<sup>a</sup> a OLDŘICH PALETA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav chemie přírodních látek, e-mail: karel.kefurt@vscht.cz, <sup>b</sup>Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 1905, 166 28 Praha 6, e-mail: oldrich.paleta@vscht.cz

Při reakcích sacharidů parciálně chráněných acetalovými skupinami byla v přítomnosti katalyzátorů typu BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O a Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> pozorována zajímavá „vedlejší“ aktivita vedoucí k produktům jednak zcela zbavených acetalových skupin, jednak zcela „doacetalovaných“ až k maximálnímu počtu chránicích skupin v molekule.

Tento jev jsme konstatovali také při zahřívání samotných roztoků 1,2-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-glukofuranosy (*I*), 1,2-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-xylofuranosy (*II*), 2,4-*O*-ethyliden-D-erythritolu (*III*) a 1,3-*O*-ethyliden-D-threitolu (*IV*) k mírnému refluxu rozpouštědel (diisopropylether, tetrahydrofuran, 1,2-dimethoxyethan) po dobu několika hodin za přítomnosti 5–9 mol.% výše uvedených katalyzátorů. Vedle výchozích nezměněných derivátů *I–IV* byly z reakčních směsí izolovány 1,2-



5,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-glukofuranosa (*V*), 1,2,3,5-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-xylofuranosa (*VI*), 1,3,2,4-di-*O*-ethyliden-erythritol (*VII*) a 1,3,2,4-di-*O*-ethyliden-D-threitol (*VIII*) ve výťažcích 7–37 %, a odpovídající volné sacharidy, D-glukosa, D-xyloza, erythritol a D-threitol. V současné době je tato reakce hlouběji studována s cílem zjistit možný mechanismus a důvod vzniku takovéto rovnováhy.

Tato práce souvisí s výzkumem podporovaným grantem GA ČR č. 203/98/1174.

#### 2D-SPE S POUŽITÍM AUTOMATU ASPEC XL V OFF-LINE SPOJENÍ S LC-ESI-MS PRO STUDIUM FLAVONOIDNÍCH GLYKOSIDŮ V ROSTLINNÉM MATERIÁLU

BOŘIVOJ KLEJDUŠ, VLASTIMIL KUBÁŇ  
a DAGMAR VITAMVÁSOVÁ

Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno, e-mail: klejdusb@seznam.cz

V poslední době se stále více využívá kombinace separačních a obohacovacích technik, které zajišťují předkonzentraci sledovaných analytů a případně i odstranění nežádoucích komponent z analyzovaného materiálu. Pevné místo v této oblasti zaujímá extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction – SPE). Klasické sorbenty jako je modifikovaný silikagel C18 nebo C8 mají řadu omezujících faktorů. Řadu těchto limitujících faktorů eliminují hydrofilně-lipofilní kopolymery na bázi *N*-vinylpyrrolidinu a divinylbenzenu. Strategie 2D-SPE metody spočívá v adjustaci vzorku a především v promývacích krocích, kde vhodnou úpravou pH hodnot podle typu analytu

(kyselé, bazické, neutrální) a optimalizaci koncentrace organického rozpouštědla dosáhneme maximální selektivity separace sledovaného analytu.

Spojení LC-ESI-MS patří v současnosti k nejpoužívanějším on-line systémům pro detekci sekundárních metabolitů. Cílem této práce bylo navrhnout kombinovanou metodu pro identifikaci flavonoidních glykosidů. 2D-SPE byla provedena na automatickém systému Gilson ASPEX XL a následná identifikace byla provedena v off-line spojením se systémem LC-ESI-MS. Flavonoidní glykosidy byly identifikovány na základě hmotnostních spekter a UV spekter a jejich následně konverzi na známé flavonoidní glykosidy a jejich aglykony.

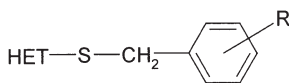
Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR, č. VS-97014.

## SYNTEZA A ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA DERIVÁTŮ BENZAZOLŮ

JAN KOČÍ<sup>a</sup>, VĚRA KLIMEŠOVÁ<sup>a</sup>  
a JARMILA KAUSTOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, koci@faf.cuni.cz, <sup>b</sup>Národní referenční laboratoř pro *Mycobacterium kansasii*, Krajská hygienická stanice, Partyzánské n. 7, 728 92 Ostrava

Výzkum předpokládáných biologicky aktivních látek vedlo k poznatku, že alkylsulfanyl deriváty heterocyklických sloučenin vykazují výraznou antimykobakteriální aktivitu<sup>1,2</sup>. Z tohoto důvodu byla syntetizována řada alkylsulfanyl derivátů benzimidazolu se substitucí v benzylové části molekuly. Připravené látky byly testovány na různé kmeny mykobakterií. Výsledky QSAR studie této řady vedly k závěru, že účinek je ovlivněn elektron akceptorovými substituenty na benzylové části molekuly, a proto byly připraveny deriváty obsahující trifluormethyl skupiny, které zpravidla výrazně modifikují chemické vlastnosti a bioaktivitu organických sloučenin (lipofilita, Hammetova konstanta). Další obměna molekuly se týká heterocyklické části. Jedná se o izosterní náhradu -NH- skupiny za -S-. Rozložení elektronové hustoty a lokace HOMO orbitalů derivátů benzimidazolu a benzothiazolu budou diskutovány vzhledem k biologickému účinku obou skupin látek.



HET = benzimidazol, benzothiazol

R = H, 4-Cl, 3-Cl, 2-Cl, 4-F, 3-F, 2-F, 4-Br, 3-Br, 4-CH<sub>3</sub>, 3-CH<sub>3</sub>, 4-OCH<sub>3</sub>, 3-OCH<sub>3</sub>, 4-NO<sub>2</sub>, 3-NO<sub>2</sub>, 2-F-6-Cl, 3,4-Cl<sub>2</sub>, 3,4-F<sub>2</sub>, 3,5-(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 2,4-(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 2-F-6-NO<sub>2</sub>, 4-CF<sub>3</sub>, 3-CF<sub>3</sub>, 3,5-(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4-CN, 3-CN, 4-CSNH<sub>2</sub>, 3-CSNH<sub>2</sub>

Práce vznikla za podpory grantové agentury Univerzity Karlovy grant č. 21/1999/B/CH, GA ČR 203/99/0030, výzkumného záměru MSM 111 60000 I.

## LITERATURA

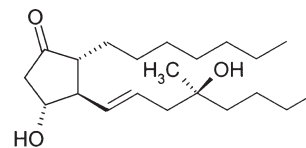
1. Waisser K., Klimešová V., Odlerová Ž.: Folia Pharm. Univ. Carol. 18, 31 (1995).
2. Klimešová V., Svoboda M., Waisser K., Pour M., Kausťová J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 64, 417 (1999).

## PŘÍPRAVA (3S)-1-JOD-3-METHYLHEPTAN-3-OLU

VÁCLAV KOZMÍK, KATEŘINA DUDOVÁ  
a JIŘÍ SVOBODA

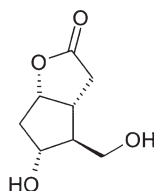
Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: Vaclav.Kozmik@vscht.cz

V rámci systematického výzkumu v oblasti chemie prostanoidů byl v naší laboratoři vypracován v nedávné době inovovaný způsob<sup>1</sup> syntézy racemického Misoprostolu. V současné době, v souladu s doporučeními světové zdravotnické organizace WHO o léčivech, bylo naším cílem připravit opticky čistý jediný účinný enantiomer Misoprostolu I, a to (8R,11R,12R,16S)-15-deoxy-16-hydroxy-16-methylprostaglandin E<sub>1</sub>.

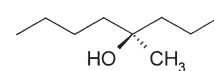


Misoprostol I

Klíčovými meziproducty pro syntézu žádaného Misoprostolu I jsou pak komerčně dostupný opticky aktivní Coreyho alkohol II a (3S)-1-jod-3-methyl-heptan-3-ol III. Cílem této práce bylo vypracovat efektivní postup přípravy opticky aktivního (3S)-1-jod-3-methyl-heptan-3-olu III.



(-) Coreyho alkohol II



(3S)-1-jod-3-methylheptan-3-ol III

## LITERATURA

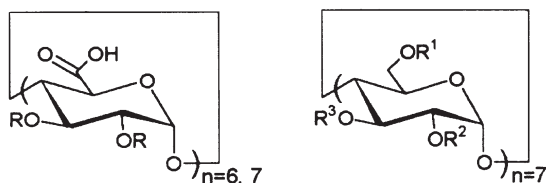
1. Terínek M., Kozmík V., Paleček J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 62, 1325 (1997).

## PŘÍPRAVA MODIFIKOVANÝCH CYKLODEXTRINŮ S PŘIPOJENÝMI KARBOXYLOVÝMI SKUPINAMI

TOMÁŠ KRAUS, MILOŠ BUDĚŠÍNSKÝ  
a JIŘÍ ZÁVADA\*

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6

Cyklohextriny přitahují pozornost svými schopnostmi komplexovat jiné molekuly uvnitř chirálních kavit. Jejich chemickou modifikací lze tyto vlastnosti zásadně ovlivňovat, např. selektivitu komplexace nebo rozpustnost vzniklých aduktů. Řada modifikovaných cyklohextrinů našla uplatnění nejen v laboratořích (fáze pro plynnou nebo kapalinovou chromatografii), ale i v průmyslu.



I: R = Me  
II: R = Ac  
III: R = H  
IV: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>COOH  
V: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>COOH; R<sup>3</sup> = alkyl  
VI: R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = CH<sub>2</sub>COOH; R<sup>1</sup> = alkyl

Vypracovali jsme metodiku pro přípravu selektivně permodifikovaných cyklohextrinů nesoucích karboxylové funkce. Oxidace primárních hydroxylových skupin  $\alpha$ - a  $\beta$ -cyklohextrinů, chráněných v polohách O(2) a O(3), 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylem (TEMPO) poskytla příslušné karboxylové kyseliny strukturálních typů I, II a po odstranění chránících skupin (Ac) také typu III.

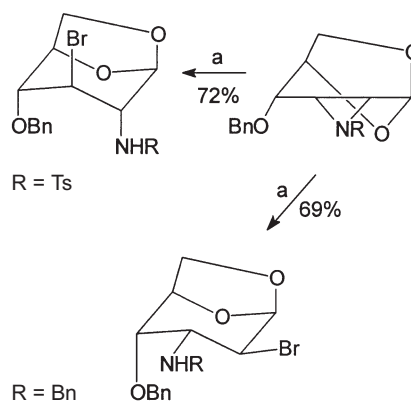
Karboxymethylací byly vneseny karboxylové funkce na primární i sekundární rim kavity. Nejprve byly vybrané polohy selektivně etherifikovány allylovými skupinami, které byly následně oxidačními reakcemi transformovány na karboxymethylové funkce. Tímto postupem byly připraveny látky strukturálních typů IV, V, VI.

### REAKCE EPIMINODERIVÁTŮ 1,6-ANHYDRO- $\beta$ -D-HEXOPYRANOS S NUKLEOFILNÍMI ČINIDLY

JIŘÍ KROUTIL, TOMÁŠ TRNKA  
a MILOSLAV ČERNÝ

Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 6, 128 43 Praha 2, e-mail: kroutil@natur.cuni.cz

Epiminoderiváty 1,6-anhydro- $\beta$ -D-hexopyranos představují vhodné modelové sloučeniny pro studium reaktivity aziridinového kruhu především z důvodu vysoké konformační rigidity 6,8-dioxabicyklo[3.2.1]oktanového skeletu<sup>1</sup>. Byla připravena<sup>2,3</sup> série 4 *N*-benzyl a 4 *N*-*p*-toluensulfonylepiminoderivátů 1,6-



a: (n-Bu)<sub>4</sub>NBr + NH<sub>4</sub>Br / toluen, var

-anhydro- $\beta$ -D-hexopyranos konfigurace *D*-*allo*, *D*-*galakto* a *D*-*manno* a byla studována<sup>4</sup> regioselektivita otevření aziridinového kruhu při jejich reakcích s nukleofilními činidly (chloridový, bromidový, jodidový a azidový anion, benzylamin, benzylalkohol a  $\omega$ -toluenthiole). Regioselektivita otevření aziridinového kruhu, tj. vznik produktu *trans*-diaxiálního nebo *trans*-diekvatoriálního otevření aziridinového kruhu závisela na poloze a orientaci aziridinového kruhu vůči 6,8-dioxabicyklo[3.2.1]oktanovému skeletu, typu *N*-substituentu a použitým nukleofilu.

*N*-*p*-Toluensulfonylepiminoderiváty byly otevírány *trans*-diaxiálně podle Fürstova-Plattnerova pravidla bez ohledu na druh nukleofilu a konfiguraci epiminu. *N*-Benzyl-epiminoderiváty poskytly produkt *trans*-diaxiálního otevření aziridinového kruhu při svých reakcích s azidem zatímco při reakcích s bromidem a jodidem naopak vznikaly produkty *trans*-diekvatoriálního otevření. Tento rozdíl v regioselektivě byl vysvětlen a byl navržen mechanismus tvorby produktů *trans*-diekvatoriálního otevření aziridinového kruhu. Reakce *N*-benzylepiminů s benzylaminem, benzylalkoholem a  $\omega$ -toluenthiolem neprobíhaly vůbec.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (projekt č. VS 96 140).

### LITERATURA

1. Černý M., Staněk J.: Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 34, 23 (1977).
2. Kroutil J., Trnka T., Buděšínský M., Černý M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 63, 813 (1998).
3. Karban J.: *Disertační práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 1998.
4. Kroutil J.: *Disertační práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2000.

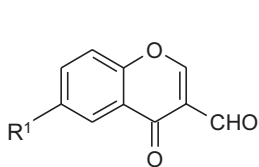
## ŠTÚDIUM REAKCIÍ 3-FORMYLCHROMÓNŮ S ANILIDMI KYSELINY ANTRANILOVÉJ

LENKA KUBICOVÁ<sup>a</sup>, MARGITA LÁCOVÁ<sup>b</sup>,  
KATARÍNA KRÁLOVÁ<sup>c</sup>  
a JARMILA CHOVANCOVÁ<sup>b</sup>

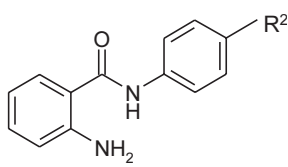
<sup>a</sup>Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: kubicova@faf.cuni.cz, <sup>b</sup>Katedra organické chemie a <sup>c</sup>Chemický ústav, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: lacova@fns.uniba.sk, kralova@fns.uniba.sk

3-Formylchromóny (*I*), ako aj antranilanilidy (*II*), ponúkajú zaujímavé možnosti využitia v organickej syntéze<sup>1,2</sup>, ako aj v aplikáciách pri výskume biologických aktivít<sup>3,4</sup>. Vďaka trom elektróndeficitným centrá 3-formylchromóny reagujú za veľmi miernych podmienok s amínmi. Výsledkom sú vo väčšine prípadov nové typy dusíkatých heterocyklických zlúčenín s potenciálnou biologickou aktivitou.

Zistili sme, že konečným produktom reakcie látok *I* a *II* sú deriváty 1*H*,3*H*-2-(4*H*-4-oxo-3-benzopyranil)-3-fenyl-4-chinazolinónu (*III*). Študovali sme danú reakciu paralelne v dvoch odlišných médiách (etanol, xylén) za rôznych experimentálnych podmienok s cieľom zachytiť intermediáty reakcie. Z literatúry je známe, že v reakciách 3-formylchromónov sa etanol chová ako nukleofil, ktorý sa aduje do polohy 2 benzopyránového systému a následne umožňuje otvorenie pyránového kruhu. V etanole vzniká stabilný adukt troch komponent (zlúčenín *I*, *II* a etanolu) za miernych podmienok (0 °C). Adukt sa v roztoku rýchlo mení a prebieha následná reakcia s otvorením pyránového kruhu. Intermediáty sa podarilo izolovať ako stabilné zlúčeniny a dokázať pomocou NMR-spektier. V xyléne reakcie prebiehajú iným mechanizmom. Produkt *III* sa tvorí v oboch reakčných médiách po jedn hodinovom refluxe. Látky *III* mierne inhibovali syntézu chlorofylu u rias *Chlorella vulgaris*.

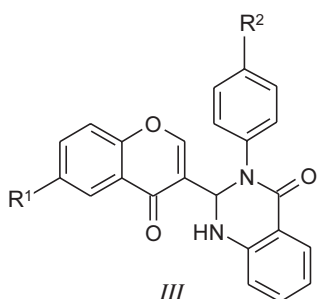


I



II

R<sup>1</sup> = H; CH<sub>3</sub>; Cl; Br  
R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>; Cl; Br



III

Práca vznikla za podpory grantov 1301/G/2000 FRVŠ MŠMT ČR, 1/7262/20 VEGA MŠ SR a 1/5085/98 VEGA MŠ SR a projektu MSM 111600001 MŠMT ČR.

## LITERATÚRA

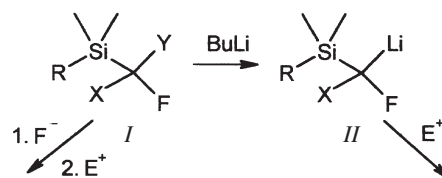
1. Ghosh C. K.: J. Heterocycl. Chem. 20, 1437 (1983).
2. Stankovičová H., Fabian W., Lácová M.: Molecules 1, 223 (1996).
3. Foltínová P., Lácová M., Loos D.: Farmaco 55, 21 (2000).
4. Kubicová L., Dostál H., Kunes J., Králová K., Buchta V., Kaustová J., Waisser K.: ECSOC-4. <http://www.mdpi.org/ecsoc-4.htm>. MDPI, Basel, 1.–30.9.2000. C0015.

## PŘÍPRAVA A REAKCE SILYLOVANÝCH FLUORLITHIOMETHANŮ

JAROSLAV KVÍČALA<sup>a</sup>, JIŘÍ CZERNEK<sup>b</sup>,  
RICHARD HRABAL<sup>c</sup>, OLDŘICH PALETA<sup>a</sup>,  
STANISLAV BÖHM<sup>a</sup> a IVANA BARTOŠOVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, <sup>b</sup>Laboratoř NMR spektroskopie CL, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail kvicalaj@vscht.cz, <sup>c</sup>Oddělení speciálních a bioanalogických polymerů, Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky, Heyrovského n. 2, 162 06 Praha 6

Silylová skupina stabilizuje fluorlithiomethany *II* natolik, že jsou schopny existence za nízké teploty a mohou být využity jako stavební bloky<sup>1</sup>. Výchozí (fluormethyl)silany *I* jsou dostupné různými metodami v závislosti na struktuře fluoromethylu<sup>1-4</sup>. Silylová skupina umožňuje fluoridovým iontem katalyzované adice na karbonylovou skupinu<sup>2</sup>. V přednášce budou uvedeny jednotlivé typy příprav výchozích fluorsilanů *I*, diskutována stabilita silylovaných fluorlithiomethanů *II* a uvedeny příklady obou typů transformací. Experimentální data budou porovnána s údaji získanými počítačovými metodami.



X = H, Br, Cl, F; Y = H, Br, Cl; R = Me, Ph, t-Bu

Práce byla provedena za podpory grantu GA ČR 203/99/1630.

## LITERATURA

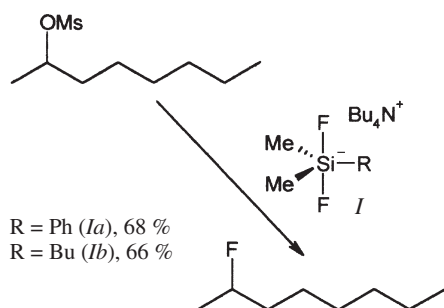
1. Shimizu M., Hata T., Hiyama T.: Tetrahedron Lett. 38, 4591 (1997).
2. Hagiwari T., Fuchikami T.: Synlett 1995, 717.
3. Yudin A. K., et al.: J. Am. Chem. Soc. 119, 1572 (1997).
4. Josten R., Ruppert I.: J. Organomet. Chem. 329, 313 (1987).

## NOVÁ NUKLEOFILNÍ FLUORAČNÍ ČINIDLA NA BÁZI HYPERVALENTNÍCH SLOUČENIN KŘEMÍKU

JAROSLAV KVIČALA<sup>a</sup>, PETR MYSÍK<sup>a</sup>,  
OLDŘICH PALETA<sup>a</sup>, JITKA MORAVCOVÁ<sup>b</sup>,  
HANA CHODOUNSKÁ<sup>c</sup>, JAN ŠAREK<sup>d</sup>  
a JIŘÍ KLINOT<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie, <sup>b</sup>Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: kvicalaj@vscht.cz, <sup>c</sup>Ústav organické chemie a biochemie ČSAV, Flemingovo n. 2, 162 10 Praha 6, <sup>d</sup>Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 6, 128 43 Praha 2

Reakcí TBAF se substituovanými fluordimethylsilany jsme připravili tetrabutylamonium-fenyldifluordimethylsilikonát (*Ia*)<sup>1</sup> a tetrabutylamonium-butyldifluordimethylsilikonát (*Ib*). Tyto sloučeniny byly studovány nízkoteplotní <sup>19</sup>F NMR spektroskopii a využity jako fluorační činidla pro modelové a přírodní organické sloučeniny s aktivovanou hydroxylovou skupinou. Nová fluorační činidla budou porovnána s činidly běžně používanými (TBAF, DAST, TASF).



Práce byla provedena za podpory grantu GA ČR 203/00/1232.

### LITERATURA

1. Albanese D., Landini D., Penso M.: *Tetrahedron Lett.* 36, 8865 (1995).

## KONFORMAČNÍ ANALÝZA METHYLGLYKOFURANOSIDŮ POMOCÍ MOLEKULOVÉ MECHANIKY

JÚLIA LUDIKOVÁ a IVAN RAICH

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: Julia.Ludikova@vscht.cz, Ivan.Raich@vscht.cz

Práce se zabývá simulací konformačního chování monosacharidů v řadách methyl- $\alpha$ - a  $\beta$ -D-erythrofuranosidů a methyl- $\alpha$ - a  $\beta$ -D-threofuranosidů a methyl-5-deoxy- $\alpha$ - a  $\beta$ -D-arabinofuranosidů na úrovni molekulové mechaniky.

Při hledání konformací s nejnižší energií byl problém lokálních minim řešen systematickým mapováním konformačního prostoru, vycházejícím z 3D sítě vstupních konformací, lišících se konformací furanosového kruhu a torzními úhly exocyklických substituentů. Pro zachování sítě byly energetické minimalizace prováděny s částečně fixovanou geometrií furanosového kruhu studovaných látek. Pro výpočty u tetrafuranosidů byla pro porovnání využita silová pole MM3(92), MM3(96) a CFF91/Discover, výpočty u arabinofuranosidů byly provedeny v silovém poli MM3(96). Vypočtené energetické profily byly znázorněny ve formě 3D konturových map v polárních konformačních souřadnicích (fázový úhel pseudorotace, amplituda zprohýbání) podle Cremera a Poplea<sup>1</sup>. Nejnižší hodnoty energií byly zjištěny samostatnými optimalizacemi rotamerů s nejnižší energií, jejichž vstupní geometrie byly úplně relaxované. Verifikace použitých modelovacích metod se prováděla konfrontací experimentálních NMR dat studovaných látek a dat vypočtených na základě nalezených modelů. Interakční konstanty v NMR spektrech byly počítány podle dvou odlišně formulovaných tvarů obecné Karplusovy rovnice<sup>2,3</sup> pro energeticky nejvýhodnější rotamery jednotlivých konformerů na základě jejich Boltzmannových populací.

Z nalezených shod vyplývá, že molekulová mechanika představuje užitečný nástroj při konformační analýze a interpretaci NMR dat u velmi flexibilních furanosových sacharidů.

### LITERATURA

1. Cremer P., Pople J. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 97, 1354 (1975).
2. Haasnoot C. A. G., de Leeuw F. A. A. M., Altona C.: *Tetrahedron* 36, 2783 (1980).
3. Donders L. A., de Leeuw F. A. A. M., Altona C.: *Magn. Reson. Chem.* 27, 556 (1989).

## SROVNÁNÍ CHEMOPROTEKTIVNÍ AKTIVITY CHALKONŮ, DIHYDROCHALKONŮ A HOMOISOFLAVONOIDŮ

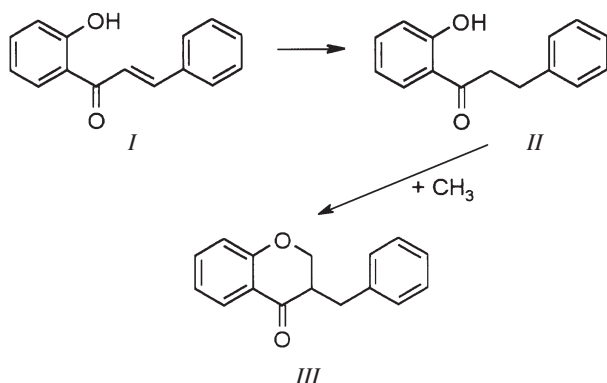
KAMILA LUNEROVÁ<sup>a</sup>, DAGMAR VESELÁ<sup>a</sup>,  
RENATA KUBÍNOVÁ<sup>a</sup>, PETR BARTOŠ<sup>b</sup>,  
EMIL ŠVAJDLENKA<sup>a</sup>, BARBORA FRÁNKOVÁ<sup>a</sup>,  
PAVEL JIRSA<sup>a</sup> a VÁCLAV SUCHÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav přírodních léčiv, <sup>b</sup>Ústav chemických léčiv, FaF VFU Brno, Palackého 1–3, 612 42 Brno, e-mail: kristkovak@vfu.cz

Homoisoflavonoidy (*III*) jsou přírodní látky fenolického charakteru, které byly izolovány z rostlin *Eucomis bicolor*, *Muscari comosum*, *Dracaena cinnabari*, *Scilla scilloides* aj<sup>1</sup>. V rostlinách vznikají<sup>1</sup> z chalkonů (*I*) a dihydrochalkonů (*II*). U všech tří uvedených typů látek byla zjištěna chemoprotektivní aktivita<sup>2,3</sup>.

Předložená práce se zabývá srovnáním antioxidační a chemoprotektivní aktivity jednotlivých typů těchto látek. Testovaly se jednak přírodní homoisoflavonoidy a chalkony izolované z *D. cinnabari* a jednak látky připravené synteticky.

Izolace se prováděly sloupcovou chromatografií na silika-



gelu a polyamidu a přečištěny pomocí HPLC. Syntéza chalconů vychází z vhodně substituovaných 2-hydroxyacetofenonů, které kondenzací s aromatickými aldehydy poskytují chalcony. Po redukcí na dihydrochalcon následuje za přítomnosti sodíku a mravenčanu ethylnatého cyklizace na příslušný homoisoflavonoid<sup>4</sup>. Sledovala se schopnost inhibice lipoperoxidace a dále schopnost inhibice bioaktivního izoenzymu cytochromu P450 1A1 etoxyresorufin-*O*-deethylasy (EROD).

Z výsledků vyplývá, že pro chemoprotektivní aktivitu je rozhodující rozložení substituentů na kruhu A a přítomnost dvojných vazby  $\alpha,\beta$  u chalconů a dihydrochalconů a přítomnost hydroxylových skupin v polohách 5, 3' a 4' u homoisoflavonoidů.

#### LITERATURA

1. Heller W., Tamm C.: Fortschr. Chem. Org. Naturst. 40, 106 (1981).
2. Arty I. S., Timmerman H., Samhoedi M., Sastrohamidjojo, Sugiyanto, van der Goot H.: Eur. J. Med. Chem. 35, 449 (2000).
3. Juránek I., Suchý V., Stará D., Mašterová I., Gračaiová Z.: Pharmazie 48, 310 (1993).
4. Davis F. A., Bang Chi-Chen: J. Org. Chem. 58, 175 (1993).

#### OXIDACE ALKOHOLŮ ENZYMOVÝM SYSTÉMEM FEROMONOVÉ ŽLÁZY LIŠAJE TABÁKOVÉHO

**ANNA LUXOVÁ a ALEŠ SVATOŠ**

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, luxova@uochb.cas.cz

Využití enzymatické katalýzy v organické syntéze patří již mezi standardní postupy organické chemie. V posledním období se repertoár dostupných enzymových systémů pro syntézu rozšířil o mnoho nových typů, jako jsou např. aldolasy a Diels-Alderasy, nicméně nemáme k dispozici enzym, který by byl použitelný k oxidaci alkoholů na aldehydy.

Konečným krokem biosyntézy řady hmyzích sexuálních feromonů je oxidace primárních alkoholů na aldehydy. U lišaje tabákového (*Manduca sexta*) dochází k oxidaci hexadec-

-11-en-1-olů a hexadeca-10,12-dien-1-olů na odpovídající aldehydy. Tato přeměna je katalyzována enzymovým oxidačním systémem lokalizovaným ve feromonové žláze motýla na spodní části abdomenu. Z předběžných výsledků bylo patrné, že vypreparovaný abdomen jak v intaktní, tak v homogenizované formě katalyzuje oxidaci různých alkoholů, a proto jsme začali studovat stabilitu enzymu a jeho substrátovou specifitu.

Studovaný enzymatický systém je za *in vitro* podmínek (hexan/fosfátový pufr) velmi robustní s tepelnou stabilitou do 50 °C (teplotní optimum 25 °C) a je možné jej recyklovat (5×). Jeho substrátová specifita byla určena na různých alkoholech: 1) s lineárním nerozvětveným řetězcem, 2) nenasycené, 3) s aromatickým jádrem v postranním řetězci, 4) sekundární. Zjištěné pořadí reaktivity 3>1>2>>4 je určitým překvapením. Dalo se předpokládat, že primární alkoholy (skupina 1) budou oxidovány nejlépe, neboť jsou strukturně blízké nativním feromonovým substrátům. Primární alkoholy lze selektivně oxidovat ve směsi se sekundárními alkoholy nebo primární alkoholovou skupinu v přítomnosti sekundárních a terciárních alkoholových skupin v molekule.

U enzymového systému nyní určujeme jeho základní biochemické charakteristiky a pokusíme se o jeho izolaci a podrobnější strukturní charakterizaci.

#### SLOŽENÍ LIPIDŮ V TUKOVÉM TĚLESE RŮZNÝCH DRUHŮ ČMELÁKŮ

**ANNA LUXOVÁ, ALEŠ SVATOŠ,  
OLDŘICH HOVORKA, KAREL STRÁNSKÝ  
a IRENA VALTEROVÁ**

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, Praha 6, 16600, luxova@uochb.cas.cz

V rámci studia biosyntézy lipidických složek značkových feromonů samců několika druhů rodu *Bombus* jsme se zabývali analýzou složení extraktů jejich tukových těles. K analýze jsme použili techniku spojení plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie. Polohy dvojných vazeb v nenasycených složkách byly určeny analýzou hmotnostních spekter jejich aduktů s dimethyldisulfidem.

Zajímavým poznatkem je především druhově specifické složení majoritních mastných kyselin deponovaných v tukovém tělese ve formě triglyceridů. Složení hlavních nenasycených a nenasycených mastných kyselin s řetězcem od 12-ti do 18-ti uhlíků se liší především procentuálním zastoupením a polohou dvojných vazeb u nenasycených kyselin. Tyto údaje o složení tukové zásoby budou porovnány se složením extraktů labiální žlázy jednotlivých druhů čmeláků.

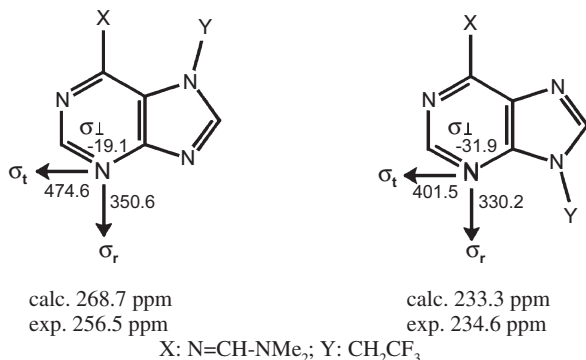
Práce byla provedena za podpory grantu GA ČR 203/98/0453.

**<sup>15</sup>N NMR SPECTROSCOPY OF PURINE DERIVATIVES****RADEK MAREK<sup>a</sup>, JAROMÍR TOUŠEK<sup>b</sup>, JIŘÍ BRUS<sup>c</sup>, LAJOS KOVÁCS<sup>d</sup>, and DANA HOCKOVÁ<sup>e</sup>**

<sup>a</sup>Laboratory of Biomolecular Structure & Dynamics, <sup>b</sup>Department of Theoretical and Physical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic, email: rmarek@chemi.muni.cz, <sup>c</sup>Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovského n. 2, 162 06 Prague, Czech Republic, <sup>d</sup>Department of Medicinal Chemistry, University of Szeged, Dóm tér 8, H – 6720 Szeged, Hungary, <sup>e</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague, Czech Republic

N<sup>9</sup>-Substituted analogues of natural purine nucleosides have been extensively studied for their biological activity, especially as anticancer and antiviral compounds<sup>1</sup>. N<sup>7</sup>-Nucleoside analogues have been studied less frequently<sup>2</sup>, often in context with N<sup>7</sup>/N<sup>9</sup>-glycosyl transfer<sup>3</sup>. <sup>15</sup>N isotope is a very sensitive NMR probe for studying structure and its changes in nitrogen containing compounds.

The <sup>15</sup>N NMR parameters of adenine<sup>4,5</sup> and guanine<sup>5</sup> derivatives in DMSO-*d*<sub>6</sub> solutions were studied by gradient inverse techniques<sup>6</sup>. The principal components of chemical shielding tensors for selected compounds were determined by solid-state <sup>15</sup>N NMR and/or *ab initio* quantum chemical calculations<sup>7</sup> (X-ray geometry and Gaussian94).



The results indicate that N-3 nucleus is more shielded in the N9-isomer than that in the N7-isomer<sup>8</sup> and the change of isotropic chemical shift (~20 ppm) is predominantly associated with the change of component  $\sigma_r$ , tangential to the ring (~60 ppm)<sup>5</sup>.

This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (VS 96 095, CEZ:J07/98:143100005), the Grant Agency of the Czech Republic (203/99/0311, 203/98/P026), and grant OTKA T 22551 to L.K.

## REFERENCES

- Huryň D. M., Okabe M.: Chem. Rev. 92, 1745 (1992).
- Seela F., Winter H.: Helv. Chim. Acta 77, 597 (1994).

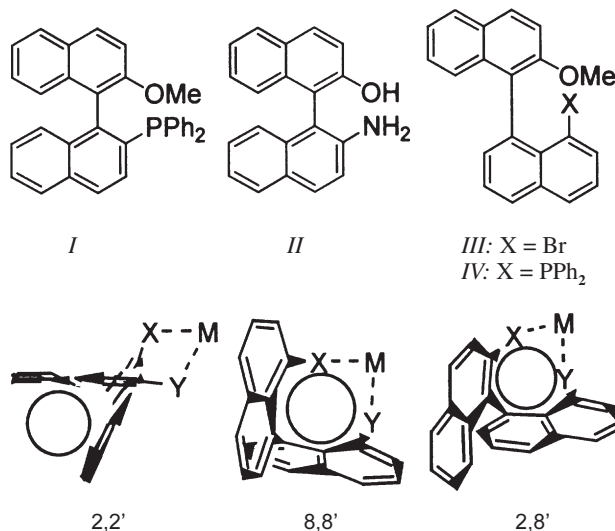
- Boryski J.: Nucleosides Nucleotides 15, 771 (1996).
- Hocková D., Buděšínský M., Marek R., Marek J., Holý A.: Eur. J. Org. Chem. 1999, 2675.
- Marek R., Brus J., Toušek J., Kovács L., Hocková D.: unpublished results.
- Marek R., Humpa O., Dostál J., Slavík J., Sklenář V.: Magn. Reson. Chem. 37, 195 (1999).
- Toušek J., Marek R., Dostál J., Dommissie R., Sklenář V.: Chem. Listy 94, this issue (2000).
- Remaud G., Kjellberg J., Bazin H., Johansson N. G., Chattopadhyaya J.: Tetrahedron 42, 5073 (1986).

**PŘÍPRAVA 2,8'-DISUBSTITUOVANÝCH BINAFTYLŮ****LUDEK MECA a ŠTĚPÁN VYSKOČIL**

Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2, e-mail: lmece@natur.cuni.cz, stepanv@natur.cuni.cz

Chirální 2,2'-disubstituované deriváty 1,1'-binaftylu patří mezi nejspěšnější ligandy používané v asymetrické katalýze<sup>1</sup>. Nesymetricky substituované binaftylu (např. MOP I, cit.<sup>2</sup>, NOBIN II, cit.<sup>3</sup>) často poskytují lepší výsledky než příslušné symetricky substituované sloučeniny.

2,8'-Disubstituované deriváty 1,1'-binaftylu by mohly být výbornými chirálními ligandy, protože koordinovaný atom kovu je vázán ještě blíže k chirálnímu binaftyllovému systému než v obdobném komplexu 2,2'-derivátů (obr. 1). 2,8'-Disubstituované binaftylu jsou také méně náchylné k racemizaci než 8,8'-deriváty. Bude představena syntéza 8-brom-2'-methoxy-1,1'-binaftylu III a 8-difenylfosfino-2'-methoxy-1,1'-binaftylu IV.



Obr. 1.

## LITERATURA

- Noyori R.: *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*. Wiley & Sons, New York 1994.
- Uozumi Y., Hayashi T.: J. Am. Chem. Soc. 113, 9887 (1991).

3. Smrčina M., Poláková J., Vyskočil Š., Kočovský P.: J. Org. Chem. 58, 4534 (1993). Použití NOBINu: Carreira E. M., Singer R. A., Lee W.: J. Am. Chem. Soc. 116, 8837 (1994).

### PŘÍPRAVA *O*<sup>6</sup>-DERIVÁTŮ GUANINU JAKO STANDARDŮ PRO DIAGNOSTIKU POŠKOZENÍ DNA

**JAN NOVÁK a IGOR LINHART\***

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha, e-mail: igor.linhart@vscht.cz

Poškození DNA alkylujícími látkami lze diagnostikovat detekcí příslušných derivátů purinových basí v moči a nukleotidových derivátů v leukocytech vysoce citlivými analytickými metodami. U lidí exponovaných styrenu jsou významnými indikátory poškození *O*<sup>6</sup>-deriváty guaninu. V práci je popsána příprava těchto derivátů metodou aktivace 2-amino-6-chlorpurinu 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanem<sup>2</sup>. Vzniklý 2-amino-6-(1-azonia-4-azabicyklo[2.2.2]-1-oktyl)purin („DABCO-purin“) reaguje snadno s 1-fenylethan-1,2-diolátem sodným za vzniku dvou regioizomerních produktů, *O*<sup>6</sup>-(1-fenyl-2-hydroxy-ethyl)guaninu ( $\alpha$ -adukt) a *O*<sup>6</sup>-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)guaninu ( $\beta$ -adukt) v poměru 1:2. Jednotlivé regioizomery lze izolovat pomocí HPLC, avšak v roztoku opět izomerizují, jak to bylo popsáno u analogických guanosinových derivátů. Struktura připravených látek byla ověřena NMR, UV a hmotnostními spektry.

Práce byla podporována granty MSM 223100001 Ministerstva školství ČR a 313/99/1460 GA ČR.

#### LITERATURA

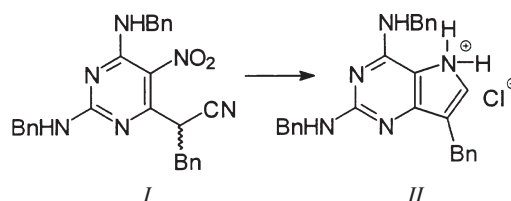
1. Vodička P., Vodičková L., Trejblová K., Šrám R. J., Hemminki K.: Carcinogenesis 15, 1949 (1994).
2. Lembicz N. K., Grant S., Clegg W., Griffin R. J., Heath S. L., Golding, B. T.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1997, 185.

### PŘÍPRAVA 7-ALKYLPYRROLO[3,2-*d*]PYRIMIDINŮ REDUKTIVNÍ CYKLIZACÍ 6-KYANOMETHYL-5-NITROPYRIMIDINŮ

**MIROSLAV OTMAR, MILENA MASOJÍDKOVÁ  
a ANTONÍN HOLÝ**

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: otmar@uochb.cas.cz

Syntetický přístup, který se ukázal být poměrně univerzálním, lze dobře ilustrovat následujícím příkladem. Reakce 2,4-bis(benzylamino)-6-brommethyl-5-nitropyrimidinu s nadbytkem kyanidu draselného poskytla příslušný 6-kyanomethylderivát. Stejný produkt byl překvapivě získán i z dale-



ko snáze dostupného 2,4-bis(benzylamino)-6-dibrommethyl-5-nitropyrimidinu. Benzylací aktivní methylenové skupiny tohoto kyanomethylderivátu vznikl 2,4-bis(benzylamino)-6-(2-fenyl-1-kyanoethyl)-5-nitropyrimidin (*I*). Jeho reduktivní cyklizace poskytla hydrochlorid 7-benzyl-2,4-bis(benzylamino)-5H-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinu (*II*). Struktura připravovaných látek byla ověřena NMR, MS a elementární analýzou. Produkt *II* patří do skupiny derivátů složek nukleových kyselin triviálně nazývaných 9-arylmethyl-9-deazapuriny, z nichž některé se vyznačují silnou schopností selektivně inhibovat proliferaci T-lymfocytů.

Práce byla podporována grantem GA ČR 203/96/K001.

#### LITERATURA

1. Morris P. E., Elliott A. J., Walton S. P., Williams C. H., Montgomery J. A.: Nucleosides Nucleotides 19, 379 (2000).
2. Otmar M., Masojídková M., Buděšínský M., Holý A.: Tetrahedron 54, 2931 (1998).

### STUDIUM MOLEKULÁRNĚ DYNAMICKÉHO CHOVÁNÍ ENZYMU CDK2 A KOMPLEXU CDK2/ROSCOVITIN

**MICHAL OTYEPKA<sup>a</sup>, ZDENĚK KRÍŽ<sup>c</sup>,  
MIROSLAV STRNAD<sup>b</sup> a JAROSLAV KOČA<sup>c</sup>**

<sup>a</sup>Katedra anorganické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc, e-mail: otyepka@risc.upol.cz, <sup>b</sup>Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého a ÚEB, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, <sup>c</sup>Laboratoř struktury a dynamiky biomolekul, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Studium dynamického chování enzymů na molekulární úrovni vede v řadě případů k lepšímu pochopení mechanismu příslušné enzymové reakce, inhibice enzymu ap. Cílem práce bylo studovat chování jednoho z kontrolních enzymů buněčného cyklu, cyklin-dependentní kinas 2 (CDK2), která kontroluje přechod mezi fázemi G1/S buněčného cyklu a replikaci DNA<sup>1</sup> a jeho komplexu s purinovým inhibitorem 6-(benzylamino)-2*R*-[[1-(hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropylpurinem (roscovitinem). V současnosti se intenzivně studují nové možnosti umělé inhibice cyklin-dependentních kinas, neboť bylo prokázáno, že umělé inhibitory mohou hrát klíčovou roli v terapii onemocnění souvisejících s deregulací zmíněných enzymů, např. při terapii nádorových onemocnění<sup>2-4</sup>.



Tabulka I

Příspěvky vybraných reziduí k vazebné energii roscovitinu k CDK2, vdw značí Van der Waalsovský příspěvek a el. stat. je příspěvek elektrostatický

Reziduum	el. stat. kcal.mol <sup>-1</sup>	vdw kcal.mol <sup>-1</sup>	Reziduum	el.stat. kcal.mol <sup>-1</sup>	vdw kcal.mol <sup>-1</sup>
lys 9	-1,488	-0,287	glu 81	-3,075	-0,428
ile 10	-0,923	-6,063	phe 82	-3,085	-3,532
glu 12	1,259	-0,729	leu 83	-5,876	-2,964
val 18	-0,040	-3,261	lys 84	0,632	-1,667
ala 31	-0,405	-1,966	gln 85	-0,225	-2,387
lys 33	1,910	-1,753	asp 86	0,186	-2,433
val 64	0,136	-1,407	gln 131	-2,067	-1,147
phe80	0,244	-2,749	asp145	-1,759	-1,297

Ze srovnání chování volného enzymu CDK2 a jeho komplexu s inhibitorem CDK2/Ros. plyne, že vnesení inhibitoru do aktivního místa neovlivní zásadním způsobem chování enzymu. Rmsd průměrných struktur volné CDK2 a komplexu CDK2/Ros. činí 1,6 Å. Ze srovnání teplotních faktorů vypočtených ze simulací není patrný žádný zásadní rozdíl v chování enzymu, pouze velmi výrazně poklesne teplotní faktor u histidinu 84 u komplexu CDK2/Ros oproti volnému enzymu.

Dále byly analyzovány průměrné energetické příspěvky jednotlivých reziduí enzymu k vazebné energii inhibitoru (tabulka I).

Práce byla podporována granty 31703013 UP Olomouc, VS96095 MŠMT. Za výpočetní čas děkujeme Superpočítačovému centru v Brně.

## LITERATURA

1. Lybrand T. P.: Curr. Opin. Struc. Biol. 5, 224 (1995).
2. Sielecki T. M., Boylan J. F., Benfield P. A., et al.: J. Med. Chem. 43, 1 (2000).
3. Crews C. M., Mohan R.: Curr. Opin. Cell Biol. 4, 47 (2000).
4. Otyepka M., Kryštof V., Havlíček L., et al.: J. Med. Chem. 43, 2506 (2000).

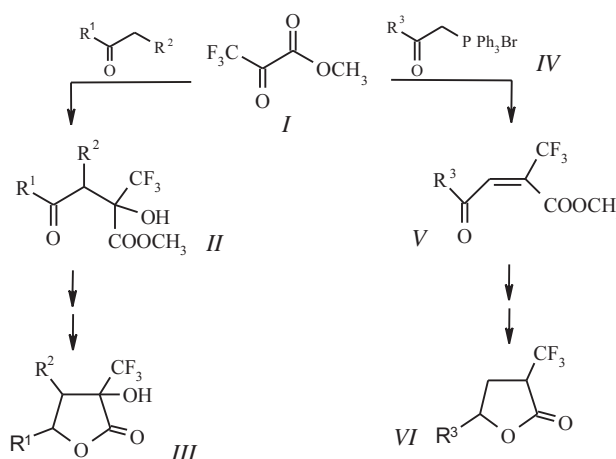
### METHYL-3,3,3-TRIFLUORPYRUVÁT JAKO STAVEBNÍ BLOK: SYNTÉZY $\alpha$ -TRIFLUOROMETHYL-BUTANOLIDŮ

JIŘÍ PALEČEK, BOHUMIL DOLENSKÝ,  
JAROSLAV KVÍČALA a OLDŘICH PALETA

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, jiri.palecek@vscht.cz

V řadě biologicky aktivních přírodních sloučenin lze nalézt  $\gamma$ -laktonový kruh. Trifluomethylová skupina je používána jako modifikující substituent v mediální chemii, proto jsme syntetizovali 2-trifluormethylované butan-4-olidy jako sloučeniny s potencionální bioaktivitou.

Vyvinuli jsme dvě syntetické cesty (které jsou odlišné od dříve užitých postupů<sup>1</sup>), ve kterých jsme použili methyl-trifluorpyruvát *I* jako stavební blok. První cesta je založena na aldolizační reakci<sup>2,3</sup> *I* a poskytuje  $\alpha$ -hydroxy- $\gamma$ -ketoestery *II*, které jsou transformovány ve dvou stupních na  $\alpha$ -hydroxybutanolidy *III*. Druhá cesta využívá Wittigova činidla *IV* připravená z  $\alpha$ -halogenketonů. Je zajímavé, že  $\alpha,\beta$ -nenasycené ketoestery *V* poskytují převládající příznivé (*E*)-izomery, který jsou transformovány k produktům *VI* ve dvou stupních.



## LITERATURA

1. Kitazume T.: J. Fluorine Chem. 35, 287 (1987); Watanabe S., Sakai Y., Kitazume T., Yamazaki T.: J. Fluorine Chem. 68, 59 (1994).
2. Golubiev A. S., Galakhov M. V., Kolomiets A. F., Fokin A. F.: Izv. Akad. Nauk USSR, Ser. Khim. 9, 2127 (1989).
3. Paleček J.: Diplomová práce. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 1999.

## SYNTEZA DERIVÁTŮ 2-FENYLIMIDAZOLU

PATRIK PAŘÍK a JIRÍ KULHÁNEK

Katedra organické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, n. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, e-mail: Patrik.Parik@upce.cz, Jiri.Kulhanek@upce.cz

Strukturní skelet 2-fenylimidazolu byl pro studium reaktivity jeho substitučních derivátů vybrán záměrně z důvodu své blízké podobnosti se skeletem benzoové kyseliny. Navíc systém umožňuje studovat substituci jak na fenylovém, tak i na heterocyklickém jádře. Pro další výzkum byly zvoleny substituenty typu acyl nebo dialkylhydroxymethyl (alkylarylhydroxymethyl) v poloze 4 imidazolového kruhu a v *o*-poloze benzenového jádra.

Reakcí 1,2-dichlorethylenu s acetylchloridem a následně s methanolátem sodným byl připraven 3-chlor-4,4-dimethoxy-2-butanon, který s benzamidin hydrochloridem kondenzuje na žádaný 4-acetyl-2-fenylimidazol<sup>1</sup>. Tento derivát byl podroben Grignardově reakci s rozmanitými Grignardovými činidly s cílem připravit odpovídající chirální alkoholy, které tak poskytly informaci o stereochemii studované reakce.

Reakcí 2-formylbenzoové kyseliny s glyoxalem a aminiakem byla připravena kyselina 2-(2-imidazolyl)benzoová. Cyklizací chloridu této kyseliny byl získán imidazo[2,1-*a*]isoindol-5-on<sup>2</sup>. Reaktivita karbonylové skupiny byla analogicky studována prostřednictvím Grignardovy reakce a byla tak připravena série 2-(*o*-acylfenyl)imidazolů.

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky za finanční podporu (Výzkumný záměr CI MSM 253 100001).

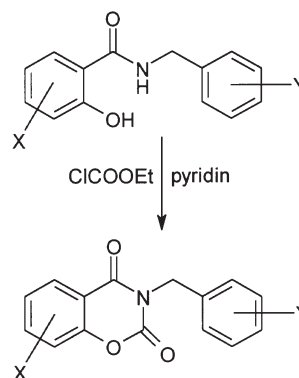
## LITERATURA

1. Sayre L. M., Jin S.-J.: *J. Org. Chem.* 49, 3498 (1984).
2. Fife T. H., Bamberg R. J., DeMark B. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 100, 5500 (1978).

PROTITUBERKULÓZNÍ DERIVÁTY  
3-BENZYL-2H-1,3-BENZOXAZIN-2,4(3H)-DIONUMILAN PEŘINA<sup>a</sup>, IVA BOUDOVA<sup>a</sup>,  
JARMILA KAUSTOVA<sup>b</sup> a KAREL WAISSER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové, e-mail: perina@faf.cuni.cz, <sup>b</sup>Národní referenční laboratoř pro mycobacterium Kansasi, Krajská hygienická stanice, 728 92 Ostrava, e-mail: khsova@ha-vel.cz

V předchozích pracích<sup>1,2</sup> bylo zjištěno, že substituované 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony mají antimykobakteriální (antituberkulózní) aktivitu. Cílem této práce bylo připravit látky obdobné, v poloze 3 substituované benzylskupinou, a zjistit, zda se jedná o antimykobakteriálně účinné látky. Syntéza byla provedena reakcí z výchozího substituovaného *N*-benzylsalicylamidu s ethylchloroformiátem v pro-



Substituenty z pohledu benzoxainu:

X=H; 6-Br; 6-Cl; 6,8-Cl<sub>2</sub>; 6-Me; 6,8-Br<sub>2</sub>; 7-MeO; 6-NO<sub>2</sub>; 7-Cl; 8-MeO; 6-MeO; Y = H; 4-Cl; 4-Me; 4-F

středí pyridinu. Skupina CH<sub>2</sub> zvyšuje lipofilitu, což vede převážně ke snížení rozpustnosti.

Struktura připravených látek překrystalovaných převážně ze směsi ethanol-aceton byla ověřena IČ spektry, NMR spektry a elementární analýzou. Připravené látky jsou v současné době testovány na antimykobakteriální aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* a *M. kansasii*.

Práce byla podporována granty č. 234/2000/BCH GA UK, č. 1304//G/2000 GA FRVŠ a projektem MŠMT MSM 11600001.

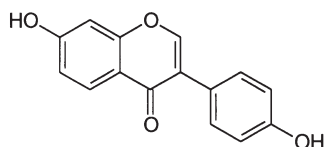
## LITERATURA

1. Waissner K., Macháček M., Dostál H., et al.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 1902 (1999).
2. Waissner K., Gregor J., Kubíčková L., et al.: *Eur. J. Med. Chem.* 35, 733 (2000).

MOŽNOSTI REGIOSELEKTIVNÍ PŘÍPRAVY  
SULFÁTŮ ISOFLAVONOIDŮVLADIMÍR POUZAR<sup>a</sup>, IVAN ČERNÝ<sup>a</sup>,  
OLDŘICH LAPČÍK<sup>b</sup> a RICHARD HAMPL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: pouzar@uochb.cas.cz, <sup>b</sup>Endokrinologický ústav, Národní tř. 8, 116 94 Praha 1

Kysele katalyzovanou kondenzací<sup>1</sup> kyseliny 4-hydroxyfenyloctové a resorcinu byl připraven deoxybenzoinový meziprodukt, který byl reakcí s orthoformiátem ethylatým<sup>2</sup> převeden na cílový daidzein v celkovém výtěžku přes 40 %. Acetylací daidzeinu byl připraven 7,4'-diacetát, který při hydrolyze za mírných podmínek poskytl odpovídající 7-monoacetát ve vysokém výtěžku. Regioizomerní 4'-monoacetát byl získán selektivní acetylací za chladu. Pozice chránicích skupin byla určena rozбором NMR spekter. Při použití stericky náročnější izobutyrylové chránicí skupiny byly získány analogické deriváty.



Pro regioselektivní přípravu sulfátů daidzeinu je možno aplikovat obecný postup<sup>3</sup> využívající sulfatace volné hydroxylové skupiny zvoleného monoacetátu a následné selektivní hydrolýzy acetaátové chránicí skupiny. U všech připravených látek byly také studovány jejich chromatografické vlastnosti v závislosti na struktuře.

Práce byla podporována grantem GA ČR č. 203/99/1456.

#### LITERATURA

1. Wähälä K., Hase T., Adlercreutz H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 208, 27 (1995).
2. Farkas L., Várady J.: Chem. Ber. 92, 819 (1959).
3. Arnoštová L. M., Pouzar V., Drašar P.: Synth. Commun. 20, 1521 (1990).

#### KONSTRUKCE VÁZANÝCH ACIDITNÍCH FUNKCÍ NA ORTHO-SUBSTITUOVANÝCH ANILINECH A N-METHYLANILINECH JAKO INDIKÁTORECH

**OLDŘICH PYTELA<sup>a</sup>, JIŘÍ KULHÁNEK<sup>a</sup>,  
EVA JIRÁSKOVÁ<sup>b</sup> a TATJANA NEVĚČNÁ<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Katedra organické chemie, Univerzita Pardubice, 532 10 Pardubice, e-mail: oldrich.pytela@upce.cz, jiri.kulhanek@upce.cz, <sup>b</sup>Katedra anorganické a fyzikální chemie, Univerzita Palackého, 771 46 Olomouc, e-mail: JIRASKOVA@prfnw.upol.cz, NEVECNA@prfnw.upol.cz

Bylo syntetizováno 15 substitučních derivátů anilinu a N-methylanilinu se substituenty methyl, methoxy, chlor, nitro a s převažující substitucí v poloze *ortho*. Spektrofotometricky byly změřeny hodnoty  $\log I$  v kyselině sírové, chloristé a methansulfonové. Byl navržen nový algoritmus pro konstrukci aciditních funkcí umožňující současně a nezávisle konstruovat aciditní funkce v různých prostředích za podmínky shody hodnot  $pK_a$  stejných indikátorů v daných prostředích. S použitím tohoto algoritmu byly z naměřených hodnot  $\log I$  v uvedených prostředích konstruovány tzv. vázané aciditní funkce a vypočteny hodnoty  $pK_a$ . Výsledné aciditní funkce a hodnoty  $pK_a$  byly ve velmi dobré shodě s literaturou.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky grantem č. 203-97-P095.

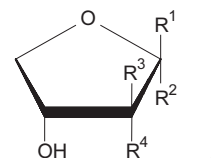
#### KONFORMAČNÍ ANALÝZA METHYLTETROFURANOSIDŮ S VYUŽITÍM VÝPOČETNÍCH METOD

**IVAN RAICH, JÚLIA LUDIKOVÁ  
a HELENA HEISSIGEROVÁ**

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: Ivan.Raich@vscht.cz

Klasické použití Karplusovy rovnice<sup>1</sup> pro zjištění konformace nevede v případě flexibilních derivátů sacharidů s furanosovým kruhem ke konzistentním výsledkům. Poněkud lepší výsledky dává matematické řešení rovnováhy *N*- a *S*-konformerů, avšak největší perspektivu mají v tomto směru modelovací studie založené na molekulové nebo kvantové mechanice.

Na příkladu methyltetrofuranosidů obecného vzorce *I* ( $R^1 = H, OMe; R^2 = OMe, H; R^3 = H, OH; R^4 = OH, H$ ) jakožto nejjednodušších neredukujících sacharidů s furanosovým kruhem je porovnáváno použití jednak systematického mapování konformačního prostoru pomocí molekulové mechaniky a *ab initio* výpočtů, jednak použití molekulární dynamiky. Kromě správnosti jednotlivých modelů posuzované podle shody vypočtených a experimentálních vicinálních interakčních konstant jsou porovnány i časové a další nároky použitých metod. Z nalezených shod vyplývá, že modelovací studie představují užitečný nástroj při konformační analýze a interpretaci NMR dat u flexibilních furanosových sacharidů.



#### LITERATURA

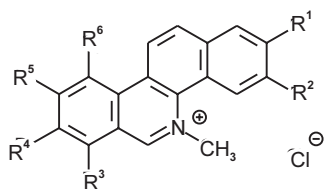
1. Haasnoot C. A. G., de Leeuw F. A. A. M., Altona C.: Tetrahedron 36, 2783 (1980).

#### STRUCTURAL STUDIES OF BENZO[c]PHENANTHRIDINE ALKALOID FREE BASES BY NMR SPECTROSCOPY

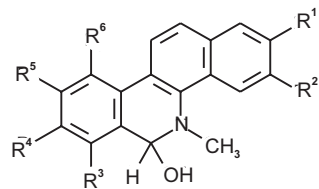
**PAVLÍNA SEČKÁŘOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ DOSTÁL<sup>b</sup>,  
ROGER DOMMISSE<sup>c</sup>, and RADEK MAREK<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>Laboratory of Biomolecular Structure & Dynamics, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic, e-mail: pavlina@chemi.muni.cz, rmarek@chemi.muni.cz, <sup>b</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Komenského n. 2, 662 43 Brno, Czech Republic, e-mail: jrdostal@med.muni.cz, <sup>c</sup>Department of Chemistry, University of Antwerp RUCA, Groenenborgerlaan 171, B – 2020 Antwerpen, Belgium, e-mail: dommisse@ruca.ua.ac.be

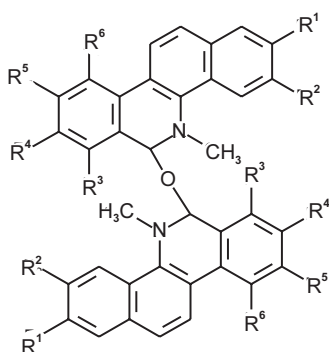
Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids (QBA) are widely distributed in the Papaveraceae, Fumariaceae and Ru-



I



II



III

taceae families<sup>1</sup>. These alkaloids show considerable biological activity, for example antimicrobial and anti-inflammatory.

In the presence of OH<sup>-</sup> anion QBA (I) are converted into 6-hydroxyderivatives called pseudobases (II), which may change to bimolecular aminoacetals (III) by elimination of H<sub>2</sub>O molecule. Free bases of alkaloids chelerythrine, sanguilutine, sanguirubine, chelirubine, chelilutine, sanguinarine, nitidine, and fagaronine were studied by <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy (1D and 2D techniques). Pseudobases (6-hydroxyderivatives) are found the only products of alkalization of the quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in DMSO-*d*<sub>6</sub> solutions using sodium carbonate. This observation differs from the measurements of preparative free bases measured in CDCl<sub>3</sub> solutions<sup>2-5</sup>, under the conditions where the structures of bimolecular aminoacetals were unequivocally confirmed.

Chemical shifts of benzo[c]phenanthridine free bases in DMSO-*d*<sub>6</sub> solutions as well as the results observed for CDCl<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>O systems will be presented.

This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (VS 96 095, CEZ:J07/98:143100005).

## REFERENCES

1. Krane B. D., Fagbule M. O., Shamma M., Gözler B.: J. Nat. Prod. 47, 1 (1984).
2. Dostál J., Táborská E., Slavík J., Potáček M., de Hoffmann E.: J. Nat. Prod. 58, 723 (1995).

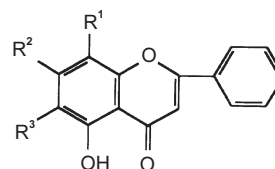
3. Dostál J., Slavík J., Potáček M., Marek R., Sklenář V., de Hoffmann E., Rozenberg R., Tinant B., Declercq J. P.: Phytochemistry 47, 879 (1998).
4. Dostál J., Slavík J., Potáček M., Marek R., Humpa O., Sklenář V., Toušek J., de Hoffmann E., Rozenberg R.: Collect. Czech. Chem. Commun. 63, 1045 (1998).
5. Dostál J., Marek R., Slavík J., Táborská E., Potáček M., Sklenář V.: Magn. Reson. Chem. 36, 869 (1998).

## ANTIOXIDAČNÍ PRINCIPY ROSTLINNÉHO DRUHU *Scutellaria baicalensis*

HANA PAULOVÁ, HANA BOCHOŘÁKOVÁ,  
JIRÍ SLANINA, JAN TRNA a EVA TÁBORSKÁ

Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Komenského n. 2, 662 43 Brno, e-mail: taborska@med.muni.cz

*Scutellaria baicalensis* patří do čeledi Labiateae a řadí se k nejznámějším léčivým rostlinám ve Východní Asii. Extrakty z jejího kořene se používají proti zánětům, alergiím, hypercholesterolemii a ke snížení krevního tlaku. Z kořene *S. baicalensis* bylo izolováno 5 flavonoidů: baicalein (I), wogonin (II), oroxylin (III), wogonin glukuronid (IV) a baicalin (V). Antiradikálový účinek flavonoidů byl hodnocen na základě reakce se stabilním 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyllovým (DPPH) radikálem<sup>1</sup> a schopnost flavonoidů vychytávat hydroxylový radikál byla stanovena pomocí detekce hydroxylačných produktů kyseliny salicylové metodou HPLC<sup>2</sup>. Výrazný antiradikálový účinek vůči DPPH vykázal pouze baicalin a baicalein. Hydroxylové radikály byly vychytávány baicalinem a wogonin glukuronidem, které ve srovnání s kyselinou askorbovou byly 3× účinnější.



- |     |                                     |                                |                                   |
|-----|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| I   | R <sup>1</sup> = H,                 | R <sup>2</sup> = OH,           | R <sup>3</sup> = OH               |
| II  | R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , | R <sup>2</sup> = OH,           | R <sup>3</sup> = H                |
| III | R <sup>1</sup> = H,                 | R <sup>2</sup> = OH,           | R <sup>3</sup> = OCH <sub>3</sub> |
| VI  | R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , | R <sup>2</sup> = O-glukoronyl, | R <sup>3</sup> = H                |
| V   | R <sup>1</sup> = H,                 | R <sup>2</sup> = O-glukoronyl  | R <sup>3</sup> = OH               |

Práce byla provedena s podporou grantu FRVŠ 896/2000 a 886/2000.

## LITERATURA

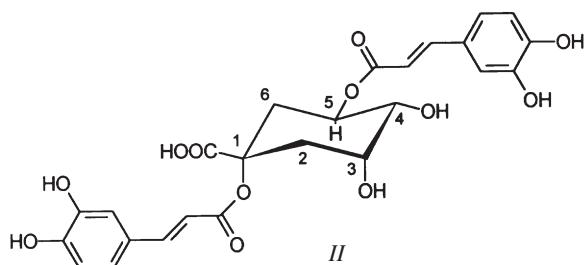
1. Joyeux M., Lobstein A., Anton R., Mortier F.: Planta Med. 61, 126 (1995).
2. Prasad K., Laxdal V. A.: Mol. Cell. Biochem. 135, 153 (1994).

**ANTIRADIKÁLOVÁ AKTIVITA  
CAFFEYOYLCHINOVÝCH KYSELIN  
Z *Cynara cardunculus***

**JIŘÍ SLANINA<sup>a</sup>, HANA PAULOVÁ<sup>a</sup>,  
HANA BOCHOŘÁKOVÁ<sup>a</sup>, OTAKAR HUMPA<sup>b</sup>  
a EVA TÁBORSKÁ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Komenského n. 2, 662 43 Brno, e-mail: jslanina@med.muni.cz, <sup>b</sup>Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Dvě polyfenolické kyseliny, 1,3-dicaffeoylchinová kyselina (cynarin, *I*) a 1,5-dicaffeoylchinová kyselina (*II*), byly izolovány z listů artyčoku kardového (*Cynara cardunculus* L., Asteraceae). Caffeoylchinové kyseliny jsou obsaženy v některých potravinách rostlinného původu (např. jablka, brambory, káva) a vykazují mimo jiné antioxidační, antihepatotoxické a hypocholesterolemické účinky. Dicaffeoylchinové kyseliny inhibují replikaci viru HIV-1 v netoxických koncentracích ireverzibilní inhibicí HIV integrasy<sup>1,2</sup>. Předpokládá se, že mechanismus cytoprotektivní i antiretrovirové aktivity souvisí s redoxními vlastnostmi těchto sloučenin<sup>1</sup>. Zjistili jsme, že schopnost zřádit stabilní radikál 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl klesala v řadě: *II* ( $EC_{50} = 2,8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) > *I* ( $3,9 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) > chlorogenová kys. ( $5,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) > kávová kys. ( $5,8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) a byla vyšší než u askorbové kys. ( $EC_{50} = 10,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ).



Práce byla provedena s podporou grantu GA ČR (grant 303/00/D062).

**LITERATURA**

1. Zhu K., Cordeiro M. L., Atienza J., Robinson W. E., Chow S. A.: *J. Virol.* 73, 3309 (1999).
2. Holý A.: *Chem. Listy* 93, 478 (1999).

**MOLECULAR STUDY ON THE CARCINOGENICITY  
OF *O*-NITROANISOLE AND *O*-ANISIDINE,  
CARCINOGENS WITH UNKNOWN MECHANISM**

**MARIE STIBOROVÁ<sup>a</sup>, MARKÉTA MIKSANOVÁ<sup>a</sup>,  
and EVA FREI<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, e-mail: stiborov@prfdec.natur.cuni.cz, <sup>b</sup>Department of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg

The study is aimed at elucidation of the mechanism of carcinogenicity of two important industrial pollutants, *o*-nitro-

anisole and *o*-anisidine. An industrial accident in the Hoechst company in Germany caused a large-scale leakage of one of these carcinogens, *o*-nitroanisole, and subsequent regional contamination. As a result, researchers in countries of European Union started to address in particular the following research problems: (i) the toxicity and carcinogenicity of this compound, (ii) the metabolic pathway of *o*-nitroanisole, and (iii) the persistence of residues of this compound and/or its metabolites in the environment after the accident. The research interest in *o*-anisidine has similar grounds as in the case of *o*-nitroanisole. The US National Cancer Institute ranks *o*-anisidine as the potentially most effective carcinogen of the urinary bladder, very dangerous also for humans. We first concentrate on the search for the most effective enzyme systems, catalyzing the oxidative and reductive metabolic pathways, and on the characterization of the products formed. The potential of the metabolites to form adducts with nucleic acids is also tested. The major route of metabolism of *o*-nitroanisole *in vitro* is its cytochrome P450-dependent oxidative demethylation to *o*-nitrophenol. Next two metabolites are the C-hydroxylated derivatives of the *o*-nitrophenol. Oxidation of *o*-nitroanisole seems to be its detoxication pathway. The reduction of this carcinogen (catalyzed by xanthine oxidase) led to formation of DNA adducts. *o*-Anisidine is a good substrate for peroxidases, which convert it to reactive metabolites binding to DNA. Diimine, directly determined in our laboratory as a product of *o*-anisidine oxidation by peroxidases, is the major reactive intermediate binding to deoxyguanosine in DNA. The results indicate that both compounds are genotoxic carcinogens binding covalently to DNA after enzymatic activation.

Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/99/1003).

**ANALYSIS OF THE SILKWORM MOTH  
[PHEROMONE BINDING PROTEIN-PHEROMONE]  
COMPLEX BY ELECTROSPRAY IONIZATION-MASS  
SPECTROMETRY**

**NEIL J. OLDHAM<sup>b</sup>, HEINZ BREER<sup>c</sup>,  
JÜRGEN KRIEGER<sup>c</sup>, MICHAL HOSKOVEC<sup>a</sup>,  
and ALEŠ SVATOŠ<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo n. 2, Praha 6, 166 10, svatos@uochb.cas.cz, <sup>b</sup>MPI for Chemical Ecology, Carl-Zeiss-Promenade 10, D-07745 Jena, Germany, <sup>c</sup>Institute of Physiology, University of Stuttgart-Hohenheim, Garbenstrasse 30, D-70593 Stuttgart, Germany

Lipophilic pheromone molecules enter the antennal sensilla (sensory hairs) through cuticular pores, where they come into contact with the aqueous lymph that surrounds the receptor (nerve) cells. Here they are solubilized by a pheromone binding protein (PBP; a small (<20 kDa), water-soluble lipid binding protein), and transported through the lymph to the nerve cell membrane. The pheromone receptor itself resides in this membrane and is of the G protein-coupled type. Acti-

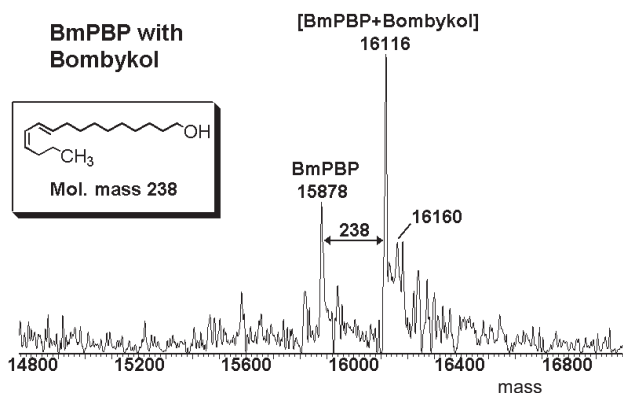


Fig. 1.

vation of the receptor, therefore, stimulates a secondary messenger cascade and ion channel opening, thereby generating a receptor potential.

A [PBP-pheromone] complex has been observed in the gas phase using electrospray-mass spectrometry (ESI-MS) under non-denaturing conditions. Bombykol ((10*E*,12*Z*)-hexadeca-10,12-dien-1-ol), the sex attractant of the silkworm moth, *Bombyx mori*, can be seen (Fig. 1) bound to the *B. mori* antennal pheromone binding protein (BmPBP). The method allows a uniquely unambiguous assessment of odorant binding protein specificity. In conclusion, the non-denaturing ESI-MS technique is a powerful tool for unambiguous assessment of the specificity of interactions between odorant molecules and olfactory binding proteins.

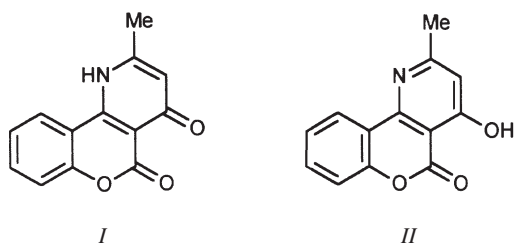
Plans exist to extend this methodology to develop a competitive binding assay and to study the binding of pheromone analogues synthesized in our laboratory.

### 1,5-DIHYDRO-4H-[1]BENZOPYRANO[4,3-*b*]PYRIDIN-4,5-DIONY NEBO 4-HYDROXY-5H-[1]BENZOPYRANO[4,3-*b*]PYRIDIN-5-ONY?

**JAN SVĚTLÍK a VIKTOR KETTMANN**

*Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie, Farmaceutická fakulta, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, e-mail: svetlik@fpharm.uniba.sk*

Trojsložková heterocyklizace 2-hydroxybenzaldehydů s 4-hydroxy-6-methyl-2*H*-pyran-2-onem v přítomnosti octanu amonného představuje novou metodu syntézy substituovaných 1,5-dihydro-2-methyl-4*H*-[4,3-*b*]pyridin-4,5-dionů *I* (cit.<sup>1</sup>). V rámci série těchto sloučenin jsme pozorovali jisté spektrální zvláštnosti, které nás přivedly k detailnějšímu studiu molekulární struktury obdržených produktů. V případě 7-methoxy derivátu *I* byly získány krystaly vhodné pro rentgenostrukturální analýzu. Touto metodou bylo zjištěno, že se vlastně jedná o 4-hydroxy-7-methoxy-2-methyl-5*H*-[1]benzopyrano-[4,3-*b*]pyridin-5-on, tedy izomer typu *II*. Je nutné podotknout, že hydroxyl v poloze 4 je zapojen do intramolekulární vodíkové vazby s přilehlým kumarinovým karbonylem, jak patrně nejen z určených vzdáleností zúčastněných atomů a orientace OH skupiny, nýbrž i vlnočtu pásu C=O. Tento výsledek byl dále konfrontován s kvantovochemickými výpočty (AM1, PM3),



které zcela zřetelně poukazují na termodynamickou preferenci tautomeru *II* ( $\Delta\Delta H_f \approx 12 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ).

Pomocí zmíněné struktury *II* lze lépe pochopit a interpretovat některé „abnormální“ jevy v IR a NMR spektrech těchto heterocyklických sloučenin. Zároveň lze konstatovat, že zkoumané látky kromě tuhé fáze existují i v roztoku jako 4-hydroxypyridinová forma.

*Práce byla provedena za podpory grantu GA SR č. 1/5014/98 a č. 1/5201/98.*

#### LITERATURA

1. Světlík J., Pronayová N., Hanuš V.: *J. Heterocycl. Chem.* 37, 395 (2000).

### KINETICKÁ STUDIE KYSELE KATALYZOVANÉ HYDRATAČE $\alpha$ -ALKYL STYRENŮ S DŮRAZEM NA VYHODNOCENÍ SUBSTITUČNÍHO EFEKTU ALKYLŮ

**JAN SVOBODA a OLDŘICH PYTELA**

*Katedra organické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, n. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice, e-mail: Jan.Svoboda@upce.cz, Oldrich.Pytela@upce.cz*

Byla připravena řada  $\alpha$ -alkylstyrenů s alkyly methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, sec.butyl, isobutyl, *tert*-butyl a přečištěn byl rovněž nesubstituovaný styren. Identita připravených styrenů byla ověřena <sup>1</sup>H NMR spektroskopii a čistota HPLC chromatografií. Na připravené řadě látek byly změřeny kinetiky hydratace katalyzované kyselinou sírovou. Měření kinetik bylo prováděno spektrofotometricky při 25 °C. Závislost změny absorbance na čase byla vyhodnocena jako následná reakce optimalizačními postupy a byly získány pozorované rychlostní konstanty. Ze závislosti pozorovaných rychlostních konstant na aciditní funkci byly vyhodnoceny katalytické rychlostní konstanty. Rovněž byla změřena infračervená spektra. Získané výsledky byly interpretovány z hlediska substitučních efektů.

*Tato práce byla podpořena granty 203/98/0602 GA ČR a IG 300032 Univerzity Pardubice.*

#### LITERATURA

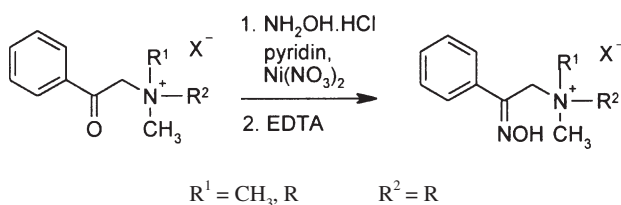
1. Deno N. C., Groves P. T., Saines G.: *J. Am. Chem. Soc.* 81, 5790 (1959).
2. Deno N. C., Kish F. A., Peterson H. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 87, 2157 (1965).

### LIPOFILNÍ *N*-[2-HYDROXYIMINO-2-(PYRIDIN-2-YL)ETHYL]-TRIALKYLAMONIOVÉ SOLI – NOVÉ NOSIČE IONTŮ PŘECHODNÝCH KOVŮ PŘES KAPALNOU MEMBRÁNU

JAN ŠMIDRKAL Jr., RADEK CIBULKA, FRANTIŠEK HAMPL a FRANTIŠEK LIŠKA

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: smidrka@vscht.cz

Lipofilní *N*-[2-hydroxyimino-2-(pyridin-2-yl)ethyl]-trialkylamoniové soli byly připraveny z odpovídajících ketonů reakcí s hydroxylaminem za přítomnosti Ni<sup>2+</sup> iontů, které chelataci stabilizovaly vznikající oxim. Připravené ligandové tenzidy byly pomocí kineticky řízeného transportu iontů přes kapalnou membránu testovány jako extrakční činidla iontů přechodných kovů (Cu(II), Ni(II) a Pd(II)) do organických rozpouštědel. Rychlost, účinnost a selektivita transportu je závislá na struktuře jejich trialkylamoniové skupiny, zejména pak na délce a počtu hydrofobních alkylových řetězců.



### THIOSALICYLANILIDY S ANTIALGÁLNÍ AKTIVITOU

LENKA KUBICOVÁ<sup>a</sup>, KATARÍNA KRÁLOVÁ<sup>b</sup>, AGÁTA FARGAŠOVÁ<sup>c</sup> a MARTIN ŠUSTR<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: sustr@faf.cuni.cz, <sup>b</sup>Chemický ústav, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, e-mail: kralova@fns.uniba.sk, <sup>c</sup>Katedra životního prostředí, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, 812 37 Bratislava, e-mail: agata@chtf.stuba.sk

Salicylanilidy a thiosalicylanilidy mohou v závislosti na substituci vykazovat široké spektrum biologických aktivit. V rámci výzkumu nových potenciálních antituberkulotik byla metodou podle Wagnera<sup>1</sup> připravena série 14 thiosalicylanilidů (*I*), substituovaných v thioacylové (R<sup>1</sup> = H; 5-Br; 5-Cl) i anilidové (R<sup>2</sup>) části molekuly.

Inhibiční účinek *I* na produkci chlorofylu byl studován ve staticky kultivovaných algálních suspenzích *Chlorella vulgaris* (7 dní, světelný režim 16 h světlo/8 h tma, pH 7,2, koncentrace chlorofylu na začátku pokusu 0,5 mg dm<sup>-3</sup>). Sloučeniny *I* inhibovaly produkci chlorofylu v algální suspenzi, hodnoty poloviční inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) se pohybovaly v rozmezí od 1,28 (R<sup>1</sup> = H; R<sup>2</sup> = 4-Br) do 14,26 μmol.dm<sup>-3</sup> (R<sup>1</sup> = Br; R<sup>2</sup> = 4-CH<sub>3</sub>). Inhibiční aktivita *I* závisela na hydrofobním

parametru π a Hammettových konstantách σ substituentů R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup>. Vztah struktura–aktivita lze vyjádřit regresní rovnicí:

$$\log(1/IC_{50}) = 0,698(\pm 0,350) (\pi_p)_1 - 0,038(\pm 0,009) (\sigma_p)_1 - 1,815(\pm 0,750) (\sigma_m)_1 + 0,278(\pm 0,055)\pi_2 - 0,151(\pm 0,102)\sigma_2 + 5,404 (\pm 0,053)$$

$$r = 0,946; s = 0,099; F = 13,700; n = 14$$

Výsledky antialgální aktivity *I* jsou v souladu s výsledky získanými při studiu inhibice fotosyntetického přenosu elektronu v chloroplastech špenátu substituovanými salicylanilidy<sup>2</sup>. Inhibiční účinek salicylanilidů je vyvolán jejich interakcí s intermediátem D<sup>+</sup>, tj. s tyrosinovým radikálem na 161. pozici v proteinu D<sub>2</sub> na donorové straně fotosystému 2 (cit.<sup>3</sup>). Antialgální aktivita 5-nitro- a 5-fluorsalicylanilidů závisí na parametrech π a σ jednotlivých substituentů<sup>4</sup>.

Práce byla podporována granty 1301/G/2000 FRVŠ a 1/7262/20 VEGA MŠ SR a výzkumným záměrem MSM 111600001 MŠMT ČR.

### LITERATURA

1. Wagner G., Singer D., Weuffen W.: Pharmazie 21, 166 (1966).
2. Kubíková L., Králová K., Hladůvková J., Waissner K.: Chem. Listy 92, 969 (1998).
3. Kubíková L., Králová K., Šeršeň F., Gregor J., Waissner K.: Folia Pharm. Univ. Carol. 25, 91 (2000).
4. Kubíková L., Králová K., Kisoová K., Hladůvková J., Waissner K.: Chem. Listy 93, 755 (1999).

### ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ 5-CHLOROTHIOSALICYLANILIDY

MARTIN ŠUSTR<sup>a</sup>, LENKA KUBICOVÁ<sup>a</sup>, JARMILA KAUSTOVÁ<sup>b</sup> a KAREL WAISSER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: sustr@faf.cuni.cz, <sup>b</sup>Krajská hygienická stanice, Partyzánské n. 7, 728 92 Ostrava

Thiosalicylanilidy byly v minulosti vyvíjeny zejména jako anthelmintika<sup>1</sup>, avšak nedávno byla u nich popsána také významná antimykobakteriální aktivita *in vitro*<sup>2</sup>. Mezi cyklickými deriváty thiosalicylanilidů byly nalezeny vysoce účinné antimykobakteriální látky se širokým spektrem aktivity, 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony a 3-aryl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony<sup>3</sup>. Substitucí chlorem v poloze 6 bylo v uvedených skupinách látek dosaženo dalšího zvýšení aktivity<sup>4</sup>.

5-Chlorothiosalicylanilidy (*I*), různě substituované v anilidové části molekuly (R), byly syntetizovány z odpovídajících 5-chlorsalicylanilidů po převedení na 6-chlor-3-fenyl-2*H*-1,3-

-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony reakcí s estery kyseliny chlormravenčí. Jejich tavením se sulfidem fosforečným vznikly směsi 6-chlor-3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 6-chlor-3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů, které alkalickou hydrolyzou poskytly 5-chlorthiosalicylanilidy.

Antimykobakteriální aktivita *I* byla testována mikrometodou *in vitro* na semisyntetické Šulově půdě proti *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium*. Aktivita *I* vyjádřená jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla určována po 14 nebo 21 dnech inkubace při teplotě 37 °C a pH 7,0. Všechny *I* byly silně účinné proti všem sledovaným kmenům, minimální inhibiční koncentrace (MIC) neaktivnějších *I* (R, MIC 14d/21d [ $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ]) byly proti *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88: 4-isoC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, 1/1; (INH, 0,5/1); proti *M. kansasii* CNCTC My 235/80: 4-F, 4-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, 4-isoC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, 8/8; (INH, >250/>250), proti *M. kansasii* 6509/96: 4-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, 4/4; (INH, 4/4) a proti *M. avium* CNCTC My 330/88: 4-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, 16/16; (INH, 250/250). Určitým překvapením však je, že *I* většinou nedosahovaly účinnosti 6-chlor-3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 6-chlor-3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů<sup>4</sup>.

Práce vznikla za podpory grantu FRVŠ 1301/G/2000, grantu GA ČR 203/99/0030 a výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 111600001.

#### LITERATURA

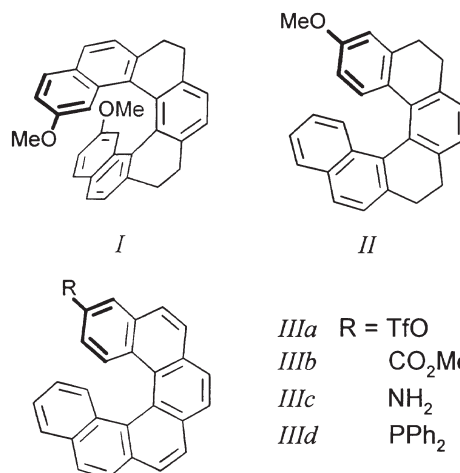
1. Waisser K., Kubicová L.: *Cesk. Farm.* 42, 218 (1993).
2. Waisser K., Kubicová L., Gregor J., Budová J., Andrllová A., Dršata J., Odlerová Ž.: *Cesk. Slov. Farm.* 47, 84 (1998).
3. Waisser K., Kubicová L., Kaustová J., Bartsch H., Erker T., Hanuš V.: *Sci. Pharm.* 67, 123 (1999).
4. Waisser K., Gregor J., Kubicová L., Klimešová V., Kuneš J., Macháček M., Kaustová J.: *Eur. J. Med. Chem.* 35, 733 (2000).

#### EFEKTIVNÍ SYNTÉZA SUBSTITUOVANÝCH HELICENŮ A JEJICH DERIVÁTŮ

FILIP TEPLÝ, ADRIAN KOLLÁROVIČ,  
IRENA G. STARÁ\*, IVO STARÝ\* a DAVID ŠAMAN

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: stary@uochb.cas.cz, stara@uochb.cas.cz

Řada úspěšných aplikací nepřirodních chirálních sloučenin vedla v poslední době ke zvýšenému zájmu o chemii helicenu. Nezbytnou podmínkou pro využití těchto látek je jejich snadná dostupnost. Před časem jsme publikovali novou metodu syntézy tetrahydrohelicenu a helicenu založenou na intramolekulární [2+2+2] cykloizomeraci aromatických triinů za katalýzy Co(I) nebo Ni(0) (cit.<sup>1,2</sup>). Tento nefotochemický způsob přípravy vykazuje značnou flexibilitu a umožňuje připravit sérii produktů s pěti, šesti a sedmi *ortho*-kondenzovanými karbocykly nebo heterocykly.



Funkcionalizované tetrahydroheliceny (*I*) a (*II*) lze získat z CH<sub>3</sub>O-substituovaných aromatických triinů v dobrém výtěžku. Aromatizace látky (*II*) a následná konverze na triflát (*IIIa*) představuje snadnou cestu k substituovaným [6]helicenům (*IIIb–d*).

Tato práce byla podporována GA ČR (grant č. 203/99/1448).

#### LITERATURA

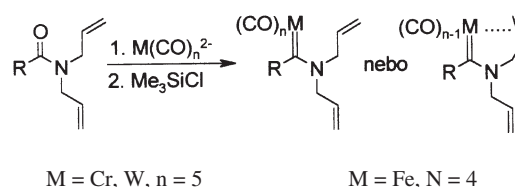
1. Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Teplý F., Šaman D., Tichý M.: *J. Org. Chem.* 63, 4046 (1998).
2. Stará I. G., Starý I., Kollárovič A., Teplý F., Vyskočil Š., Šaman D.: *Tetrahedron Lett.* 40, 1993 (1999).

#### TVORBA ( $\eta^2$ -ALLYLAMINO)KARBENOVÝCH KOMPLEXŮ PŘI REAKCI *N,N*-DIALLYLAMIDŮ KARBOXYLOVÝCH KYSELIN S KARBONYLÁTOVÝMI ANIONTY PŘECHODNÝCH KOVŮ

TOMÁŠ TOBRMAN a DALIMIL DVOŘÁK\*

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Chelatované ( $\eta^2$ -alkenyl)karbenové komplexy přechodných kovů jsou intermediáty při intramolekulární cyklopropnaci a dalších cyklizačních reakcích karbenových komplexů přechodných kovů<sup>1</sup>. Tyto cheláty se většinou připravují termickou nebo fotochemicky iniciovanou cyklizací karbeno-





vých komplexů, které nesou dvojnou vazbu v postranním řetězci.

Reakcí karbonylátových aniontů chromu, wolframu a železa s *N,N*-dialkylamidů karboxylových kyselin v přítomnosti trimethylchlorosilanu<sup>2,3</sup> však v některých případech vznikají chelátované komplexy přímo. Byla studována závislost vzniku chelátovaného a nechelátovaného karbenového komplexu v závislosti na struktuře amidu a povaze přechodného kovu.

*Práce byla provedena s podporou grantu 203/00/1240 GA ČR.*

#### LITERATURA

1. Shobert R.: Trends Organometal. Chem. 2, 57 (1997).
2. Imwinkelried R., Hegedus L. S.: Organometallics 7, 702 (1988).
3. Dvořák D.: Organometallics 14, 570 (1995).

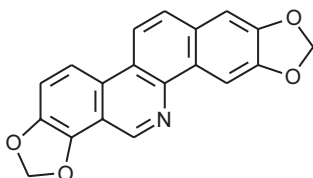
#### NORSANGUINARINE – QUANTUM CHEMICAL CALCULATIONS OF THE CHEMICAL SHIFTS

**JAROMÍR TOUŠEK<sup>a</sup>, RADEK MAREK<sup>b,c</sup>,  
JIŘÍ DOSTÁL<sup>d</sup>, JIŘÍ SLAVÍK<sup>d</sup>,  
ROGER DOMMISSE<sup>e</sup>, and VLADIMÍR SKLENÁŘ<sup>a,c</sup>**

<sup>a</sup>Department of Theoretical and Physical Chemistry, <sup>b</sup>Department of Organic Chemistry, <sup>c</sup>Laboratory of Biomolecular Structure & Dynamics, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37, Brno, e-mail: tousek@chemi.muni.cz, <sup>d</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Komenského n. 2, 662 43, Brno, <sup>e</sup>Department of Chemistry, University of Antwerp RUCA, Groenenborgerlaan 171, B – 2020, Antwerp, Belgium

Norsanguinarine is tertiary benzo[*c*]phenanthridine alkaloid of very weak basicity found in some plant species of the Papaveraceae, Fumariaceae and Rutaceae families. It was isolated as minor alkaloid from *Argemone albiflora* Hornem.<sup>1</sup> and *A. mexicana* L.<sup>2</sup>

The aim of this work is to find out the most appropriate (CPU time, agreement with the experimental results) method for the calculation of the chemical shifts of the benzo[*c*]phenanthridine alkaloids. The calculations were performed for the norsanguinarine, because it has rigid structure and calculations are not complicated by the presence of several conformers. The calculation of chemical shifts consists of the two main steps: the geometry optimisation and the calculation of the chemical shifts for the optimised structure. The following methods were used for the geometry optimisation: molecular



mechanics (MM3 method), semiempirical quantum chemical method AM1 and *ab initio* methods (RHF/6-31G, RHF/6-31G\*\*). The chemical shifts were computed by DFT method, with B3LYP functional at the 6-31G\*\* and 6-31G level (GIAO approach).

It can be concluded from the performed calculations, that the use of molecular mechanics and the AM1 method for the geometry optimisation does not provide satisfactory results. The significant improvement is achieved when the geometry is optimised by the *ab initio* methods. The results also show, that the incorporation of polarization functions is very important for the geometry optimisation and also for the chemical shifts calculations. Very good results with acceptable CPU time requirements are achieved when the geometry is optimised by the RHF/6-31G\*\* method and B3LYP/6-31G\*\* method is used for the chemical shifts calculations.

Experimental values were measured on Bruker Avance DRX-400 and DRX-500 spectrometers<sup>3</sup>. Calculations were performed with the Gaussian 94<sup>4</sup> software installed on the Power Challenge SGI computer with the R10000 processor in Supercomputing centre in Brno.

*This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (VS 96 095, CEZ:J07/98:143100005).*

#### REFERENCES

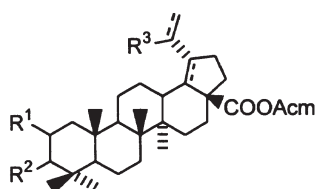
1. Haisová K., Slavík J., Dolejš L.: Collect. Czech. Chem. Commun. 38, 3312, (1984).
2. Haisová K., Slavík J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 40, 1576, (1975).
3. Marek R., Toušek J., Dostál J., Slavík J., Dommisse R., Sklenář V.: Magn. Reson. Chem. 37, 781, (1999).
4. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Gill P. M. W., Johnson B. G., Robb M. A., Cheeseman J. R., Keith T., Petersson G. A., Montgomery J. A., Raghavachari K., Al-Laham M. A., Zakrzewski V. G., Ortiz J. V., Foresman J. B., Cioslowski J., Stefanov B. B., Nanayakkara A., Challacombe M., Peng C. Y., Ayala P. Y., Chen W., Wong M. W., Andres J. L., Replogle E. S., Gomperts R., Martin R. L., Fox D. J., Binkley J. S., Defrees D. J., Baker J., Stewart J. P., Head-Gordon M., Gonzalez C., Pople J. A.: Gaussian 94, Revision D.4. Gauss Inc., Pittsburg (PA) (1995).

#### NOVÉ LUPANOVÉ A 18 $\alpha$ -OLEANANOVÉ DERIVÁTY S CYTOTOXICKÝMI ÚČINKY

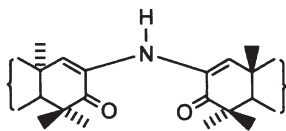
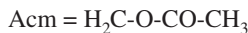
**MILAN URBAN, JAN ŠAREK, JIŘÍ KLINOT  
a IVA TIŠLEROVÁ**

*Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40, Praha 2, e-mail: murban@natur.cuni.cz*

V nedávné době byla námi nalezena vysoká cytotoxická aktivita u skupiny triterpenoidních kyselin a ketokyselin lupanové řady<sup>1</sup>, které by bylo možné v budoucnu využít jako



I



II

 $R^1, R^2, R^3 = \text{kyslíkaté funkční skupiny}$ 

cytostatika. Proto bylo vyvíjeno velké úsilí nalézt esterovou skupinu, která spojuje výhody esterů a přitom nesnižuje cytotoxickou aktivitu jako *n*-alkylestery. Na několika strukturně odlišných kyselinách se ukázala vhodná derivatizace Ac<sub>m</sub> (acetoxymethyl) skupinou<sup>2</sup> I, která byla řádově účinnější než methylesterová a také než volný karboxyl.

Dále byl studován vliv strukturních modifikací kruhu A kyseliny betulinové na cytotoxicitu. Zejména přikondenzování pyrazinového kruhu a oxidační štěpení kruhu A. Také byla zkoumána možnost derivatizace kruhu A allobetulinu, jež vedla k přípravě 2-azidoallobetulinu<sup>2</sup> a neobvyklého bis(triterpenoidního) eniminoketonu<sup>2</sup> obecného vzorce II. Všechny nové sloučeniny, připravené v rámci této práce, byly testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu. Struktury všech přípravných sloučenin byly potvrzeny 1D a 2D NMR spektry.

Práce byla financována z grantů GA ČR 203/00/1549, GA ČR 203/00/1232, GA UK 226/2000 a za přispění MŠMT projekty VS 96140, LB 98233.

#### LITERATURA

1. Šarek J., Klinot J., Tišlerová I.: Chem. Listy 93, 745 (1999).
2. Urban M.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha 2000.

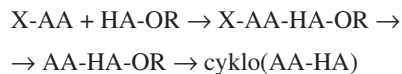
#### PŘÍPRAVA CYKLICKÝCH DIDEPSIPEPTIDOVÝCH ANALOGŮ ALAPTIDU

JARMILA VINŠOVÁ a RICHARD NAGEL

*Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králov, e-mail: vinsova@faf.cuni.cz*

Modifikace molekuly spirocyklického dipeptidu Alaptidu cyklo(L-alanyl-1-amino-1-cyklo-pentankarbonyl) (VÚFB 15754)<sup>1</sup> vede k syntéze substituovaných morfolin-2,5-dionů. K cyklizaci bylo použito dvou základních přístupů<sup>2</sup>:

I. tvorba amidické vazby



II. tvorba esterové vazby



X...*N*-chránící skupina, Y...*O*-chránící skupina, AA... $\alpha$ -aminokyselina, HA... $\alpha$ -hydroxykyselina, R...methyl, ethyl, benzyl.

Z nich vyplývá rozdílná příprava lineárního dipeptidu, kterým je buď *O*-aminoacyl- $\alpha$ -hydroxykyselina nebo *N*-( $\alpha$ -hydroxyacyl)- $\alpha$ -aminokyselina. Při jejich přípravě byly aplikovány metody používané v běžné peptidové chemii s rozdílnými výsledky. Byly vyzkoušeny různé chránící skupiny jak pro aminoskupinu (Cbo, Boc, Fmoc, acetyl) tak pro hydroxyskupinu (*tert*-BuO), jejichž odbourávání (hydrogenolýza, kyselá hydrolyza, basická hydrolyza) vedlo většinou ke směsí produktů. Rovněž tak byla modifikována některá aktivitační (ONSu, ONp, OpCp) a kondenzační činidla. (DCC, CDI, SOCl<sub>2</sub>, BOP)<sup>3</sup>. Zatímco dipeptidy cyklizují bez obtíží, většinou spontánně částečnou aktivací lineárního dipeptidu, u lineárního depsipectidů jsme se se snadnou cyklizací nesetkali. Naopak při izolacích dochází velmi snadno k otevírání vzniklého morfolin-2,5-dionového cyklu. V příspěvku budou porovnány oba použité přístupy a prezentovány námi získané výsledky.

Práce vznikla za finanční podpory grantu UK 24/1998BCH/FaF a Výzkumného záměru MSM 111 6 0000 1.

#### LITERATURA

1. Rádl S., Kasafírek E., Krejčí I.: Drug Fut. 15, 445 (1990).
2. Vinšová J.: Chem. Listy, v tisku.
3. Vinšová J., Kasafírek E.: Chem. Listy 92, 197 (1998).

## Jmenný rejstřík

## Author Index

- Balšánek V. 1039  
 Bambasová Š. 1051  
 Bartoš P. 1055  
 Bartošová I. 1054  
 Bělohradský M. 1039  
 Bielavský J. 1041  
 Böhm S. 1042, 1046, 1054  
 Bochořáková H. 1062, 1063  
 Boudová I. 1060  
 Braunerová G. 1040  
 Breer H. 1063  
 Brus J. 1057  
 Bříza T. 1040  
 Buděšinský M. 1043, 1053  
 Buchalová K. 1051  
 Bureš O. 1040  
 Cabal J. 1041  
 Cibulka R. 1065  
 Círka V. 1031  
 Císařová I. 1039, 1049  
 Czernek J. 1041, 1042, 1054  
 Čajan M. 1041, 1042  
 Čermák J. 1040  
 Černý I. 1043, 1045, 1060  
 Černý M. 1053  
 Daňková K. 1050  
 Dolenský B. 1059  
 Dommissie R. 1061, 1067  
 Dostál H. 1040  
 Dostál J. 1061, 1067  
 Drahoňovský D. 1044  
 Drašar P. 1043, 1045  
 Dudová K. 1044, 1052  
 Dukh M. 1045  
 Dvořák D. 1044, 1047, 1066  
 Dvořáková H. 1048  
 Fadrná E. 1046  
 Fargašová A. 1065  
 Ferenčíková I. 1050  
 Fraňková B. 1055  
 Frei E. 1063  
 Gregor J. 1048  
 Hajduch J. 1046  
 Hampl F. 1065  
 Hampl R. 1043, 1060  
 Havelková M. 1047  
 Havlas Z. 1031  
 Heissigerová H. 1047, 1061  
 Hejtmánková L. 1047  
 Hocek M. 1048  
 Hocková D. 1057  
 Holeček J. 1049  
 Holý A. 1048, 1058  
 Holý P. 1048  
 Hoskovec M. 1063  
 Hovorka O. 1056  
 Hrabal R. 1042, 1054  
 Hrabík O. 1049  
 Humpa O. 1063  
 Chodounská H. 1055  
 Chovancová J. 1054  
 Jambor R. 1049  
 Janík M. 1044  
 Janota J. 1040  
 Jirásková E. 1061  
 Jirsa P. 1055  
 Kalina M. 1049  
 Kaplánek R. 1050  
 Kasák P. 1050  
 Kassa J. 1041  
 Kaustová J. 1048, 1052, 1060, 1065  
 Kaválek J. 1049  
 Kefurt K. 1050, 1051  
 Kettmann V. 1064  
 Klejduš B. 1051  
 Klimešová V. 1052  
 Klinot J. 1055, 1067  
 Koča J. 1042, 1046, 1058  
 Kočí J. 1052  
 Kodíček M. 1050  
 Kollárovič A. 1066  
 Kotora M. 1032  
 Kovács L. 1057  
 Kozmík V. 1052  
 Král V. M. 1045  
 Králová K. 1054, 1065  
 Kraus T. 1053  
 Krieger J. 1063  
 Kroutil J. 1053  
 Křen V. 1036  
 Kříž Z. 1058  
 Kubáň V. 1051  
 Kubicová L. 1054, 1065, 1065  
 Kubínová R. 1055  
 Kulhánek J. 1032, 1060, 1061  
 Kuneš J. 1039  
 Kvičala J. 1040, 1042, 1054, 1055, 1059  
 Lácová M. 1054  
 Lapčík O. 1043, 1060  
 Lepšík M. 1031  
 Lešetický L. 1033  
 Linhart I. 1058  
 Liška F. 1065  
 Ludiková J. 1055, 1061  
 Lunerová K. 1055  
 Luxová A. 1056  
 Macháček V. 1047  
 Marek R. 1057, 1061, 1067  
 Masojídková M. 1058  
 Meca L. 1057  
 Miksanová M. 1063  
 Mindl J. 1049  
 Moravcová J. 1055  
 Mysík P. 1055  
 Nagel R. 1068  
 Nevěčná T. 1061  
 Novák J. 1058  
 Oldham N. J. 1063  
 Otmár M. 1058  
 Otyepka M. 1058  
 Palát K. 1040  
 Paleček J. 1059  
 Paleta O. 1040, 1042, 1046, 1050, 1051, 1054, 1055, 1059  
 Pařík P. 1060  
 Patočka J. 1041  
 Paulová H. 1062, 1063  
 Peřina M. 1060  
 Pour M. 1039  
 Pouzar V. 1043, 1045, 1060  
 Putala M. 1033, 1050  
 Pytela O. 1061, 1064  
 Rádl S. 1034  
 Raich I. 1047, 1055, 1061  
 Růžička A. 1049  
 Sečkářová P. 1061  
 Sedlák M. 1047  
 Sklenář V. 1067  
 Slanina J. 1062, 1063  
 Slavík J. 1067  
 Stará I. G. 1066  
 Starý I. 1066  
 Stibor I. 1042  
 Stiborová M. 1063  
 Stránský K. 1056  
 Strnad M. 1058  
 Suchý V. 1055  
 Svatoš A. 1056, 1063  
 Světlík J. 1064  
 Svoboda Jan 1064  
 Svoboda Jiří 1035, 1052  
 Šaman D. 1066  
 Šarek J. 1055, 1067  
 Šimůnek P. 1044  
 Šlosárek M. 1040  
 Šmidrkal J. Jr. 1065  
 Šnábl L. 1051  
 Špačková N. 1046  
 Šponer J. 1046  
 Špulák M. 1039  
 Štěpnička P. 1044  
 Štěrba V. 1049  
 Šustr M. 1065  
 Švajdlenka E. 1055  
 Táborská E. 1062, 1063  
 Teplý F. 1066  
 Tišlerová I. 1067  
 Tobrman T. 1066  
 Toušek J. 1057, 1067  
 Trna J. 1062  
 Trnka T. 1053  
 Urban M. 1067  
 Urbanský M. 1045  
 Valterová I. 1056  
 Veselá D. 1055  
 Vinšová J. 1068  
 Vitamvasová D. 1051  
 Vondrášek J. 1031  
 Votruba I. 1048  
 Vymětalíková B. 1051  
 Vyskočil Š. 1057  
 Waisser K. 1040, 1048, 1060, 1065  
 Walterová D. 1036  
 Závada J. 1039, 1053  
 Žďárek J. 1036

Redakce Chemických listů vyhověla žádosti představitelů ČSBMB a zveřejňuje příspěvek, který měl být zařazen do Sborníku XVII. biochemického sjezdu v čísle 8/2000 Chemických listů.

## ENZYM S AMINOPEPTIDASOVOU A CHORIOLYTICKOU AKTIVITOU Z JIKER PSTRUHA DUHOVÉHO

JAKUB KRONOVETR<sup>a,b</sup>, JANA BARTHOVÁ<sup>a</sup>  
a TOMISLAV BARTH<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 6, 128 43 Praha 2, <sup>b</sup>Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

Při hledání nových analogů opioidních hormonů, mající antistresový vliv na zrající jikry ryb<sup>1</sup>, se naskytla otázka jejich stability vůči proteolytickým enzymům<sup>2</sup> nacházejících se v místě účinku peptidů, tedy v kultivačním médiu, kde jikry zrají. Použitím chromogenních substrátů pro aminopeptidasy jsme v něm detegovali přítomnost enzymu štěpícího alanin-4-nitranilid. Alanin aminopeptidasa s  $M_r$  36 500 byla pomocí srážení ve vysoce čištěné mQ vodě a následné chromatografii na koloně Superdex S-75 izolována ze samotných jiker pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Nábojově rozdílné molekuly ( $pI$  5,8–7,7) tohoto enzymu jsou tvořeny dvěma podjednotkami spojenými disulfidickými můstky. Čistota alanin aminopeptidasy byla potvrzena SDS elektroforézou a sekvenací od N-konce, kde bylo nalezeno následující pořadí aminokyselin: <sup>1</sup>EVNAVKCSMV RDTLTFNKK KYQIN<sup>25</sup>. Při zjišťování příbuznosti proteinů v databázi SwisProt byla nalezena téměř stoprocentní identita s úsekem vitelogeninu<sup>3</sup> (začínajícího aminokyselinou v pozici 1385) výše zmíněného organismu.

Vitellogenin je prekurzor hlavních vaječných proteinů, které jsou zdrojem potravy v raném stádiu vývoje jikry vejcorodých živočichů. Je syntetizován v játrech, sekretován do krve a transportován endocytosou do rostoucích oocytů, kde je štěpen na menší produkty. Tento enzym může být jedním z těchto produktů. Syntéza vitelogeninu je indukována estrogeny. Obsah vitelogeninu v krvi samců může tedy sloužit k detekci estrogenové kontaminace vody. Žádná enzymová aktivita nebyla dosud u tohoto zásobního proteinu ani jeho rozpadových produktů pozorována.

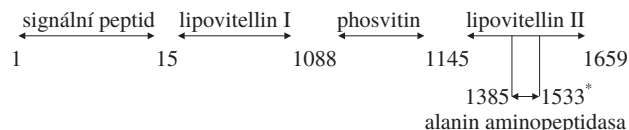
Jako substrát byl použit i chorion (obálka jikry), kde jsme zaznamenali působením enzymu uvolňování peptidů ( $M_r$  1 000–2 000) a proteinů ( $M_r$  kolem 30 000 a 70 000). Test na

zjištění přítomnosti endopeptidasové aktivity použitím výše-molekulárních substrátů jako je vepřový insulin, hovězí sérový albumin a 4-nitroanilidové substráty pro trypsin a chymotrypsin byl však negativní.

Z inhibičních studií při použití alanin-4-nitroanilidu jako substrátu vyplývá, že se pravděpodobně jedná o enzym z rodiny metalloproteas.

V současné době hledáme vhodný umělý substrát enzymu, se kterým bude možno provádět kinetické studie.

Struktura vitellogeninu a umístění sekvence aminopeptidasy:



\* s největší pravděpodobností C-koncová aminokyselina

<sup>1(1385)</sup> EVNAVKCSMV	RDTLTFNKK	KYKINMPLSC
YQVLAQDCTT	ELKFMVLLKK	DHASEQNHN
VKISDIDVDL	YTEDHGVIVK	VNEMEISNDN
LPYKDPGSI	KIDRKGKGVV	LYAPSHGLQE
VYFDKYSWKI	KVVDWMKGQT	CGLCGKAD <sup>148(1533)</sup>

Zvýrazněné úseky byly potvrzeny N-koncovou sekvenací nebo sekvenací některých tryptických štěpů. V uvedeném pořadí aminokyselin se nevyskytuje ani motiv pro N-glykosidickou vazbu (NXT či NXS) ani doména určující příslušnost k rodině metalloproteas (HEXXH).

Tato práce vznikla za podpory grantu S 4055006

## LITERATURA

1. Titov M. I., Vinogradov V. A., Bespalova Ž. D.: Buletin Vsesojuznovo Kardiologičeskovo Naučnovo Centra 2, 72 (1985).
2. Yamagami K., v knize: *Fish Physiology* (Hoar W. S., Randall D. J., ed.), str. 447. Academic Press, San Diego 1988.
3. Mouchel N., Trichet V., Bletz A., Le Penec J. P., Wolff J.: *Gene* 174, 59 (1996).

## OBSAH

ÚVODNÍK	977
REFERÁTY	
Syntéza a biologická aktivita 2- a 6-C-substituovaných purinových bází, nukleosidů a acyklických analogů nukleotidů M. Hocek	978
Příprava a stabilita supertěžkých prvků Č. Jech	983
Prehľad využitia neiónových tenzidov pri úprave vzoriek pre environmentálnu analýzu organických polutantov R. Halko a M. Hutta	990
Kontrola enantiomerní čistoty léčiv M. Doležalová a M. Tkaczyková	994
NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE Doporučení IUPAC The Hold-up Volume Concept in Column Chromatography Retention Parameters in Gas Chromatography Generic Source-Based Nomenclature for Polymers (J. Kahovec)	1003
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY Voltametrické chování a stanovení některých cytokininů na rtuťové elektrodě R. Hušková, D. Pěchová, M. Kotouček, K. Lemr a K. Doležal	1004
Stanovení nanomolárních koncentrací anthracyklinových antibiotik kapilární elektroforézou s UV detekcí A. Gavenda, J. Ševčík a J. Psotová	1010
HPLC separace genotoxických derivátů naftalenu V. Quaiserová, J. Zima a J. Barek	1014
Plazmová tryska pro emisní spektrální analýzu M. Semerád, M. Štěpán, V. Otruba a V. Kanický	1018
VÝUKA CHEMIE	1022
DISKUSE	1025
OSOBNÍ ZPRÁVY	1028
LIBLICE '2000 Plenární přednášky	1031
Krátké přednášky a postery	1039

## CONTENTS

EDITORIAL	977
REVIEW ARTICLES	
Synthesis and Biological Activity of 2- and 6-C-Substituted Purine Bases, Nucleosides and Acyclic Nucleotide Analogues (Bader Award Lecture) M. Hocek	978
Preparation and Stability of Superheavy Elements Č. Jech	983
Review on Utilization of Non-Ionic Tensides for Sample Pretreatment in Environmental Analysis of Organic Pollutants R. Halko and M. Hutta	990
Control of Enantiomeric Purity of Drugs M. Doležalová a M. Tkaczyková	994
NOMENCLATURE AND TERMINOLOGY IUPAC Recommendation The Hold-up Volume Concept in Column Chromatography Retention Parameters in Gas Chromatography Generic Source-Based Nomenclature for Polymers (J. Kahovec)	1003
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS Voltammetric Behaviour and Determination of Some Cytokinines on Mercury Electrode R. Hušková, D. Pěchová, M. Kotouček, K. Lemr, and K. Doležal	1004
Determination of Nanomolar Concentrations of Anthracyclines by Capillary Electrophoresis with UV Detection A. Gavenda, J. Ševčík, and J. Psotová	1010
HPLC Separation of Genotoxic Derivatives of Naphthalene V. Quaiserová, J. Zima, and J. Barek	1014
Plasma Jet for Emission Spectral Analysis M. Semerád, M. Štěpán, V. Otruba, and V. Kanický	1018
EDUCATION IN CHEMISTRY	1022
DISCUSSION	1025
PERSONAL NEWS	1028
LIBLICE '2000 Plenary Lectures	1031
Short Communications and Posters	1039

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 94 (2000), čís./no. 11 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 124, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 110 • ČASOPIS ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ • Bulletin roč./vol. 31 • Vydává Česká společnost chemická ve spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze, s Českou společností průmyslové chemie a Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR, za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt PG 97142), Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUcí REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Gut, J. Heflejš, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke, M. Bláhová (Bulletin), M. Ferles (Bulletin), B. Valter (Bulletin), I. Valterová (Bulletin), R. Liboska (webové stránky), P. Zámstný (webové stránky) • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), J. Soušek (Olomouc), J. Šibor (Brno) • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: C. JirátoVá, I. Valterová • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, J. Churáček, Č. Jech, J. Káš, J. Košťál, J. Koubek, L. Lapčík, J. Lederer, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, P. Pavlas, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ, INZERCI, INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY A PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420(2) 2108 2370, fax +420(2) 2222 0184, e-mail: jiratova@csvts.cz, IČO 444715 • SOUHRNÝ NA INTERNETU/PREPUBLISHED ABSTRACTS ON URL: [http://staff.vscht.cz/chem\\_listy/index.html](http://staff.vscht.cz/chem_listy/index.html) • TISK: PORS 052, Školní náměstí 11, 537 33 Chrudim; SAZBA: SF SOFT, Jinonická 329, 158 00 Praha 5 • Copyright © 2000 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 100 Kč, roční předplatné 2000 (12 čísel) 940 Kč. Předplatné ve Slovenské republice 2200 Kč. Pro členy ČSCH je sleva 50 %, pro studenty 70 % • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2000 (12 issues) DEM 440 • Podávání novinových zásilek povoleno ČP s.p. OZ VČ, č.j. PP/1 5333/95 • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use. • Pokyny pro autory najdete v čísle 7/97 na straně 492, nebo budou zaslány na požádání, zkratky odb. časopisů viz 10/97 str. 911 • Instructions for authors will be sent on request. • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zaslány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu. V rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností. SAZBA BULLETINU: B. Valter.