

Chemická informatika – reklamní slogan nebo vědecký obor?

Záplava informací je zřejmě nejvýznamnějším znakem naší doby. Pokud ve vyhledávači Google zadáte slovo „information“ a provedete hledání, naleznete 578 000 000 odkazů. Pro porovnání slova láska (love – 118 000 000), přítel (friend – 94 200 000), a dokonce i peníze (money – 124 000 000) a sex (sex – 211 000 000) se krčí v druhé řadě. Slovo informatika (informatics – 3 830 000) si také v této soutěži nevede špatně. Pokud se však pokusíme zjistit, co si lidé pod slovem informatika představují, dospějeme k velmi širokému rozpětí názorů. Velmi početné skupině splývá pojem informatiky s využitím výpočetní techniky, běžně je informatika ztotožňována s programováním. Pokud však slovo informatika považujeme za zkrácený výraz pro informační vědu, tedy vědu zabývající se shromažďováním, organizací a tříděním informací, je toto omezení na oblast počítačů zavádějící. Formálními postupy zpracování a vyhodnocování informací (např. logika) se lidé zabývali tisíce let před objevem počítačů a výsledky této práce jsou nesmírně užitečné i v dnešní době.

Výpočetní technika umožnila uskutečnit řadu myšlenek, které před několika desetiletími hraničily s šílenstvím. Bohužel, stejně jako oheň, i počítače jsou skvělým sluhou, ale špatným pánem. Lidé velmi často podléhají jejich vlivu. Při pohledu na výsledky, které se objevují na obrazovce, zapominají, že hloupost spočítaná nebo nalezená milionkrát rychleji nepřestává být hloupostí.

S tím, jak se s pojmem informatika seznamovali pracovníci v jednotlivých vědních oborech, začala vznikat informatika lékařská, historická a samozřejmě také chemická. Na označení chemické informatiky lze dobře dokumentovat neurčitost pojmosloví (http://www.indiana.edu/~cheminfo/informatics/cinform_what.html). V anglickém jazyce se objevují vedle pojmu chemical informatics také označení jako chemoinformatics, cheminformatics, cheminformatics, jejichž vysvětlení závisí na profesní kariéře autora a jen zřídka odráží nějaký hlubší sémantický rozdíl.

V oblasti chemie je velký důraz kladen na počítačový aspekt celé problematiky. S trochou ironie lze tvrdit, že každý, kdo použije počítač pro vyhledání bodu tání sloučeniny, spočítá konformace hexanu s pomocí komerčního programu, nebo využije statistických možností programu Excel se již cítí chemickým informatikem.

Chemická informatika by však měla znamenat něco jiného. Schopnost vyhodnotit chemické informace a zpracovat je způsobem, který nabízí nový pohled na danou problematiku je skutečným přínosem, který mohou chemici-informatici přinést chemii a vědě. Počítače jsou významným pomocníkem na této cestě, nikoli však kouzelným proutkem, který splní každé přání. Jelikož po přečtení těchto řádků bychom mohli být obviněni z počítačové fobie, rádi bychom zdůraznili, že sami programujeme v řadě programovacích jazyků a jsme zakladateli počítačového projektu (<http://www.zvon.org/>), který každý rok využívá několik milionů uživatelů z celého světa. Přesto, a nebo právě proto, jsme zastánci mnohem komplexnějšího pohledu na celou problematiku.

Připomeňme si základní činnosti, jimiž se zabývá infor-

mační věda, tedy shromažďování, organizování a třídění informací. Chemie se právem chlubití propracovaným systémem přístupu k informacím, který nám mohou jiné vědní obory závidět. Bylo by však velkou chybou nechat se ukolébat dosaženými výsledky a dále nerozvíjet odkaz předchozích generací.

V oblasti shromažďování informací je velkým problémem roztržitost zápisů chemických struktur a dalších konceptů. Pokud má chemie plně využít možností počítačů, je třeba vyvinout takovou notaci, která umožní automatické zpracování a abstrahování dat.

Pouze v počátcích je formalizace postupů při prohledání chemických databází. Zde bychom se měli inspirovat softwarovým inženýrstvím. Formalizace postupů, která sebou přinesla pojmy jako architektura klient-server, „peer-to-peer“ a podobně, usnadňuje komunikaci v oboru, a tím významně přispívá k pokroku v dané oblasti.

Organizování informací je rovněž výzvou, která doposud nebyla uspokojivě vyřešena. Zejména je důležité neomezit se na počítačový aspekt problematiky, tedy na otázky jak efektivně uložit informace do počítače tak, aby bylo dosaženo úspory místa v paměťových médiích a zároveň maximálně urychleno prohledávání uložených dat. Mnohem větší důraz by měl být kladen na interakci databázových a výpočetních systémů s uživateli, tedy v první řadě s praktickými chemiky. V anglické literatuře se tato oblast nazývá „usability engineering“ a ukazuje se, že uplatňování jejich principů může přinést řádově úspory času a prostředků. V oblasti chemie jsme bohužel na samém počátku. Myslím, že řada čtenářů těchto řádků mnohokrát řešila problém, jak danému software sdělit, co vlastně chce najít a snažila se vyluštit, co program odpověděl. Zatímco programátoři rádi svalují odpovědnost na neschopné uživatele, z hlediska „usability“ je chyba zcela na programu. Software se musí přizpůsobovat uživateli, nikoli uživatel počítači.

Neopominutelná je rovněž pedagogická role chemické informatiky. Problémem současné výuky nejen na vysokoškolské úrovni je nekoordinovaný způsob, s jehož pomocí se studenti seznamují s novými vědeckými poznatky a s jejich aplikací v praxi.

Studenti rovněž vnímají teorie a poznatky, se kterými se během výuky seznamují, jako stálá fakta, která zde od nepaměti jsou a vždy budou platit. Výuka informatiky, zaměřená na vyhledávání a samostatné zpracování informací v komplexní rovině, umožňuje studentovi snazší vstup do praktického života, kde se jeho schopnosti orientace v záplavě informací a samostatného vyhodnocování rozporuplných dat odráží na jeho služebním postupu, a tedy i finančním ohodnocení.

Na závěr bychom se vrátili k názvu tohoto článku. Jsme přesvědčeni, že chemická informatika je skutečný vědní obor, i když ne se zcela jasnými hranicemi. Dokonce se domníváme, že se jedná o naprosto klíčový obor, jehož vývoj bude určující pro řadu odvětví „klasické“ chemie.

Miloslav Nič a Jiří Jiráč

TRENDY V TOTÁLNÍ SYNTÉZE ALKALOIDŮ

JOSEF HÁJÍČEK

Zentiva/Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, a.s.,
U kabelovny 130, 10237 Praha 10
josef.hajicek@zentiva.cz

Došlo 12.11.04, přijato 23.3.05.

Klíčová slova: alkaloidy, totální syntéza, asymetrické reakce, kaskádové/dominové reakce, biomimetické reakce, chirální katalyzátory, [4+2]-cykloadice, [3+2]-dipolární adice, enová reakce, přechodové kovy, palladium, asymetrická allylová substituce, Heckova reakce, kruhotvorná metatéza, molekulární přesmyky, vmezeření dusíku, vmezeření aminoalkylu, Michaelova adice, radikálové cyklizace, oxidativní kaplink, aktivace C-H vazby, reakce C=N vazby, Pictetova-Spenglerova reakce, Mannichova reakce, anatoxin A, cylindricin C, aspidospermidin, galantamin, histrionikotoxin, chimonanthin, kyselina α -allokainová, lucidulin, manzamin A, morfin, okaramin N, rhazinilam, spartein, strychnin, tabersonin, vallesamidin, vindorosin

Obsah

1. Úvod
2. Ditopické metody
3. Aplikace přechodových kovů
4. Další metody
5. Syntéza alkaloidů na přelomu století. Výhled

Článek se soustřeďuje na vývoj a trendy v totální syntéze alkaloidů; na konkrétních příkladech ilustruje možnosti, které využití vybraných obecných syntetických metod nabízí v totální syntéze této skupiny přírodních látek.

1. Úvod

V předchozím sdělení jsem se pokusil ukázat¹, jaké možnosti nabízí v totální syntéze alkaloidů transformace dvojné vazby C=N jakožto specifické prostředky konstrukce skeletů těchto sekundárních metabolitů. V syntéze alkaloidů se pochopitelně uplatňuje i celá škála obecných syntetických metod. Enormní pestrost alkaloidních skeletů a omezený prostor je důvodem, proč i tento přehled je spíše pouze jakýmsi nástinem potenciálu vybraných syntetických metod než racionálním přehledem postupů syntézy této skupiny přírodních látek^{2,3}.

Z důvodu omezeného prostoru je v některých přípa-

dech ve schématech znázorněna pouze ilustrativní sekvence z mnohastupňové totální syntézy; ze stejného důvodu je rozšířená verze literatury se zachovaným číslováním umístěna na webové stránce. Přehled používaných zkratk čtenář může najít např. v cit.^{2,3}, případně v citovaných pracích; schematický zápis rt 1 h → rfl (0,5 h) 2 h znamená, že směs byla nejprve udržována 1 h při laboratorní teplotě, potom zahřáta během 0,5 h k varu a dále zahřívána k varu 2 h.

2. Ditopické metody

Dielsova-Alderova reakce, a zvláště její intramolekulární varianta, patří k nejvýznamnějším metodám konstrukce alkaloidních skeletů (R⁴). Intermolekulární varianta je úvodním stupněm již zmíněné Woodwardovy syntézy reserpinu (viz¹, Schéma 3); byla užita i ve Wenderově syntéze tohoto alkaloidu⁵, jejíž klíčovou sekvenci znázorňuje Schéma 1. Cykloadice dienu **1** s acetoxyakrylátém poskytla směs cykloaduktů, v níž stereoisomer **2** převládá (2:1). Transformace v 1,5-dien **3** umožnila termicky iniciovaný Copeův přesmyk, při němž byl generován isochinolinový karbamát **4** se správnou relativní konfigurací tří generovaných chirálních center (78 %). Karbamát **1** se uplatnil i v syntéze iboganových alkaloidů⁶. Lewisovskyy katalyzovaná [4+2]-cykloadice je úvodním stupněm Kishiho totální syntézy tetradotoxinu⁷.

Katalytické enantioselektivní reakce bylo užito v úvodu dosud nejefektivnější syntézy (+)-tabersoninu (**12a**) a (+)-11-methoxytabersoninu (**12b**), provedené v multigramovém měřítku, jejíž celkový výtěžek je 16 až 20 % (!)⁸, Schéma 2; pro racemickou variantu viz⁹. Cykloadice 1-aminodienu **6** s 2-ethylakroleinem v přítomnosti 5% Jacobsenova chirálního chromitého komplexu **5b** poskytla aldehyd **7** ve výtěžku 91 % s ee 95 % v 20 mmol měřítku. K uzávěru piperidinového kruhu bylo využito kruhotvorné metatézy (viz kapitola 3) odvozeného diolefinu pomocí Grubbsova katalyzátoru s vysokým výtěžkem.

Protože Fischerova indolizace ketonu odvozeného z enoletheru **8** nebyla regioselektivní (příklady¹⁰), Rawal a Kozmin připravili nitrofenylderiváty **9** reakcí **8** s NPIF ((2-nitrofenyl)fenyljodonium-fluorid), resp. jeho methoxyanalogem (57–62 % z aldehydu **7**). Redukce nitroskupiny vedla ke spontánní cyklizaci za vzniku indolů **10**, které byly transformovány přes indoleniny **11** v cílové base **12**, Schéma 2.

[4+2]-Cykloadice sekodinů byla postulována jako klíčová reakce (R¹¹) v biosyntéze některých typů *monoterpenoidních* indolových alkaloidů (R^{12,13}). Na jejím základě Kuehne se spolupracovníky vypracoval obecnou biomimetickou syntézu alkaloidů aspidospermanového¹⁴ ((-)-vindolin¹⁵), pseudoaspidospermanového¹⁶ i iboganového¹⁷ typu;

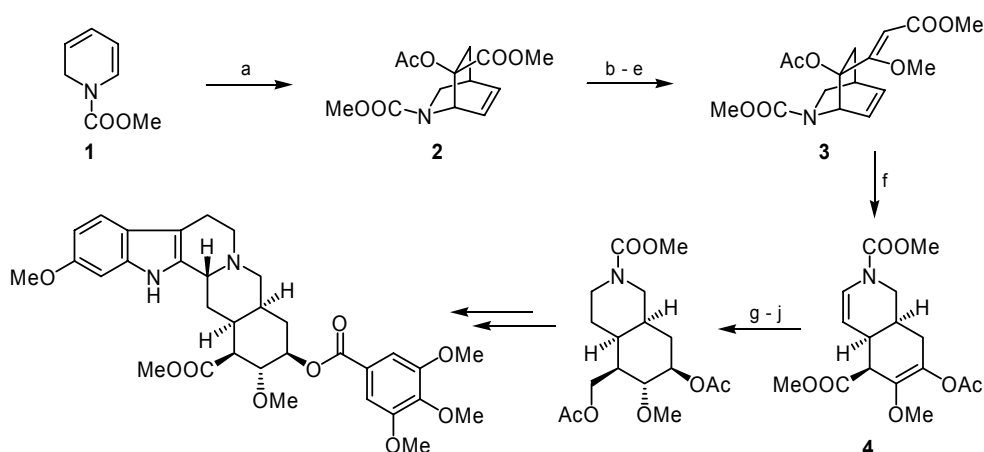


Schéma 1. Sekvence ze syntézy (±)-reserpinu

Činidla a podmínky: **a)** $\text{CH}_2=\text{C}(\text{OAc})\text{COOR}$, hydrochinon, PhMe, 120 °C 56 h (76 %; 2:1); **b)** LDA, MeCOOt-Bu, THF, -78 °C → rt (89 %); **c)** Ac₂O, Et₃N, DMAP; **d)** TFA, rt; **e)** CH₂N₂, MeOH, Et₂O (65 %, 3 stupně); **f)** Xylen, 243 °C 3 h (78 %); **g)** H₂, Pd/C, AcOEt (95 %); **h)** LiAlH₄, Et₂O, 0 °C 2 min (78 %); **i)** LiHMDS, THF, -10 °C, potom AcCl (přebytek), -78 °C; **j)** H₂, Pd/C, AcOEt (79 %)

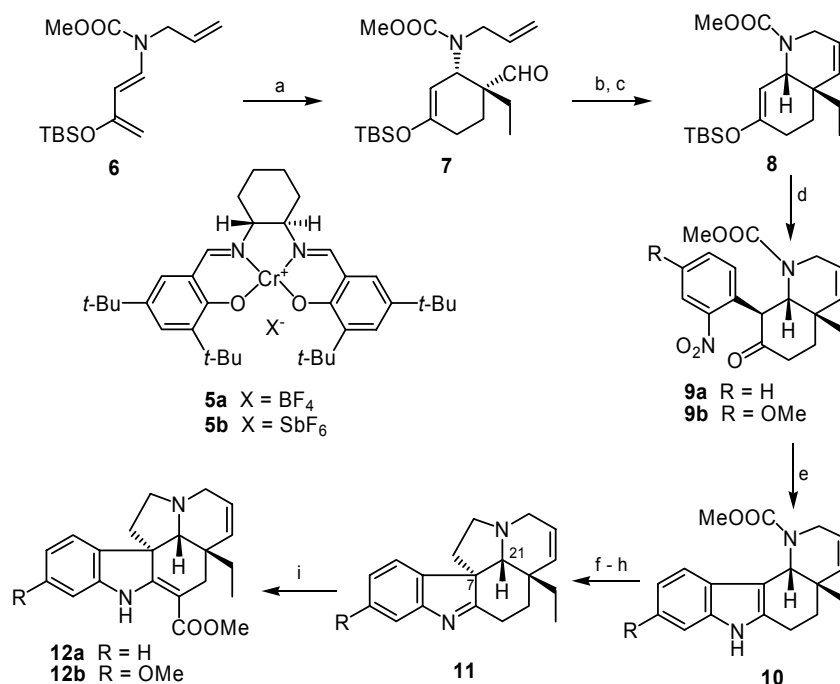


Schéma 2. Syntéza (+)-tabersoninu a (+)-11-methoxytabersoninu

Činidla a podmínky: **a)** **5b** (5 mol%), $\text{CH}_2=\text{C}(\text{Et})\text{CHO}$, 4Å MS, CH₂Cl₂, -40 °C 2 d (91 %, 96% ee/1 mmol; 95% ee/20 mmol); **b)** Ph₃P⁺Me Br⁻, *n*-BuLi, THF, -78 °C → rt; **c)** Grubbsův rutheniový katalyzátor (4,3–7,5 mol%), CH₂Cl₂, rfl 44 h; **d)** NPIF, DMSO/THF (2:1), 0 °C → rt 3,5 h (59 % 3 stupně); **e)** TiCl₃, NH₄OAc, Me₂CO vod., rt 30 min; **f)** TMSI, CH₂Cl₂, rfl 1 h; **g)** BrCH₂CH₂OH (10 ekv.), Na₂CO₃, EtOH, rfl 15 h; **h)** MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, -15 °C 30 min, potom KO*t*-Bu, THF, -15 °C → rt 45 min; **i)** LDA, THF, -70 °C 40 min, potom NC.COOMe, -70 °C 20 min (39 % z **9a**)

(pseudo-biomimetická) varianta postupu (tzv. „versatily“¹⁸) byla aplikována mj. v totální syntéze strychnanových alkaloidů¹⁹ (strychnin²⁰), (±)-^{18,21} a (-)-koronaridinu²² a protinádorově účinných bis-indolů²³.

V enantioselektivní variantě postupu byla chiralita indukována skupinou fenylethylou²³, a potom ferroc-

nylethylou²⁴. Schéma 3 ukazuje aplikaci poslední generace chirálních induktorů ferrocenyklohexylového typu v totální syntéze (-)-mossambinu (**18**)²⁵. Alkohol (+)-**14a** byl konvertován v mesylát **14b**, a následnou reakcí s univerzálním aminem **13** v chirální basi **15**. Její reakcí s acetoxyacetaldehydem byl získán tetracyklický amin **16**

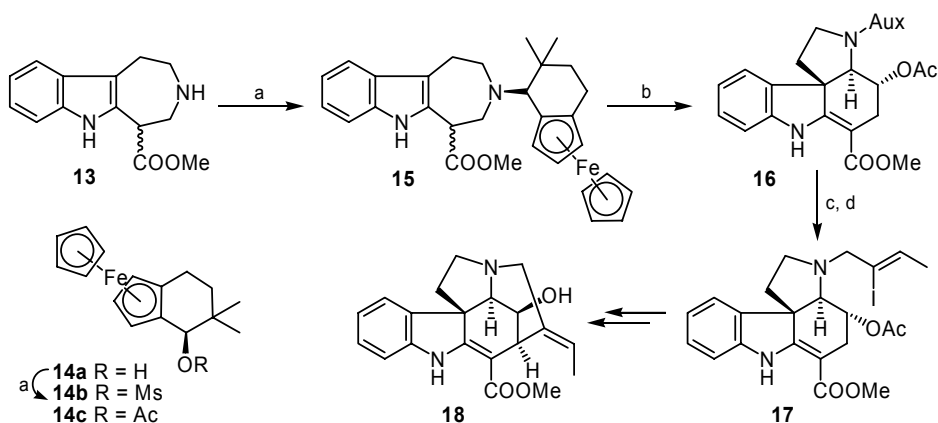


Schéma 3. Syntéza (-)-mossambinu

Činidla a podmínky: a) (+)-**14a**, MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 10 °C 3 h, potom **13**, *i*-PrOH, -78 °C → 10 °C 14 h (97 %); b) AcOCH₂CHO, PhH, rfl 22 h (**16** 76 %); c) AcOH, rt 22 h (98 %); d) (*Z*)-MeCH=C(I)CH₂Br, K₂CO₃, THF, rfl 14 h (70 %)

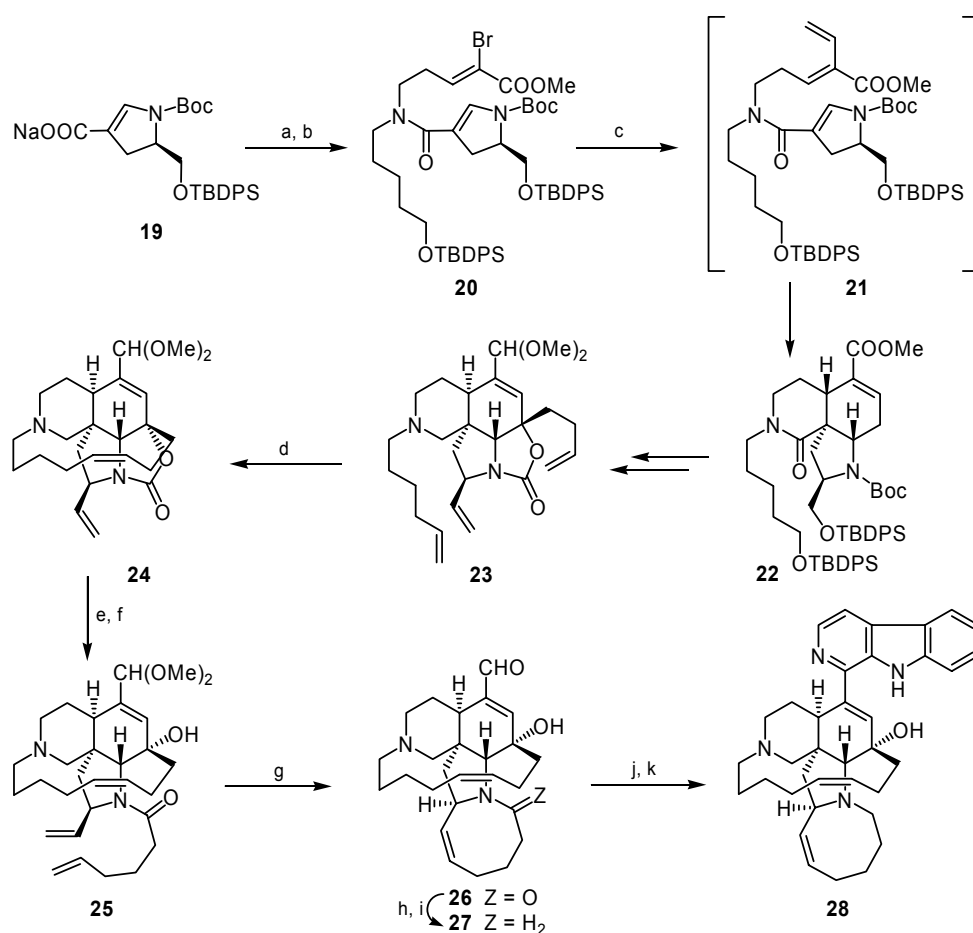


Schéma 4. Syntéza (+)-ircinalu A a manzaminu A

Činidla a podmínky: a) (COCl)₂, PhH, 5 °C 15 min → rt; b) (*Z*)-TBDPSoCH₂(CH₂)₃CH₂NHCH₂CH₂CH=C(Br)COOMe, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C → rt (79 % 2 stupně); c) Bu₃SnCH=CH₂ (1,1 ekv.), [Pd(PPh₃)₄] (kat.), PhMe, rfl 30 h (68 %); d) Grubbsův Ru katalyzátor (kat.), CH₂Cl₂, rfl 5 h, další katalyzátor, rfl 2 h (**24** 67 % + (*E*)-isomer 8 %); e) 40% KOH/MeOH, rfl 30 min; f) CH₂=CH(CH₂)₃COCl, 2,6-lutidin, CH₂Cl₂, rt 30 min (75 % 2 stupně); g) Grubbsův Ru katalyzátor (1 ekv.), PhH, rfl 30 min (26 %); h) Dibal-H, cyklohexan/CH₂Cl₂ (2:1) (63 %); i) Dessův-Martinův perjodinan, CH₂Cl₂, 0 °C → rt 40 min (89 %); j) Tryptamin (4,5 ekv.), TFA (velký přebytek), 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt 13 h (56 %); k) DDQ, CHCl₃, EtOH (52 %)

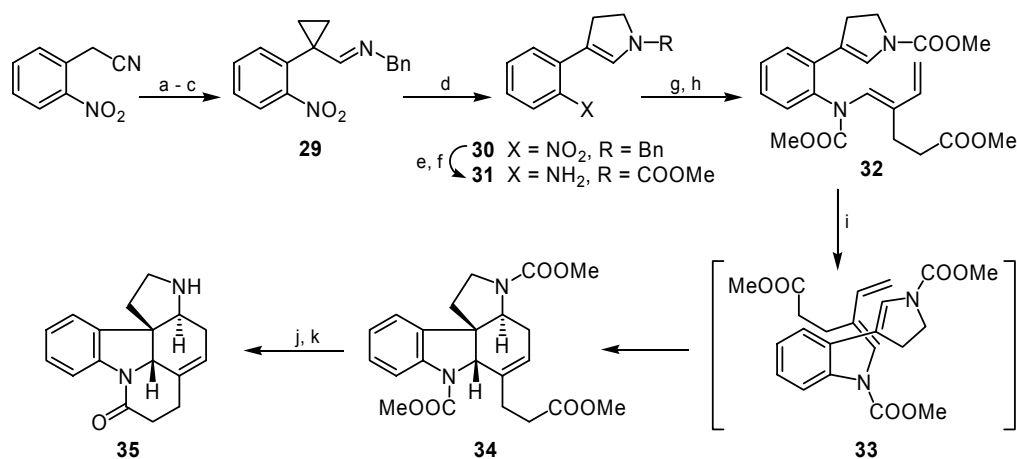


Schéma 5. Úvodní stupně Rawalovy syntézy (±)-strychninu

Činidla a podmínky: **a)** $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, $n\text{-Bu}_4\text{N}^+ \text{Br}^-$, NaOH ; **b)** Dibal-H , -78°C (96 % 2 stupně); **c)** BnNH_2 ; **d)** Me_3SiCl , NaI (96 %); **e)** ClCOOMe ; **f)** $\text{H}_4\text{N}^+ \text{HCOO}^-$, Pd/C (86 %); **g)** $\text{MeCH}=\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})\text{CHO}$, bez rozpouštědla, rt ; **h)** ClCOOMe , PhNEt_2 (85 % 2 stupně); **i)** PhH , 185°C 4 h (99 %); **j)** TMSI (10 ekv), CHCl_3 , rfl 5 h; **k)** MeOH , zahřívát 6 h (90 % 2 stupně)

jako 97:3 směs diastereoisomerů; opticky čistá base **16** (ee > 99 %) byla izolována v 76 % výtěžku. Následnou acetolýzou byl regenerován acetát **14c**, a uvolněný amin (98 %) byl alkylován za vzniku jodalkenu **17** (70 %), který byl radikálově cyklizován a transformován posléze v (–)-**18**. K indukci chiraloty bylo využito rovněž tryptofanových derivátů²⁶.

Na alternativních způsobech generace sekodinových intermediátů jsou založeny další syntézy aspidospermanových (Szántay²⁷, Danieli²⁸, Fukuyama²⁹) a pseudo-aspidospermanových alkaloidů (Grieco³⁰, Szántay³¹). [4+2]-Cykloadiční reakce byla postulována i v biosyntéze brevianamidů a příbuzných sloučenin, čehož bylo využito např. v biomimetické totální syntéze (±)-brevianamidu **B**³² a (–)-VM55599³³ (R^{34}).

Intramolekulární [4+2]-cykloadice (pyrrolin jako dienofil) našla uplatnění při enantioselektivní konstrukci skeletu v Martinově totální syntéze (+)-ircinalu **A** (**27**) a manzaminu **A** (**28**)³⁵, Schéma 4. Pyrrolin **19**, dostupný z (*R*)-pyroglutamové kyseliny, byl konvertován v bromakrylát **20**, a dále pomocí Stilleho kaplinku v dien **21**, který za podmínek reakce (vroucí toluen) podlehl intramolekulární [4+2]-cykloadici. Přítomné chirální centrum indukovalo konfiguraci tří vznikajících stereocenter a tricyklický laktam **22** byl získán v 68% výtěžku jako jediný stereoisomer. Jeho transformace v triolefin **23** připravila půdu pro uzavěr 13-členného kruhu působením Grubbsova rutheniového katalyzátoru; kruhotvorná metatéza byla významně (*Z*)-selektivní (8 % (*E*)-isomeru) a v získaném azatridecenu **24** (67 %) byl po konverzi v **25** uzavřen stejnou metodou i azocinový kruh (pouze 26 % v důsledku interference s další násobnou vazbou). Laktam **26** byl konvertován v ircinal **A** (**27**), a nakonec s využitím Pictetovy-Spenglerovy cyklizace v manzamin **A** (**28**).

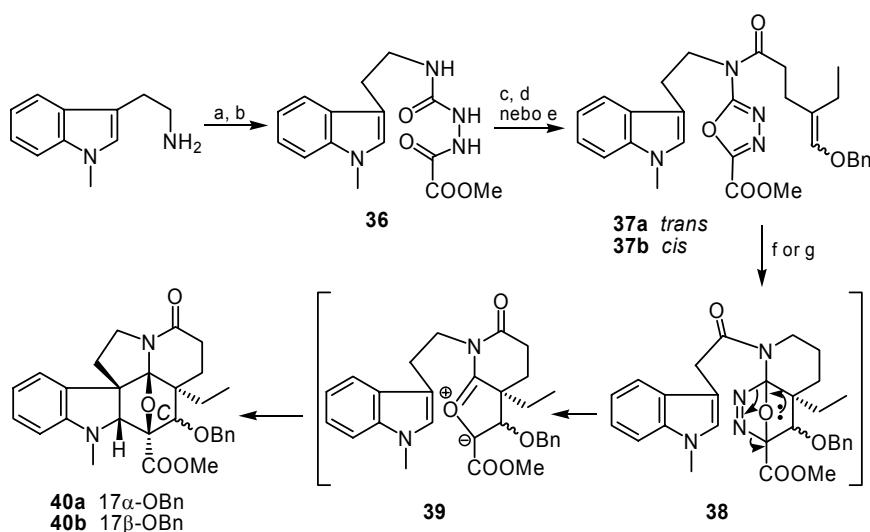
Intramolekulární cykloadice byla rovněž využita v Rawalově totální syntéze (±)-strychninu³⁶, jejíž strategie

se již předtím osvědčila v syntéze (±)-dehydro-tubifolidinu³⁷. Dienofil **30** byl připraven Lewisovsky katalyzovanou isomerizací iminu cyklopropankarbaldehydu **29** (96 %), Schéma 5. Odvozený anilin **31** kondenzoval se substituovaným krotonaldehydem za vzniku iminu, konvertovaného v dienamid **32**. Ten cykloadoval v termicky iniciované reakci výhradně v *exo*-transním stavu **33**, v němž byly minimalizovány ne vazebné interakce, a poskytl cykloadukt **34** jako jediný stereoisomer ve výtěžku 99%! V Bodwellově formální syntéze (±)-strychninu je klíčovým krokem *transanulární varianta* (R^{38}) s inverzními elektronovými nároky³⁹; pro další syntézy strychninu viz⁴⁰. V syntéze (+)-aloperinu⁴¹ byly dien a dienofil spojeny přes křemík (a [4+2]-cykloadice tak byla intramolekulární), v syntéze planárního aglykonu rubrolonu byla cykloadice použita opakovaně⁴².

V syntéze alkaloidů se uplatňují dieny maskované jako sulfony⁴³, jejichž prekurzory mohou být benzocyklobutany⁴⁴. Obecná metoda syntézy nejen indolových alkaloidů je založena na *in situ* generovaných *o*-chinoxidimethanech (R^{45}).

Pestrou škálu heteradienů a heteradienofilů ($R^{46,47}$) zde zastupuje alespoň totální syntéza (±)-fasikularinu⁴⁸ a (±)-lepadiforminu⁴⁹, v níž vystupuje acylnitrososkupina jako dienofil v intramolekulární cykloadici. I nitroolefiny ochotně cykloadují⁵⁰; pro aplikaci kaskády s dipolární adicí v syntéze (–)-mesembrinu viz⁵¹.

Bogerův efektivní přístup k syntéze vysoce oxygenovaných alkaloidů vindolinu a vindorosinu je založen na dominové intramolekulární cykloadici⁵² 1,3,4-oxadiazolů **37**, Schéma 6. Termicky iniciovaný proces je zahájen [4+2]-cykloadicí, přičemž primární cykloadukt **38** ztrácí molekulu dusíku *retro*-Dielsouvo-Alderovou reakcí. Generovaný ylid **39** podléhá následně *endo*-[3+2]-adici na indol (dipolarofil) a poskytuje hexacyklický produkt **40** jako výhradní stereoisomer (72–79 %). Během této sekvence

Schéma 6. Přístup k syntéze (\pm)-vindorosinu

Činidla a podmínky: **a)** $(\text{Im})_2\text{CO}$, CH_2Cl_2 , THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ přes noc (75 %); **b)** $\text{NH}_2\text{NHCOOMe}$, AcOH, THF, 40°C 16 h (65 %); **c)** TsCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , rt 16 h (65 %); **d)** (*E*)-5-benzyloxy-4-ethyl-pent-4-enová kyselina, EDCI, CH_2Cl_2 , 0°C 5 min, potom DMAP, rt 5 h (37a 75 %); **e)** (*Z*)-5-benzyloxy-4-ethyl-pent-4-enová kyselina, EDCI, DMAP, CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$ 3 d (37b 69 %); **f)** 37a, 1,2-dichlorbenzen, rfl 24 h (40a 79 %); **g)** 37b, 1,3,5-triisopropylbenzen, 230°C 32 h (40b 69 %)

jsou vytvořeny 3 (4) kruhy, přičemž relativní konfigurace všech šesti (!) chirálních center na centrálním kruhu C je cíleně řízena.

Zmíněná dipolární [3+2]-adice se vyvinula v jednu z nejvýznamnějších metod syntézy alkaloidů (R^{53}). Cykloadice nejčastěji užívaných nitronů byla aplikována např. v syntéze izidinových alkaloidů⁵⁴, (\pm)-kokainu⁵⁵ a (\pm)-porantheridinu⁵⁶. Dnes již klasičkou aplikací nitronů představuje Oppolzerova syntéza (+)-lucidulinu (**44**)⁵⁷, Schéma 7. V ní byl hydroxylamin **41**, odvozený od (+)-(*R*)-pulegonu, konvertován v nitron **42**, který reagoval přednostně v konformaci **42a**, a poskytl tetracyklický cykloadukt **43a** v 87% výtěžku.

Využití dipolárních adicí v syntéze spirocyklických

alkaloidů ilustruje⁵⁸ totální syntéza (–)-histrionikotoxinu (**50**), Schéma 8. Opticky aktivní hydroxylamin **45b** poskytl adici na trojnou vazbu nitron **46**. Následující ochrana [3+2]-adici styrenu umožnila výstavbu akrylonitrilu **47** (85 % ze **45b**). Termolýzou byl regenerován nitron, který reagoval výhradně v konformaci **48a** a poskytl stereoselektivně produkt **49a** v 82% výtěžku. Poznamejme, že v případech, kdy dipolarofil není substituován EW (elektrony odtahující)-skupinou, jsou výhradními produkty isomerní isoxazolidiny typu **49b**. Nitron **46** ($\text{CN} \rightarrow \text{C}\equiv\text{C-TMS}$) poskytl přes **48b** 83 % odpovídajícího **49b**, jenž nebyl termicky ekvilibrovatelný⁵⁹ na skelet **49a**; aplikace např. v syntéze isomeru lepadiforminu⁶⁰.

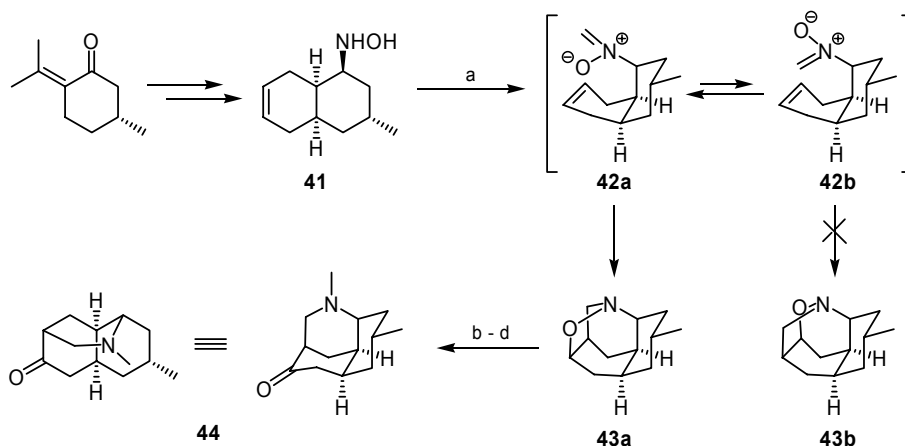


Schéma 7. Syntéza (+)-lucidulinu

Činidla a podmínky: **a)** $(\text{CH}_2\text{O})_n$, 4 Å MS, PhMe, 115°C 4 h (87 %); **b)** MeOSO_2F , Et_2O , 0°C 30 min (96 %); **c)** LiAlH_4 , THF, 25°C 4,5 h (98 %); **d)** Jonesovo činidlo, Me_2CO , $0^\circ\text{C} \rightarrow 25^\circ\text{C}$ 1 h (99 %; 93 % 3 stupně)

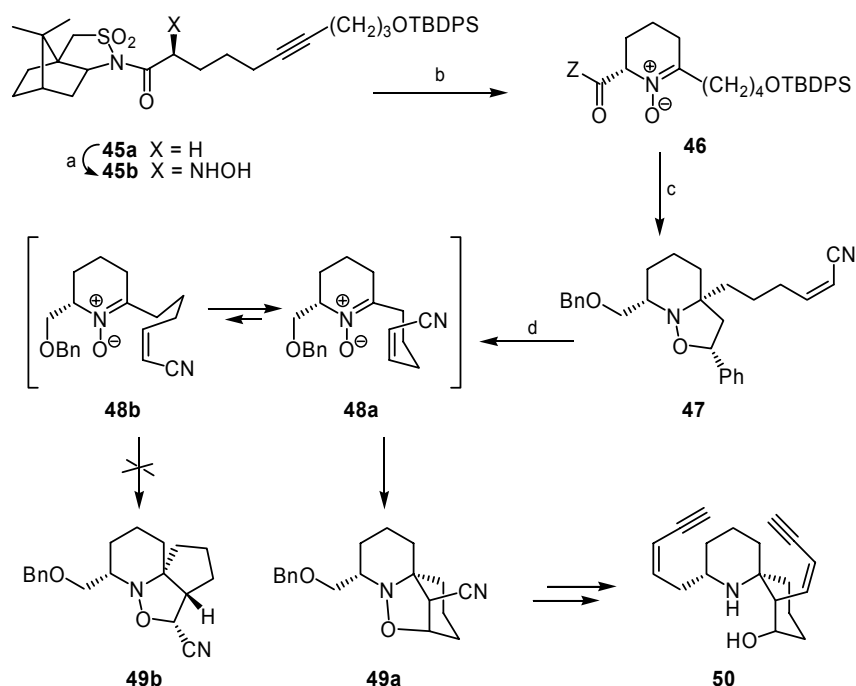
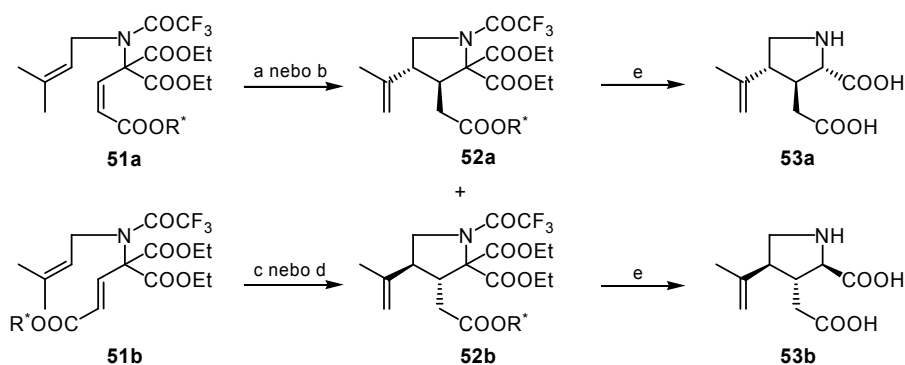


Schéma 8. Syntéza (-)-histrionikotoxinu

Činidla a podmínky: **a)** NaHMDS, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1,25 h, potom 1-chlor-1-nitrosocyklohexan, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 0,5 h, potom 2N HCl, $\rightarrow 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h (70 %); **b)** PhMe, $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 h; **c)** Styren (bez rozp.), $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6 h (85 % 2 stupně); potom modifikace řetězce; **d)** PhMe (zátav. zkumavka), $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3,5 h (82 %)

Schéma 9. Syntéza (+)- a (-)- α -alkaloidické kyseliny

Činidla a podmínky: **a)** PhMe, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 80 h, nebo bez rozpouštědla, $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min (**52**:*cis*-isomer 4:1, **52a**:**52b** 1:1); **b)** Me_2AlCl , hexan, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow -35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 18 h (**52** (60 %):*cis*-isomer 100:0, **52a**:**52b** 95:5); **c)** bez rozpouštědla, $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min (**52**:*cis*-isomer 1:1, **52a**:**52b** 1:1); **d)** Me_2AlCl , hexan, CH_2Cl_2 , $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 min (**52** (71 %; 81 % brsm):*cis*-isomer >95:<5, **52b**:**52a** 89:11); **e)** 1 N NaOH, EtOH/voda (1:1), $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 h, potom HCl vod., pH $\rightarrow 5$, $110\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 3$, $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**53a** 68 %; **53b** 62 %)

Syntéza (-)-krambescidinu 359 je založena na násobném užití dipolární adice chirálního nitronu⁶¹, opakovaná dipolární adice nitronů byla užita v syntéze isosparteínu⁶² a oligocyklických guanidinových alkaloidů⁶³. Pomocí transanulární adice nitronu byl vybudován spirocyklický systém pinnaové kyseliny⁶⁴.

V syntéze alkaloidů nachází uplatnění pestrá škála dipólů, zahrnující nitriloxidy (např. sekoergolinový alkaloid (+)-paliklavin⁶⁵) a azidy, kterých využil T. Hudlický⁶⁶ v syntéze mnoha pyrrolizidinových alkaloidů. Brilantní

aplikací kaskády reakcí je Padwův (R^{67}) přístup k syntéze vindolinu⁶⁸, v němž byla tvorba dipolu obdobného **39** indukována působením Rh^{2+} na diazolakтам.

Nová reakce (R^{69}) rovněž nachází uplatnění v syntéze alkaloidů. přičemž vedle olefinických enofilů nachází uplatnění i jejich heteroanalogy; příkladem je syntéza (\pm)-krinanu⁷⁰, v níž bylo využito *N*-acylované nitroso skupiny při uzávěru pyrrolidonového kruhu. Ke klasickým aplikacím patří Oppolzerova syntéza (-)- α -kainové⁷¹ a obou enantiomerů α -alkaloidické kyseliny (**53**), jejichž

syntéza⁷² je založena na asymetrické indukci při enové reakci nenasycených esterů s (–)-8-fenylmentolem **51**, přičemž zásadně důležitým se ukázal být způsob iniciace reakce, Schéma 9. Zatímco při termolýze *cis*- i *trans*-esterů **51** byl získán racemický *trans*-pyrrolidin **52**, doprovázený značným množstvím *cis*-isomeru, v přítomnosti dimethylaluminiumchloridu byl průběh zásadně odlišný: *cis*-Ester **51a** poskytl výhradně *trans*-produkt (60 %) s poměrem **52a:52b** 95:5, a nakonec přirozenou (+)- α -allokainovou kyselinu (**53a**), zatímco z *trans*-isomeru **51b** byl za obdobných podmínek, při poměru *trans* (71 %)/*cis* pyrrolidinů > 95 : < 5, získán produkt **52b**, doprovázený větším množstvím enantiomeru **52a** (89:11); ester **52b** byl obdobně transformován v (–)- α -allokainovou kyselinu (**53b**), viz rovněž R⁷³.

3. Aplikace přechodových kovů

Pokrok organické syntézy je nejvýrazněji charakterizován intenzivním rozvojem chemie přechodových kovů a stále širším využíváním chirálních ligandů/katalyzátorů. Reakce katalyzované přechodovými kovy⁷⁴, a zvláště palladiem, se staly nedílnou součástí organické syntézy⁷⁵. Již klasickou metodou se stala katalyzovaná *allylová substituce*, a zvláště její *asymetrická varianta* (R^{76,77}). Z četných aplikací budiž zmíněna syntéza tetraponerinů⁷⁸, toxických složek vosích sekretů, kde bylo metody užito opakovaně, jak ilustruje příklad (+)-tetraponerinu T4 (**61**) a T8 (**62**), Schéma 10. Allylová substituce dikarbonátu **54** 2-nitrobenzensulfonamidem Ns-NHCH₂CH₂CH=CH₂ při –60 až –35 °C v přítomnosti 0,75 % katalyzátoru připraveného z [Pd₂(dba)₃.CHCl₃] a C₂-symetrického ligandu **55** po-

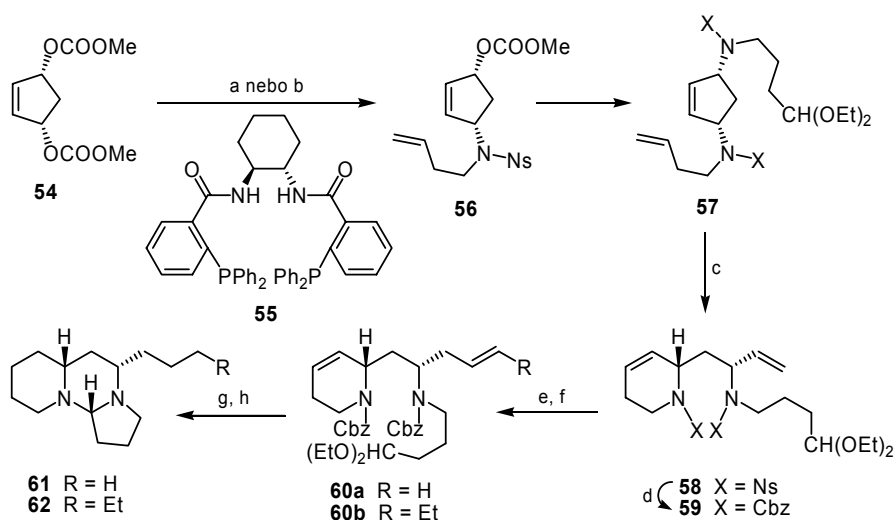


Schéma 10. Syntéza (+)-tetraponerinu T4 a T8

Činidla a podmínky: a) Ns-NHCH₂CH₂CH=CH₂ (1 ekv), Et₃N (2,7 ekv), THF, –60 °C, potom roztok [Pd₂(dba)₃.CHCl₃] (0,75 %) a **55** (3 %) v THF (15 min), –60 °C 1 h → –35 °C (**56** 89 %; 98,5 % ee); b) Ns-NHCH₂CH₂CH=CH₂ (1 ekv), Et₃N (4 ekv), THF, –60 °C, potom roztok [Pd₂(dba)₃.CHCl₃] (1,5 %) a **55** (6 %) v THF (15 min), –60 °C 1 h → –35 °C → rt, potom dppb (6 %), rt 10 min, potom Ns-CH₂CH₂CH₂CH(OEt)₂ (1 ekv), rt 3 h (**57** 79 %); c) [(Cy₃P)₂Ru(=CHPh)Cl₂] (5 %), probublávat CH₂=CH₂, CH₂Cl₂, 35 °C 48 h (79 % + **57** 15 %); d) K₂CO₃, PhSH (2,5 ekv), DMF, 70 °C 30 min → rt, přidat Cbz-Cl (2,5 ekv), rt 10 min (96 %); e) O₂, PdCl₂ (10 mol%), CuCl (0,5 ekv), DMF vod, rt 6 h (76 %); f) CrCl₂, DMF (1 ekv), THF, rt 30 min, potom RCHI₂, potom **59**, rt 30 min (**60a** 65 %; **60b** 80 %); g) H₂, 10% Pd/C, EtOH, rt 8 h; h) 5% HCl vod, rt 12 h (**61** 80 %; **62** 86 %)

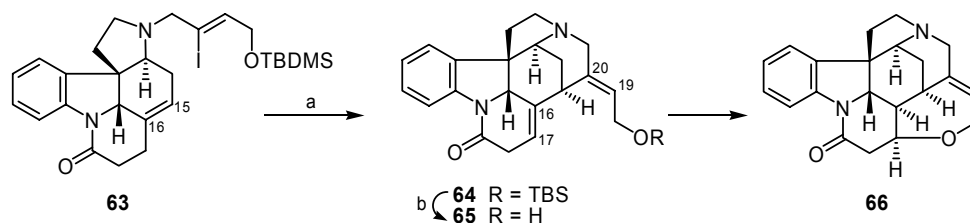


Schéma 11. Dokončení Rawalovy syntézy (±)-strychninu

Činidla a podmínky: a) Pd(OAc)₂ (0,3 ekv.), *n*-Bu₄N⁺ Cl[–], K₂CO₃, DMF, 70 °C 3 h (74 %); b) 2 N HCl, THF (96 %).

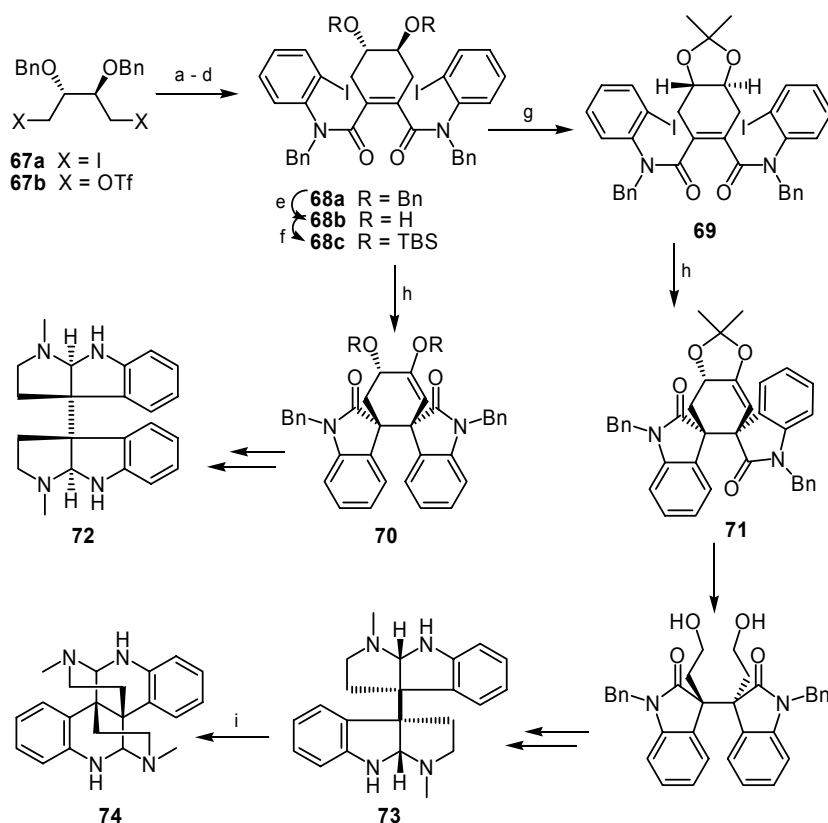


Schéma 12. Syntéza meso- a (-)-chimonanthinu a (+)-kalykanthinu

Činidla a podmínky: **a)** (CH₂COOMe)₂, LDA, **67a**, THF/HMPA (9:1), -78 °C 20 min (46 %); **b)** LDA, THF, -78 °C 10 min, potom I₂ (72 %); **c)** 2-Jodanilin, Me₃Al, PhMe, rt (92 %); **d)** NaH, BnBr, DMF (87 %); **e)** BCl₃, -78 °C (70 %); **f)** TBDMSCl, imidazol, CH₂Cl₂ (86 %); **g)** **68b**, Me₂C(OMe)₂, CSA (80 %); **h)** [PdCl₂(PPh₃)₂] (10 %), Et₃N, DMA, 100 °C (**68c** → **70** 71 %; **69** → **71** 90 %); **i)** AcOH, rfl (60 %)

skytla produkt (-)-**56** v 89% výtěžku s ee 98,5 %. Ukázalo se, že druhou substitucí Ns-CH₂CH₂CH₂CH(OEt)₂ je možno provést „one-pot“ způsobem, za předpokladu, že je směs nejprve ohřata na laboratorní teplotu (rt) a vyměněn ligand za dppb (katalyzátor již nemusí být chirální, desymetrizace provedena v 1. stupni!); (-)-sulfonamid **57** byl získán v celkovém 79% výtěžku. Následující kruhotvorná metatéza (Grubbsův katalyzátor 1. generace), ve skutečnosti kombinace ROM(ring-opening)-RCM(ring-closing), vedla k rovnovážné směsi a získaný (+)-sulfonamid **58** (79 %) byl konvertován v karbamát **59**. Protože homologizace vinylu metatézou selhala pro nereaktivnost, byl tento oxidován dle Wackera na aldehyd (76 %), a potom konvertován nebasicky dle Takaiho (RCHI₂, CrCl₂) v olefin. Získané (+)-alkeny **60** (65–80 %) byly transformovány s uplatněním stereoselektivních Mannichových procesů v (+)-tetraponerin T4 (**61**; 80 %) a (+)-tetraponerin T8 (**62**; 86 %).

Přechodové kovy umožňují uskutečňování elegantních, jinak těžko realizovatelných transformací. Ilustrativním příkladem je aplikace Heckovy reakce v pozdních stupních Rawalovy syntézy³⁶ (±)-strychninu (**66**), Schéma 11. Alkyloci aminu **35** (Schéma 5) 2-jodallylbromidem

získaný vinyljodid **63** (87 %) intramolekulárně cyklizoval v přítomnosti katalytického Pd(OAc)₂ za stereoselektivního uzavření kruhu D a instalace (E)-19,20-dvojně vazby. Neméně významné je současné zavedení 16,17-násobné vazby, které umožnilo, aby získaný produkt **64** (74 %) byl po odchránění (→ **65**, isostrychnin) konvertován v cílovou molekulu s využitím předchozích poznatků Prelogových⁷⁹. Obdobným způsobem budovali kruh D strychninu Stork i další autoři, viz⁴⁰.

Dvojnásobné Heckovy cyklizace využil Overman se spolupracovníky⁸⁰ v syntéze meso- (**72**) a (-)-chimonanthinu (**73**), a (+)-kalykanthinu (**74**), Schéma 12. První Heckova cyklizace vyžaduje inserci tetrasubstituovaného olefinu a generuje kvarterní centrum (R⁸¹); druhou cyklizací je generováno další kvarterní centrum v sousedství prvního. Přitom se ukázalo, že celý proces je možno provádět s vysokou enantioselektivitou a jednoduchým způsobem řídit diastereoselektivitu: Prekurzor **68a**, přístupný z chirálního synthonu **67a**, byl konvertován jednak v bisilyoxyderivát **68c**, jednak v acetamid **69**. Zatímco diiodderivát **68c** cyklizoval za podmínek Heckovy reakce (10 % [PdCl₂(PPh₃)₂]) za výhradního vzniku bis-spirocyklu **70** (71 %), analogická reakce **69** poskytla diastereoisomerní

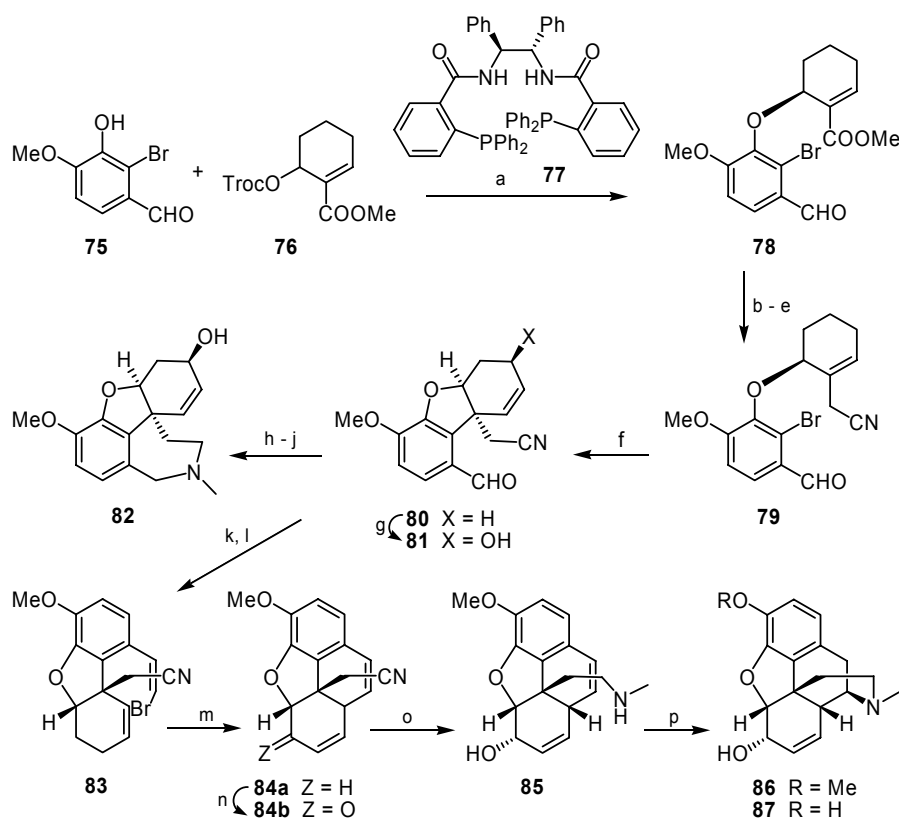


Schéma 13. Syntéza (-)-galantaminu a (-)-morfinu

Činidla a podmínky: **a**) **77** (3 %), $[\eta^3\text{-C}_3\text{H}_3\text{PdCl}]_2$ (1 %), Et_3N , CH_2Cl_2 , rt (72 %, 87–88% ee); **b**) TsOH (5 %), $\text{CH}(\text{OMe})_3$, MeOH ; **c**) Dibal-H , PhMe , -78°C (85 % 2 stupně); **d**) Ph_3P , $\text{Me}_2\text{C}(\text{OH})\text{CN}$, DIAD , Et_2O ; **e**) TsOH (20 %), THF vod. (76 % 2 stupně, 96% ee po rekryst.); **f**) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (15 %), dppp (15 %), Ag_2CO_3 (přebytek), PhMe , 107°C 24 h (**80** 91 %); **g**) SeO_2 , NaH_2PO_4 , dioxan, 150°C 3 h (57 %, 64 % brsm, dr 10:1); **h**) MeNH_2 , MeOH ; **i**) Dibal-H (4 ekv.), potom NaH_2PO_4 vod; **j**) NaBH_2CN (62 % **79** + 6 % isomer); **k**) **80**, CBr_4 , Ph_3P , CH_2Cl_2 , 0°C 10 min (91 %); **l**) $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ (5 %), Bu_3SnH , PhMe (88 %); **m**) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (15 %), dppp (15 %), Ag_2CO_3 (přebytek), PhMe , 107°C 4 h (**84a** 65 %, 74 % brsm); **n**) SeO_2 1 ekv.), křemenný písek, dioxan, 75°C 40 min, potom SeO_2 1 ekv.), 75°C 40 min, potom DMP , CH_2Cl_2 , rt 3 h (58 %); **o**) Dibal-H , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ (1:1), -78°C 2 h \rightarrow 0°C 1 h, potom NH_4Br , MeNH_2 , MeOH , \rightarrow rt 2 h, potom NaBH_4 , 0°C \rightarrow rt přes noc (89 %); **p**) $n\text{-BuLi}$, $i\text{-Pr}_2\text{NH}/\text{THF}$ (1:5), -78°C \rightarrow rt, potom $h\nu$, rt 6 h (57 %)

sloučeninu **71** jako jediný produkt a v 90% výtěžku. Vysvětlení spočívá v konformaci substrátů, kde u **68c** jsou obě silyloxyskupiny přednostně axiální, zatímco dioxolan fixuje oba substituenty na cyklohexenovém kruhu diekvatoriálně. Sloučeniny **70** a **71** byly konvertovány v *meso*-chimonanthin (**72**), resp. v (-)-chimonanthin (**73**), který byl kysele isomerizován přes indolenin v (+)-kalykanthin (**74**). První dva alkaloidy byly rovněž připraveny⁸² s využitím enantioselektivní dialkylace ditriflátem **67b**, *meso*-chimonanthin (**72**) stereoselektivní reduktivní dialkylací⁸³ s využitím SmI_2 (R^{84}); metodologie byla aplikována rovněž v syntéze příbuzných „trimerních“⁸⁵ ((-)-idiospermulin, (-)-hodgkinsin a (-)-hodgkinsin B) a „tetramerních“ alkaloidů⁸⁶ ((-)-kvadrigemin C a (-)-psycholein).

Efektivitu užití přechodových kovů v syntéze alkaloidů dále demonstruje Trostův přístup k syntéze (-)-galantaminu⁸⁷ (**82**) a (-)-morfinu⁸⁸ (**87**) ze společného intermediátu **80**, Schéma 13. Optická aktivita byla indukována již na počátku syntézy Pd-katalyzovanou allylovou substitucí

karbonátu **76** fenolem **75** v přítomnosti ligandu **77** (72 %, 87–88% ee). Účelem konverze získaného akrylátu **78** na olefin **79** (96% ee) byla eliminace EW-vlivu methoxykarbonylové skupiny na zamýšlenou Heckovu reakci: Při užití katalytického $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ a dppp v přítomnosti přebytku Ag_2CO_3 byl Heckův produkt **80** získán v 91% výtěžku. Jeho allylová oxidace (SeO_2) a uzávěr azepinového kruhu v kyanaldehydu **81** „one-pot“ způsobem (62 %) dokončily 8-stupňovou syntézu (-)-**82** v celkovém výtěžku 14,8 % (poznámejme, že recentní, pro velkotonážní výrobu adaptovaná syntéza (-)-**82** je založena na biomimetickém oxidativním kaplinku fenolů⁸⁹).

Při syntéze morfinu⁸⁸ (Schéma 13) byl benzaldehyd **80** konvertován v *cis*-bromstyren **83** (91 %), který intramolekulární Heckovou vinylicí poskytl diolefin **84a** (64 %), přednostně oxidovaný SeO_2 (a potom DMP) za vzniku enonu **84b** (58 %). Zbývající kruh byl uzavřen ozařováním (jednoelektronový přenos) odvozeného sekundárního aminu **85** v přítomnosti silné base ($n\text{-BuLi}$ nebo

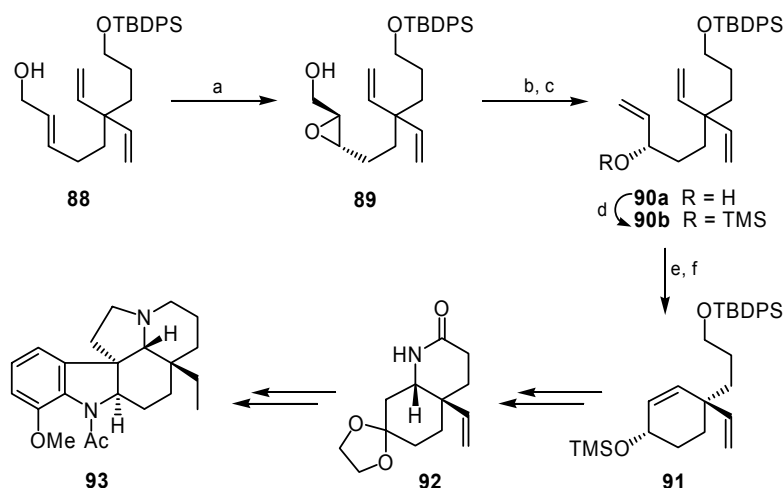


Schéma 14. Asymetrická kruhotvorná metatéza v syntéze (-)-aspidosperminu

Činidla a podmínky: a) (+)-DIPT, $\text{Ti}(\text{Oi-Pr})_4$, TBHP, 4 Å MS, CH_2Cl_2 , $-25\text{ }^\circ\text{C}$ 24 h (92%); b) I_2 , Ph_3P , imidazol, PhH, rt 35 min (95%); c) Zn, AcOH, $50\text{ }^\circ\text{C}$ 30 min (96%); d) TMSCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , rt 30 min (98%); e) Grubbsův katalyzátor 1. generace (0,1 eq), CH_2Cl_2 , rt 48 h; f) 1% HCl vod./THF (1:3), rt 30 min (87%, 2 stupně)

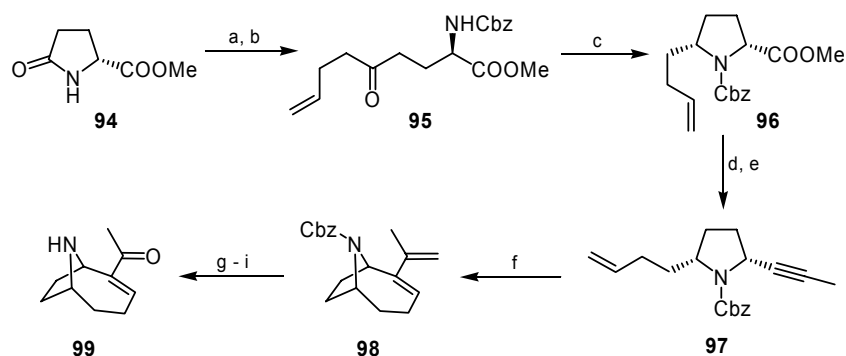


Schéma 15. Enantioselektivní syntéza (+)-anatoxinu A

Činidla a podmínky: a) LiHMDS, CbzCl, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h \rightarrow rt 1 h (kvant.); b) $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{MgBr}$, TMEDA, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h \rightarrow $0\text{ }^\circ\text{C}$ 1 h (73 %); c) $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$, Ph_3SiH , CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h \rightarrow rt 1 h (99 %); d) Dibal-H, PhMe, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h, potom $\text{MeCOC}(\text{N}_2)\text{P}(\text{O})(\text{OMe})_2$, Cs_2CO_3 , BnOH, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h \rightarrow rt 1 h (62 %, one-pot); e) NaHMDS, MeOTf, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h \rightarrow rt 1 h (97 %); f) Grubbsův katalyzátor 2. generace (0,1 eq), CH_2Cl_2 , rt 48 h (87 %); g) OsO_4 , Et_3N , THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h \rightarrow rt 1 h, potom NaHSO_3 vod., zahřívát (76 %); h) NaIO_4 , THF vod., rt (95 %); i) TMSI, MeCN, $-10\text{ }^\circ\text{C}$ 2 h (99 %)

LDA); vznikl (-)-kodein (**86**) v 57% výtěžku.

Kruhotvorným stupněm v syntéze 2,3,6-trisubstituovaného piperidinového alkaloidu (-)-kassinu⁹⁰ je cyklizace allylalkoholu katalyzovaná PdCl_2 ; arenchromový komplex byl využit v syntéze axiálně-centrálně chirálního 1-naftyltetrahydroisochinolinového alkaloidu (-)-korupensaminu A⁹¹ (pro jiné přístupy k metabolitům tohoto typu viz⁹²). Výstavba spirocyklického systému ve formální syntéze (\pm)-perhydrohistriónikotoxinu⁹³ je iniciována *ipso*-adicií benzylaminu na výrazně elektrofilní komplex železa.

Kruhotvorná metatéza (ring-closing metathesis, RCM; R⁹⁴) se stala významnou metodou konstrukce nenasycených cyklů (viz již předchozí kapitola). Bylo jí užito např. v syntéze (+)-(*R*)-muskopyridinu⁹⁵ a (\pm)-dihydro-

korynantheolu⁹⁶, metatetická transformace 1-(allylamino)-cyklohex-2-enu na 3-pyrrolin (až 98% výtěžek) je klíčovým krokem v syntéze (-)-swainsoninu⁹⁷. Vysoce diastereoselektivní kruhotvorné metatézy bylo využito japonskými autory⁹⁸ v enantioselektivní syntéze (-)-aspidosperminu (**93**), Schéma 14. Sharplessova epoxidace allylového alkoholu **88** poskytla oxiran **89** (92 %), který byl konvertován v alkohol **90a** (91 %). Protože výsledky v následujícím stupni s alkoholem **90a** byly problematické, tento byl silylován (\rightarrow **90b**) před klíčovou kruhotvornou metatézou. Grubbsův rutheniový komplex 1. generace indukoval kvantitativní a vysoce diastereoselektivní tvorbu (87:13) cyklohexenového kruhu. Cyklohexen **91** (87%!) byl transformován v laktam **92** s využitím vysoce diastereoselektiv-

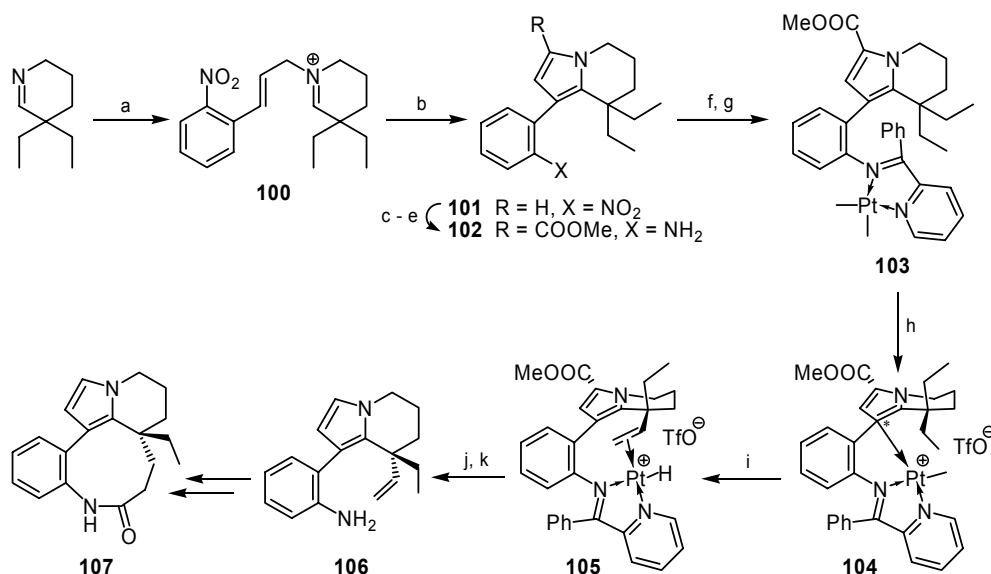


Schéma 16. Syntéza (±)-rhazinilamu s využitím aktivace C-H vazby

Činidla a podmínky: **a**) 2-nitrocinnamylbromid, DMF, 80 °C 15 min (90 %); **b**) Ag₂CO₃ (2 ekv.), PhMe nebo xyleny, rfl 45 min (65–70 %/1 až 5 mmol; 51 %/22 mmol); **c**) Cl₃CCOCl; **d**) NaOMe, MeOH; **e**) H₂ (1 atm), Pd/C (88 % 3 stupně); **f**) 2-(PhCO)C₅H₄N (1,5 ekv.), TsOH (kat.), PhMe, rfl 30 h (83 %); **g**) [PtMe₂(μ-SMe₂)₂] (0,5 ekv.), PhMe, rt 18 h (88 %); **h**) TfOH, CH₂Cl₂, –40 °C 15 min; **i**) F₃CCH₂OH, 70 °C 72 h (90 % dle NMR); **j**) KCN, CH₂Cl₂, voda, rt 30 h; **k**) HONH₂.HCl, NaOAc, MeOH, rt 30 min (60 % z **103**)

ni Michaelovy adice (72 %), a posléze v (–)-**93** Fischero-
vou indolizací.

Rovněž enyny se uplatňují v kruhotvorné metatézě; produkt si potom zachová všechny uhlíky výchozí látky, čehož je možno využít v syntetickém plánu, jak ukazuje např. syntéza alkaloidu (+)-anatoxinu A (**99**) z D-methylpyroglutamátu (**94**) v celkovém 27% výtěžku⁹⁹, Schéma 15. Cyklizace/redukce ketonu **95** trifenylsilanem v přítomnosti BF₃.OEt₂ vedla k *cis*-2,5-disubstituovanému pyrrolidinu **96** s vysokou diastereoselektivitou (11:1) a v 99% výtěžku. Odvozený enyn **97** poskytl působením Grubbsova komplexu 2. generace produkt se skeletem anatoxinu **98** (87 %), jehož propen-2-yllová skupina byla posléze konvertována v acetyl cílového alkaloidu. Variace postupu s využitím Wackerovy oxidace byla užita v syntéze strukturně příbuzného (+)-ferrugininu¹⁰⁰.

V závěru této kapitoly není možno nezmínit Johnsonovu a Samešovu syntézu racemického rhazinilamu (**107**)¹⁰¹, spíše významného artefaktu než přirozeného indolového alkaloidu, která je založena na aktivaci vazby C-H neaktivované alkylové skupiny, problému, který dosud v organické syntéze nebyl uspokojivě vyřešen (R¹⁰²), Schéma 16. V tomto případě byl aktivující komplex vystaven na anilinovém dusíku, který byl posléze zabudován do molekuly cílové sloučeniny. Iminiová sůl **100** byla cyklizována/aromatizována působením uhličitánu stříbrného, a získaný pyrrol **101** (51–70 %) byl po stabilizaci methoxykarbonylovou skupinou konvertován v anilin **102** (88 %). Jeho kondenzací s fenyl(2-pyridyl)ketonem získaný imin poskytl interakci s platinovým komplexem [PtMe₂(μ-SMe₂)₂] komplex **103** (73 %), transformovaný

působením kyseliny trifluormethansulfonové za ztráty methanu v sůl **104**. V ní existuje dativní vazba mezi platínou a pyrrolovým uhlíkem C*, který tak má spíše sp³ charakter. Při následující termolýze došlo, za současné ztráty dalšího methanu, k aktivaci jedné (vhodně prostorově orientované) ethylové skupiny doprovázené β-eliminací hydridu za vzniku hydridového komplexu **105** (90 % z **94**). Z něj uvolněný anilin **106** (celkem 60 % z **103**) byl transformován konvenčními prostředky v (±)-**107**. Později autoři zveřejnili enantioselektivní variantu procesu, v níž (–)-rhazinilam (**107**) byl syntetizován s využitím chirálních platinových komplexů typu **103** odvozených od opticky aktivních výchozích ketonů¹⁰³.

Z těžce laboratoře pochází elegantní syntéza modelového tetraacyklu k alkaloidu teleocidinu B-4¹⁰⁴, která je založena na opakované aktivaci methylů *terc*-butylové skupiny v Schiffově basi, připravené z 2-*t*-butyl-5-methoxyanilinu, prostřednictvím tvorby palladacyklů působením chloridu palladnatého.

4. Další metody

Vymezení dusíku do uhlíkatého skeletu představuje užitečnou metodu tvorby dusíkatých heterocyklů (R¹⁰⁵), která je zde ilustrována enantioselektivní syntézou¹⁰⁶ méně rozšířeného (+)-enantiomeru sparteinu (**117**), Schéma 17. C₂-symetrický (+)-diketon **108**, přístupný z norbornadienu s využitím asymetrické bis-hydrosilylace, byl přes enon **109** konvertován v azidoketon **110**, který intramolekulární *Schmidtovou reakcí* (R¹⁰⁷) iniciovanou chloridem titaniči-

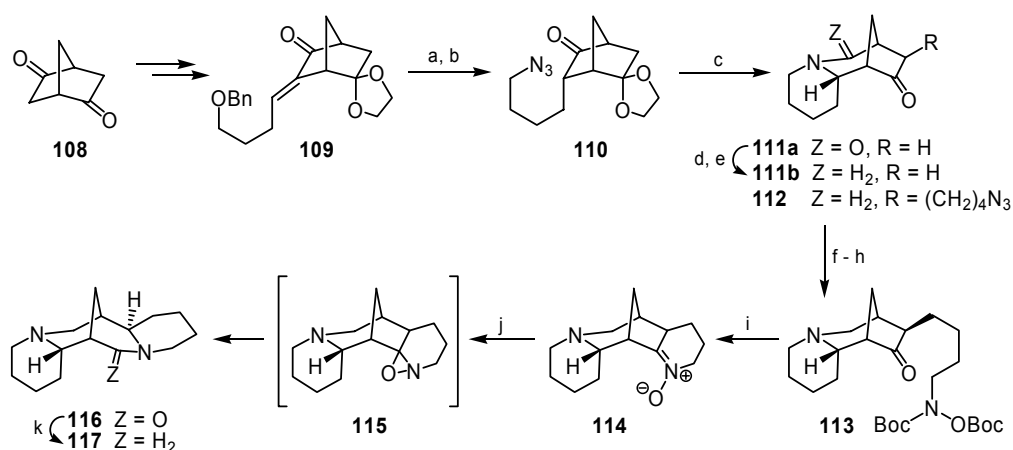


Schéma 17. Syntéza (+)-sparteinu

Činidla a podmínky: **a**) H₂, Pd/C, Pd(OH)₂; **b**) Zn(N₃)₂·2py, DEAD, Ph₃P (78 % 2 stupně); **c**) TiCl₄ (62 %); **d**) Lawessonovo činidlo; **e**) Raneyův nikl; **f**) **111b**, I(CH₂)₄Cl, LDA; **g**) NaI, Me₂CO (76 % 4 stupně); **h**) Boc-NH-OBoc, K₂CO₃, DMF (95 %); **i**) TFA, 4 Å MS, potom NaHCO₃ (74–98 %); **j**) *hν* (254 nm), PhH (76 %); **k**) LiAlH₄, THF, rfl (95 %)

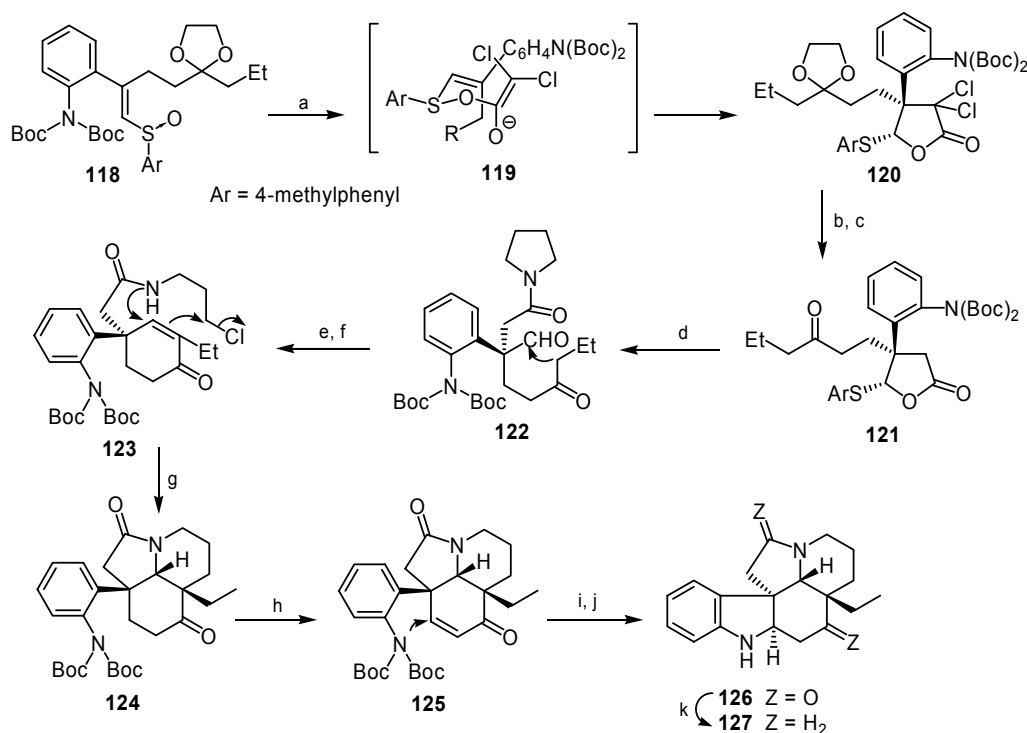


Schéma 18. Syntéza (+)-aspidospermidinu

Činidla a podmínky: **a**) Zn(Cu) (20 ekv.), Cl₃C·COCl, THF, –40 °C 15 min (78 %); **b**) *n*-Bu₃SnH (2,3 ekv.), Et₃B (0,3 ekv.), PhH, 78 °C 15 h (92 %); **c**) TsOH (kat.), Me₂CO, rt přes noc (96 %); **d**) Pyrrolidin, PhH, rt 12 h (86 %); **e**) Pyrrolidin, *i*-PrOH, 33% AcOH vod., rt 24 h; **f**) *i*-BuOCOCl, Et₃N, THF, 0 °C 5 min, potom ClCH₂CH₂CH₂NH₂·HCl, Et₃N, DMF, 0 °C → rt 30 min (61 %, 2 stupně); **g**) NaH, DMF, 0 °C 1 h (86 %); **h**) KHMDS (2,2 ekv.), THF, –78 °C 1 h, potom TMSCl, –78 °C 1 h, potom odpařit; potom O₂, Pd(OAc)₂, DMSO, 70–75 °C 16 h (80 %); **i**) 3 M-HCl vod./*i*-PrOH (1:1), rfl 40 min (96 %); **j**) N₂H₄·H₂O, Na, HOCH₂CH₂OH, 160 °C 1 h → 190 °C 1 h → 210 °C 3 h (75 %); **k**) LiAlH₄, THF, rfl 3 h (90 %)

tým poskytl laktam **111a** v 62% výtěžku. Protože analogický uzavěr kruhu v azidoketonu **112** selhal, pravděpodobně v důsledku přednostní komplexace Lewisovy kysel-

liny basickým dusíkem, byla base **111b** transformována v chráněný hydroxylamin **113**; cyklokondenzující po odchránění za vzniku nitronu **114**. Ten podlehl při ozáření

Beckmannovu přesmyku, a poskytl přes oxaziridin **115** očekávaný laktam **116** v 76% výtěžku. Schmidtova reakce našla uplatnění i při konstrukci skeletu indolizínového alkaloidu 251F¹⁰⁸ a (+)-aspidospermidinu¹⁰⁹. Vysoké regio-selektivity Beckmannova přesmyku *O*-sulfonátů oximů, iniciovaného organolithnými činidly, bylo využito např. v syntéze pumiliotoxinu C¹¹⁰ a muskopyridinu¹¹¹.

Vmezeření aminoalkylu do existujícího kruhu (aktivované ketony, laktamy) je užitečná metoda syntézy alkaloidů se středními a velkými kruhy (R¹¹²); za jistých podmínek se proces může opakovat (zipová reakce). Postup našel uplatnění např. v syntéze C₂-symetrického (–)-homalinu¹¹³, celacinninu¹¹⁴ a dalších alkaloidů¹¹⁵. Pomocí příbuzného procesu, tzv. zkřížené (criss-cross) anelace, byl konstruován skelet indolizidinových alkaloidů¹¹⁶.

S přesmyky se již čtenář mohl setkat v článku věnovaném Mannichově a příbuzným reakcím¹. Claisenův přesmyk (R¹¹⁷) hrál klíčovou roli ve stereoselektivní syntéze pyrrolizidinového alkaloidu turneforcidinu z pyrrolidin-3-onu¹¹⁸. V syntéze (+)-aspidospermidinu (**127**) využil¹¹⁹ Marino se spolupracovníky transferu chiraloty ze síry na uhlík během [3,3]-sigmatropního přesmyku k výstavbě laktonu **120**, Schéma 18. Reakcí (*E,R*_S)-alkenylsulfoxidu **118** s trichloroacetylchloridem a slitinou Zn/Cu byl při –45 °C získán, přes transitní stav **119**, dichlorlaktan **120** jako jediný stereoisomer (78 %). Odvozený laktan **121** poskytl

působením pyrrolidinu dioxosloučeninu **122**, která aldolisovala za vzniku enonu a byla konvertována v **123**. V následující výstavbě pentacyklického skeletu byla opakovaně použita vysoce stereoselektivní Michaelova adice: Nejprve byl basicky indukovaná tandemovou adicí/alkylací připraven lilolidindion **124** (86 %), který, po konverzi v enon **125**, podlehl kysele iniciované Michaelově adici za vzniku 5,16-dioxoaspidospermidinu (**126**) v 96% výtěžku; přesmyk se uplatnil i v syntéze (–)-fysostigminu¹²⁰.

Již zmíněná *Michaelova adice* je široce využívána v syntéze alkaloidů (R¹²¹). Kombinace asymetrické *Birchovy redukce* (R¹²²) a alkylace *in situ* představuje efektivní cestu k chirálním cyklohexenonům¹²³, jejichž Michaelova adice se uplatnila např. v syntéze indolových alkaloidů aspidoermanového¹²³ a eburnanového typu^{123,124}. Elegantní syntéza tropinonu (58 %) je založena na oxidaci cykloheptanolu na cykloheptadienon pomocí IBX (4 ekv.) a následně tandemové Michaelově adici methylaminu¹²⁵; srovnej s cit.¹²⁶.

Enantioselektivní syntéza (–)-cylindricinu C (**134**) Molandera a Ronna¹²⁷ je pěkným příkladem využití dominové intramolekulární Michaelovy adice *N*-nukleofilu v syntéze alkaloidů, Schéma 19. Vinyltriflát **128** byl podroben Stilleho karbonylativnímu kaplinku (Pd kat.) a získaný dienon **129** (79 %) byl nejprve konvertován

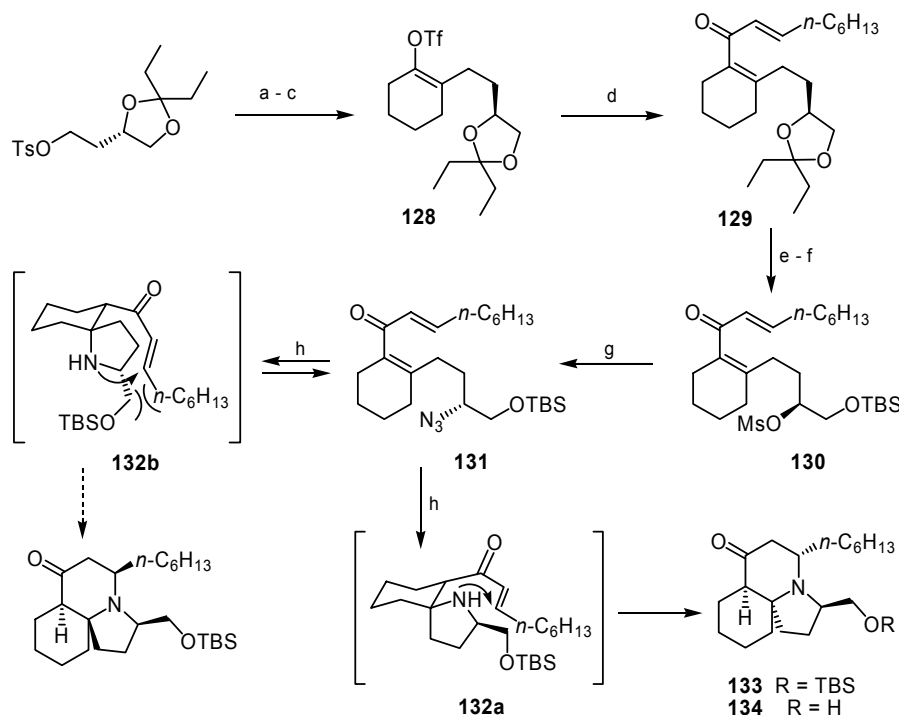


Schéma 19. Syntéza (–)-cylindricinu C

Činidla a podmínky: **a)** Dimethylhydrazon cyklohexanonu, LDA, THF, 0 °C 1 h, potom tosylát, 3 h, potom Cu(OAc)₂, THF vod., 1 h (77 %); **b)** *i*-Pr₂NMgBr, Et₂O, 15 min, potom TMSCl (3 ekv.), Et₃N (3,3 ekv.), HMPA (0,5 ekv.), 20 h; **c)** MeLi, THF, Et₂O, 0 °C 30 min, potom PhNTf₂, TMEDA, 0 °C 30 min (86 % 2 stupně); **d)** Trimethyl-(1-(*E*)-oktenyl)stannan, [Pd(PPh₃)₄] (5,5 mol%), LiCl (2,5 ekv.), CO (g), THF, rt 55 °C 48 h (79 %); **e)** [PdCl₂(MeCN)₂] (5 mol%), MeCN vod. (9:1), rt 20 h (83 %); **f)** TBDMSCl, Et₃N, DMAP (kat.), CH₂Cl₂, rt 6 h, potom MsCl, Et₃N, rt 3 h (kvant.); **g)** NaN₃, DMSO, 60 °C 20 h (86 %); **h)** CrCl₂ (15,5 ekv.), THF, rt 1 h (45 %)

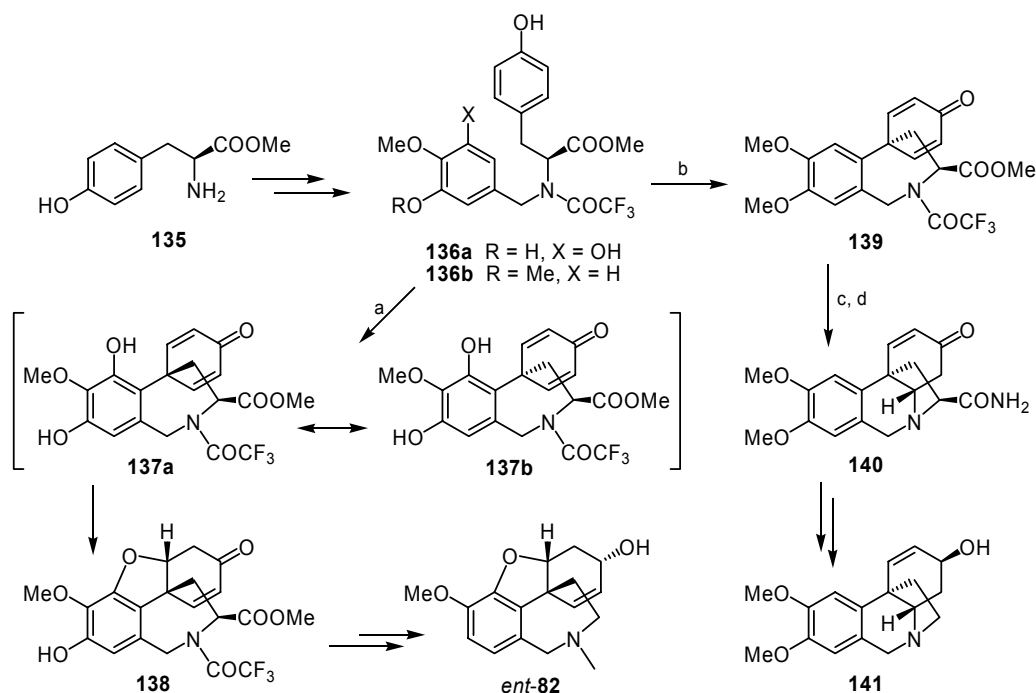


Schéma 20. Oxidativní kaplink fenolů v biomimetické syntéze amarylkovitých alkaloidů

Činidla a podmínky: a) $[\text{Mn}(\text{acac})_3]$ (4 ekv.), MeCN, rft 2,5 h (49 %); b) $\text{Ti}(\text{OCOFCF}_3)_3$ (3 ekv.), TFA, MeCN (0,001 M), -23°C 3 h \rightarrow 25°C 21 h (66,5 %); c) NH_3 (g), MeOH, 0°C 6 h (78,5 %); d) NaOH, MeOH vod., 0°C \rightarrow rt 2,5 h (40,5 %)

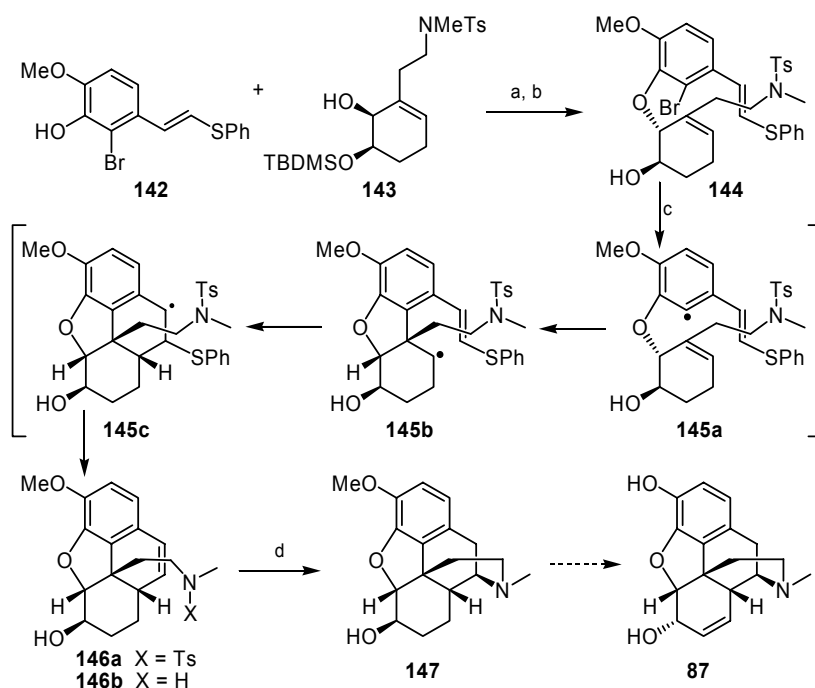
v diol působením Pd^{2+} (83 %), a přes odvozený mesylát **130** nakonec v (+)-azid **131** (86 % celkem). Při redukci azidu se nejvíce osvědčil CrCl_2 ; získaný amin podlehl okamžitě, v principu reverzibilní, Michaelově adici za vzniku spirocyklických intermediátů **132**. Protože druhé Michaelově adici v **132b** brání velké sterické interakce, je výhradním produktem tricyklický keton **133**, z něhož je připraven (–)-cylindricin C (**134**) v celkovém 45% výtěžku z azidu **131**. V klíčovém stupni tak byly vytvořeny dva kruhy a indukována žádaná konfigurace tří vznikajících chirálních center.

Tandemová Michaelova adice amoniaku byla kruhovitým procesem v alternativní syntéze racemických cylindricinů¹²⁸. Pomocí obdobného procesu s guanidinem byl vybudován pentacyklický skelet ptilykalinu A¹²⁹; viz rovněž R^{130} o přírodních guanidinech. Dosud neefektivnější Riceův¹³¹ přístup k totální syntéze morfinu (R^{132}) je založen na kyselé katalyzované intramolekulární adici arylu na 3-cyklohexen-1-on generovaný Birchovou redukcí (Greweho cyklizace); nejedná se tedy o Michaelovu adici na isomerní konjugovaný keton.

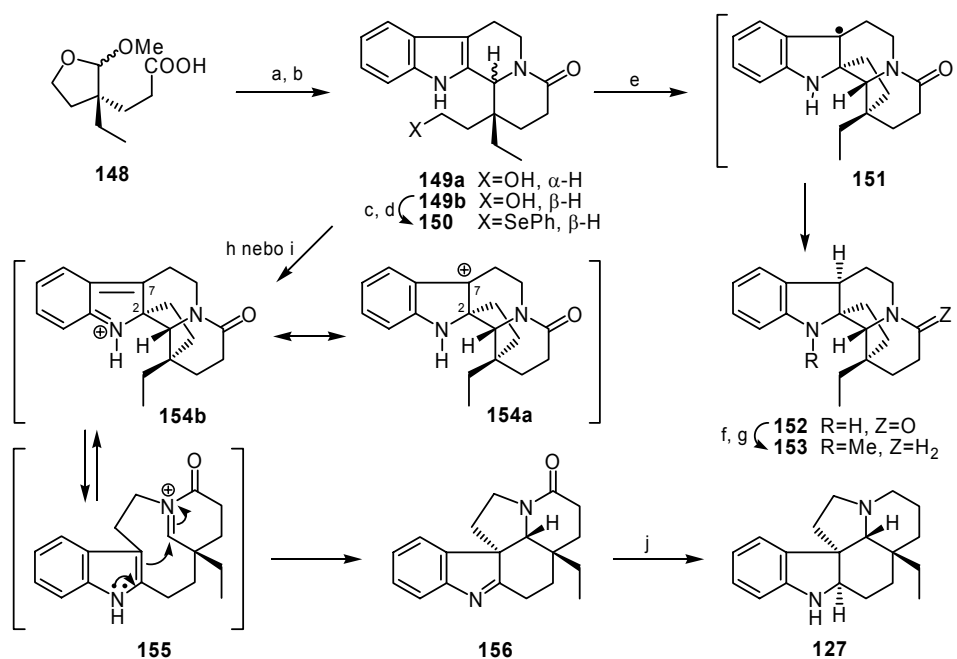
Biomimetický přístup k syntéze amarylkovitých alkaloidů (R^{133}) (+)-maritidinu (**141**)¹³⁴ a nepřírodního (+)-galantaminu (ent-**82**)¹³⁵ z L-tyrosinu (**135**) je založen na kaskádě již zmíněného oxidativního kaplinku fenolů norbelladinového typu (R^{136}) a následné Michaelově adici *N*-, resp. *O*-nukleofilu, Schéma 20. *p,o'*-Kaplínek v bis-

fenolu **136a** indukovaný $[\text{Mn}(\text{acac})_3]$ vedl k tvorbě dienu **137**, který podlehl spontánní Michaelově adici výhradně přes **137a** za vzniku enonu **138** ve výtěžku 49 %. Naproti tomu *p,p'*-kaplínek v monofenolu **136b** pomocí $\text{Ti}(\text{OCOFCF}_3)_3$ byl generován dienon **139** (až 66,5 %), z něhož byl po ochránění dusíku stereoselektivní Michaelovou adicí získán enon **140** (40,5 %). Pověšněte si rozdílného stereochemického výsledku heteroadicí ve **137** a **139** ($\text{N-COFCF}_3 \rightarrow \text{NH}$), který je důsledkem asymetrické indukce přítomným chirálním centrem (sterické vlivy). Poznamenejme, že regioselektivitu kaplinku fenolů je možno ovlivnit tvorbou palladiového komplexu norbelladinového intermediátu, jak dokumentuje syntéza (\pm)-narwedinu¹³⁷; srovnej s cit.⁸⁹, v níž byla nežádoucí poloha před kaplínekem blokována bromem.

Radikálové procesy nabývají na významu v totálních syntézách¹³⁸. Ilustrací zde uvedenou je tandemová radikálová cyklizace užitá ve formální totální syntéze (\pm)-morfinu (**78**)¹³⁹, Schéma 21. Bromid **144** byl připraven z fenolu **142** a alkoholu (\pm)-**143** Mitsunobuho (R^{140}) reakcí (83 %; opticky aktivní **143** je dostupný chemoenzymaticky (R^{141}) z fenethylbromidu ve 4 stupních). Radikálový proces byl iniciován $\text{Bu}_3\text{SnH/AIBN}$; radikálová kaskádová cyklizace (**145a** \rightarrow **145b** \rightarrow **145c**) byla zakončena eliminací a tetracyklický sulfonamid **146a** byl izolován v 35% výtěžku. Následující adice na styrenovou dvojnou vazbu působením $\text{Li}/t\text{-BuOH}$, probíhající přes radikál (nebo ani-

Schéma 21. Formální syntéza (\pm)-morfinu

Činidla a podmínky: **a)** DEAD, Bu_3P , THF, 0°C (83 %); **b)** 10% HF/MeCN (98 %); **c)** Bu_3SnH , AIBN, PhH (zátav. zkumavka), 130°C 35 h (35 %); **d)** Li, *t*-BuOH, NH_3 (l), THF, -78°C 10 min (85 %)

Schéma 22. Radikálová syntéza ($-$)-vallesamidinu (153) a syntéza (\pm)-aspidospermidinu (127) z téhož intermediátu

Činidla a podmínky: **a)** Tryptamin, AcOH, 125°C 6 d (43 % + 44 %); **b)** 20% NaOH vod., MeOH, rt 1 h ((+)-149b 72 %, (-)-149a 85 %); **c)** MsCl, DMAP, py, 0°C 2 h (92 %); **d)** $(\text{PhSe})_2$, NaBH_4 , EtOH, 0°C \rightarrow rt 3 h (68 %); **e)** *n*- Bu_3SnH , AIBN, PhMe, 100°C 0,5 h (91 %); **f)** 35% CH_2O vod., NaBH_3CN , MeCN, potom AcOH, rt 1 h (87 %); **g)** LiAlH_4 , THF, 70°C 0,5 h (82 %); **h)** (\pm)-149, 40% H_2SO_4 , 100°C ; **i)** (\pm)-149, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, 100°C ; **j)** LiAlH_4 (20–25 % z tryptaminu)

on) aminu **146b**, dokončila výstavbu skeletu morfinanových alkaloidů (83 %); srovnaj s cyklizací **85** → **86** ze Schématu 13. Oxidací dihydroisokodeinu (**147**) na 7,8-dihydrokodeinon (Swern) byla dokončena formální syntéza (\pm)-**87**; pro další radikálové přístupy k morfinanům viz cit.¹⁴². Radikálově byl uzavírán rovněž skelet aspidospermanových basí¹⁴³ (aplikace u indolových alkaloidů viz v R¹⁴⁴). Radikálových cyklizací bylo opakovaně užito i v totální syntéze (\pm)-gelseminu¹⁴⁵.

Na radikálové adici do polohy C-2 indolu je založena i *de novo* syntéza sekoschizozyanového alkaloidu (–)-vallesamidinu (**153**)¹⁴⁶, Schéma 22. Mnohastupňovou syntézou přístupná acetal-kyselina **148** byla nestereoselektivní Pictetovou-Spenglerovou kondensací s tryptaminem konvertována v ekvimolární směs acetátů, které byly odděleně hydrolyzovány v hydroxylaktamy **149**. Stereoisomer (+)-**149b** (31,2 %) byl po převedení v selenid (+)-**150** cyklizován působením Bu₃SnH v přítomnosti AIBN: Atakem primárně vznikl radikál v poloze C-2 indolového jádra byl generován pentacyklický radikál **151**, který vedl k tvorbě laktamu (+)-**152** v 91% výtěžku! Úspěch přístupu

souvisí s dostačující stabilitou benzylového radikálu **151**. V této souvislosti je užitečné zmínit Harley-Masonovu klasickou syntézu¹⁴⁷ (\pm)-aspidospermidinu (**127**), která je založena na iontové variantě procesu, Schéma 22. V tomto případě racemický alkohol **149** cyklizoval působením jak Lewisovy (BF₃), tak Brønstedovy kyseliny (H₂SO₄) za vzniku karbokationtu **154a**, spíše však konjugovaného iminia **154b**, které bylo v rovnováze s iminiem **155**, stabilizujícím se alternativní cyklizací za vzniku indoleninu **156** (viz rovněž cit.¹⁴⁸).

5. Syntéza alkaloidů na přelomu století. Výhled

Totální syntéza alkaloidů se ve stále větší míře zaměřuje na enantioselektivní procesy a široké používání chirálních katalyzátorů. Přesto mohou být i syntézy racemátů v případech komplexních látek velkým úspěchem, viz např. gelsemin¹⁴⁹. Cílem je novost a maximální efektivnost z hlediska počtu stupňů a výtěžků.

Existují v zásadě dva důvody pro totální syntézu alka-

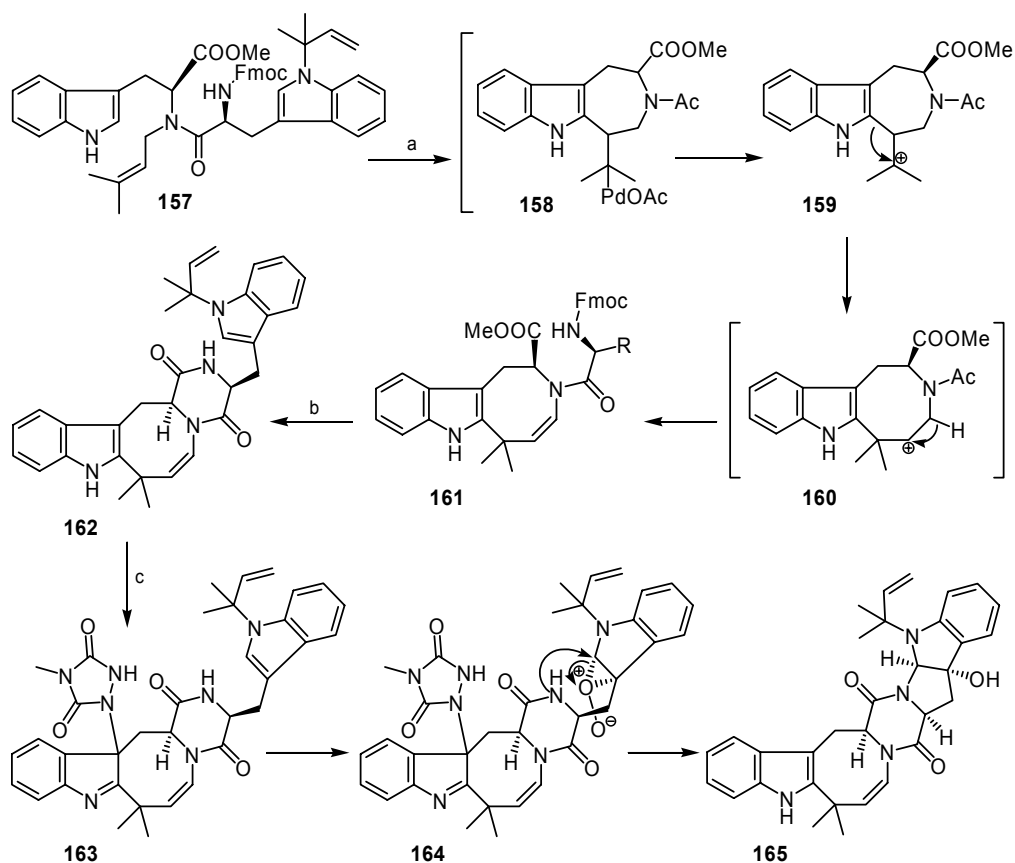


Schéma 23. Syntéza (+)-okaraminu N

Činidla a podmínky: **a**) Pd(OAc)₂ (1 ekv.), O₂, AcOH/dioxan/voda (1:3,5:1), 23 °C 16 h (38 %; 44 % brsm); **b**) Et₂NH (přebytek), THF, 0 °C → 23 °C (2 h) 4 h (95 %); **c**) MTAD, CH₂Cl₂, –5 °C 10 min, potom odpařit, potom O₂, sluneční lampa, methylenová modř, MeOH, –28 °C 7,5 h, potom Me₂S, MeOH, –28 °C → –10 °C (3 h), potom odpařit a 110 °C 30 min (36 %; 70 % brsm)

loidů (a přírodních látek obecně):

- a) akademický – vědecká prestiž laboratoře/týmu. Syntéza může být nezbytná i pro potvrzení struktury odvozené pomocí metod strukturní analýzy (R¹⁵⁰), viz příklad revize struktur lepadiforminu¹⁵¹ a batzelladinu F¹⁵²,
- b) praktický – využitelnost biologických účinků při nedostačující kapacitě přírodních zdrojů. Syntéza analogů pro optimalizaci účinnosti. Potenciální výroba¹⁵³.

Stav, v němž se syntéza alkaloidů na počátku tisíciletí nachází, názorně ilustrují dvě Nicolaouovy^{154,155} a Harranova¹⁵⁶ totální syntéza diazoniidu A. Totální syntéza (+)-pikaminu (Ley¹⁵⁷) dokumentuje efektivitu použití činidel zakotvených na pevné fázi (R¹⁵⁸). Čtvrtstoletí muselo uplynout od klasické Uskokovičovy syntézy chininu¹⁵⁹, než bylo nedávno zveřejněno pět enantioselektivních syntéz tohoto alkaloidu^{160–164} (viz rovněž¹ a R^{165,166}). Organická syntéza a totální syntéza se navzájem obohacují¹⁶⁷, jak jasně dokazuje brilantní syntéza (+)-okaraminu N (**165**), zveřejněná předloni Coreyem se spolupracovníky¹⁶⁸ (viz rovněž³), Schéma 23. V amidu **157**, přístupném z derivátů tryptofanu a 3-methyl-2-butenalu „one-pot“ způsobem v 70% výtěžku, byl vytvořen azocinový kruh působením octanu palladnatého v kyslíkové atmosféře: Pouze nesubstituovaný indol se účastnil reakce, probíhající přes palladiový komplex **158** a azepiniový kation **159**, který přesmykl na azociniový kation **160**, stabilizující se za vzniku **161** v 44% výtěžku (byla detegována pouze stopová množství isomerního azepinu, vznikajícího ze **158** alternativním způsobem). Následující tvorba diketopiperazinu **162** (95 %) byla indukována přebytkem diethylaminu. Diferenciace indolových jader, nezbytné pro dokončení syntézy, bylo dosaženo ochranou *N*-nesubstituovaného indolu pomocí enové reakce s *N*-methyltriazolindionem. Generovaný indolenin-indol **163** byl podroben fotosensitizované oxidaci/cyklizaci, probíhající s diastereoselektivitou cca 5:1 patrně přes *O*-oxiraniumoxid **164**. Následná redukce dimethylsulfidem a závěrečná termolytická regenerace indolu (retro-enová reakce) dokončily syntézu okaraminu A (**165**), který byl izolován ve výtěžku 70 % z piperazinu **162** (syntézu příbuzného austamidu viz v cit.¹⁶⁹).

Tato elegantní syntéza dokumentuje, že umění, krása a chemická logika jsou nedílnými součástmi současné syntézy alkaloidů a dusíkatých heterocyklických sloučenin obecně; zároveň naznačuje směr, kterým se bude ubírat další vývoj totální syntézy stále složitějších přírodních látek^{3,170,171}.

LITERATURA

- Hájíček J.: Chem. Listy 98, 1096 (2004).
- Nicolaou K. C., Sorensen E. J.: *Classics in Total Synthesis*. VCH, Weinheim, 1996.
- Nicolaou K. C., Snyder S. A.: *Classics in Total Synthesis II*. Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- Nicolaou K. C., Snyder S. A., Montagnon T., Vassilikogiannakis G.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 1668

- (2002).
- Wender P. A., Schaus J. M., White A.W.: *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6157 (1980).
- White J. D., Choi Y.: *Helv. Chim. Acta* 85, 4306 (2002).
- Kishi Y., Aratani M., Fukuyama T., Nakatsubo F., Goto T., Inoue S., Sugiura S., Kakoi H.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, 9217 (1972).
- Kozmin S. A., Iwama T., Huang Y., Rawal V. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4628 (2002).
- Kozmin S. A., Rawal V. H.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 13523 (1998).
- Iyengar R., Schildknecht K., Aubé J.: *Org. Lett.* 2, 1625 (2000).
- Rahman A.-u., Basha A.: *Biosynthesis of Indole Alkaloids*. Clarendon Press, Oxford, 1983.
- The Monoterpenoid Indole Alkaloids* (Indoles, Part 4). (Saxton J. E., ed.). John Wiley, New York 1984.
- Monoterpenoid Indole Alkaloids* (Indoles, Supplement to Part 4). (Saxton J. E., ed.). John Wiley, Chichester 1994.
- Kuehne M. E., Seaton P. J.: *J. Org. Chem.* 50, 4790 (1985).
- Kuehne M. E., Podhorez D. E., Mulamba T., Bornmann W. G.: *J. Org. Chem.* 52, 347 (1987).
- Kuehne M. E., Kirkemo C. L., Matsko T. H., Bohnert J. C.: *J. Org. Chem.* 45, 3259 (1980).
- Kuehne M. E., Bornmann W. G., Earley W. G., Mariko I.: *J. Org. Chem.* 51, 2913 (1986).
- Bornmann W. G., Kuehne M. E.: *J. Org. Chem.* 57, 1752 (1992).
- Kuehne M. E., Frasier D. A., Spitzer T. D.: *J. Org. Chem.* 56, 2696 (1991).
- Kuehne M. E., Xu F.: *J. Org. Chem.* 63, 9427 (1998).
- Bandarage U. K., Kuehne M. E., Glick S. D.: *Tetrahedron* 55, 9405 (1999).
- Kuehne M. E., Wilson T. E., Bandarage U. K., Dai W., Yu Q.: *Tetrahedron* 57, 2085 (2001).
- Kuehne M. E., Bornmann W. G.: *J. Org. Chem.* 56, 513 (1991).
- Kuehne M. E., Bandarage U. K., Hammach A., Li Y.-L., Wang T.: *J. Org. Chem.* 63, 2172 (1998).
- Kuehne M. E., Dai W., Li Y.-L.: *J. Org. Chem.* 66, 1560 (2001).
- Kuehne M. E., Xu F.: *J. Org. Chem.* 63, 9434 (1998).
- Kalaus G., Greiner I., Kaitár-Peredy M., Brlik J., Szabó L., Szántay C.: *J. Org. Chem.* 58, 1434 (1993).
- Danieli B., Lesma G., Palmisano G., Passarella D., Silvani A.: *Tetrahedron* 50, 6941 (1994).
- Yokoshima S., Ueda T., Kobayashi S., Sato A., Kuboyama T., Tokuyama H., Fukuyama T.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 2137 (2002).
- Carroll W. A., Grieco P. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 115, 1164 (1993).
- Kalaus G., Greiner I., Kaitár-Peredy M., Brlik J.,

- Szabó L., Szántay C.: *J. Org. Chem.* **58**, 6076 (1993).
32. Williams R. M., Sanz-Cervera J. F., Sancenón F., Marco J. A., Halligan K. M.: *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 1233 (1998).
 33. Sanz-Cervera J. F., Williams R. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2556 (2002).
 34. Williams R. M., Cox R. J.: *Acc. Chem. Res.* **36**, 127 (2003).
 35. Martin S. F., Humphrey J. M., Ali A., Hillier M. C.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 866 (1999).
 36. Rawal V. H., Iwasa S.: *J. Org. Chem.* **59**, 2685 (1994).
 37. Rawal V. H., Michoud C., Monestel R. F.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3030 (1993).
 38. Marsault E., Toró A., Nowak P., Deslongchamps P.: *Tetrahedron* **57**, 4243 (2001).
 39. Bodwell G. J., Li J.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 3261 (2002).
 40. Bonjoch J., Solé D.: *Chem. Rev.* **100**, 3455 (2000).
 41. Brosius A. D., Overman L. E., Schwink L.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 700 (1999).
 42. Boger D. L., Ichikawa S., Jiang H.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12169 (2000).
 43. Ichihara A.: *Synthesis* **1987**, 207.
 44. Oppolzer W., Robbiani C.: *Helv. Chim. Acta* **66**, 1119 (1983).
 45. Segura J. L., Martin N.: *Chem. Rev.* **99**, 3199 (1999).
 46. Behforouz M., Ahmadian M.: *Tetrahedron* **56**, 5259 (2000).
 47. Buonora P., Olsen J.-C., Oh T.: *Tetrahedron* **57**, 6099 (2001).
 48. Abe H., Aoyagi S., Kibayashi C.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4583 (2000).
 49. Abe H., Aoyagi S., Kibayashi C.: *Tetrahedron Lett.* **41**, 1205 (2000).
 50. Denmark S. E., Middleton D. S.: *J. Org. Chem.* **63**, 1604 (1998).
 51. Denmark S. E., Marcin L. R.: *J. Org. Chem.* **62**, 1675 (1997).
 52. Wilkie G. D., Elliott G. I., Blagg B. S. J., Wolkenberg S. E., Soenen D. R., Miller M. M., Pollack S., Boger D. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11292 (2002).
 53. *Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products.* (Padwa A., Pearson W. H., ed.). Wiley, New York 2002.
 54. Brogini G., Zecchi G.: *Synthesis* **1999**, 905.
 55. Tufariello J. J., Mullen G. B., Tegeler J. J., Trybulski E. J., Wong S. C., Ali S. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 2435 (1979).
 56. Gössinger E.: *Monatsh. Chem.* **111**, 143 (1980).
 57. Oppolzer W., Petrzilka M.: *Helv. Chim. Acta* **61**, 2755 (1978).
 58. Williams G. M., Roughley S. D., Davies J. E., Holmes A. B.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4900 (1999).
 59. Snider B. B., Cartaya-Marin C. P.: *J. Org. Chem.* **49**, 1688 (1984).
 60. Werner K. M., De los Santos J. M., Weinreb S. M., Shang M. A.: *J. Org. Chem.* **64**, 686 (1999).
 61. Nagasawa K., Georgieva A., Koshino H., Nakata T., Kita T., Hashimoto Y.: *Org. Lett.* **4**, 177 (2002).
 62. Oinuma H., Dan S., Kakisawa H.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 654.
 63. Nagasawa K., Georgieva A., Nakata T.: *Tetrahedron* **56**, 187 (2000).
 64. White J. D., Blakemore P. R., Korf E. A., Yokochi A. F. T.: *Org. Lett.* **3**, 413 (2001).
 65. Kozikowski A. P., Chen Y.-Y.: *Tetrahedron* **40**, 2345 (1984).
 66. Hudlický T., Seoane G., Lovelace T. C.: *J. Org. Chem.* **53**, 2094 (1988).
 67. Padwa A., Weingarten M. P.: *Chem. Rev.* **96**, 223 (1996).
 68. Padwa A., Price A. T.: *J. Org. Chem.* **63**, 556 (1998).
 69. Oppolzer W.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **23**, 876 (1984).
 70. Keck G. E., Webb R. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3173 (1981).
 71. Oppolzer W., Thirring K.: *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4978 (1982).
 72. Oppolzer W., Robbiani C., Bättig K.: *Tetrahedron* **40**, 1391 (1984).
 73. Parsons A. F.: *Tetrahedron* **52**, 4149 (1996).
 74. *Organometallics in Synthesis.* (Schlosser M., ed.). Wiley, New York 2002.
 75. Tietze L. F., Ila H., Bell H. P.: *Chem. Rev.* **104**, 3453 (2004).
 76. Trost B. M., Crawley M. L.: *Chem. Rev.* **103**, 2921 (2003).
 77. Trost B. M.: *J. Org. Chem.* **69**, 5813 (2004).
 78. Stragies R., Blechert S.: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9584 (2000).
 79. Prelog V., Battegay J., Taylor W. I.: *Helv. Chim. Acta* **31**, 2244 (1948).
 80. Overman L. E., Paone D. V., Stearns B. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7702 (1999).
 81. Corey E. J., Guzman-Perez A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 389 (1998).
 82. Overman L. E., Larrow J. F., Stearns B. A., Vance J. M.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **39**, 213 (2000).
 83. Link J. T., Overman L. E.: *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8166 (1996).
 84. Edmonds D. J., Johnston D., Procter D. J.: *Chem. Rev.* **104**, 3371 (2004).
 85. Overman L. E., Peterson E. A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 2525 (2003).
 86. Lebsack A. D., Link J. T., Overman L. E., Stearns B. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9008 (2002).
 87. Trost B. M., Tang W.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **41**, 2795 (2002).
 88. Trost B. M., Tang W.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14542 (2002).
 89. Czollner L., Frantsits W., Küenburg B., Hedenig U., Fröhlich J., Jordis U.: *Tetrahedron Lett.* **39**, 2087

- (1998).
90. Watanabe T., Shakadou M., Uemura M.: *Synlett* 2000, 1141.
 91. Bringmann G., Breuning M., Tasler S.: *Synthesis* 1999, 525.
 92. Fürstner A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 3012 (2000).
 93. Pearson A. J., Ham P.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1983, 1421.
 94. Deiters A., Martin S. F.: *Chem. Rev.* 104, 2199 (2004).
 95. Hagiwara H., Katsumi T., Kamat V. P., Hoshi T., Suzuki T., Ando M.: *J. Org. Chem.* 65, 7231 (2000).
 96. Deiters A., Martin S. F.: *Org. Lett.* 4, 3243 (2002).
 97. Buschmann N., Rückert A., Blechert S.: *J. Org. Chem.* 67, 4325 (2002).
 98. Fukuda Y.-i., Shindo M., Shishido K.: *Org. Lett.* 5, 749 (2003).
 99. Brenneman J. D., Martin S. F.: *Org. Lett.* 6, 1329 (2004).
 100. Aggarwal V. K., Astle C. J., Rogers-Evans M.: *Org. Lett.* 6, 1469 (2004).
 101. Johnson J. A., Sames D.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 6321 (2000).
 102. Jia C., Kitamura T., Fujiwara Y.: *Acc. Chem. Res.* 34, 633 (2001).
 103. Johnson J. A., Li N., Sames D.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6900 (2002).
 104. Dangel B. D., Godula K., Youn S. W., Sezen B., Sames D.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 11856 (2002).
 105. Fodor G., Nagubandi S.: *Tetrahedron* 36, 1279 (1980).
 106. Smith B. T., Wendt J. A., Aubé J.: *Org. Lett.* 4, 2577 (2002).
 107. Pearson W. H.: *J. Heterocycl. Chem.* 33, 1489 (1996).
 108. Wroblewski A., Sahasrabudhe K., Aubé J.: *J. Am. Chem. Soc.* 126, 5475 (2004).
 109. Iyengar R., Schildknegt K., Aubé J.: *Org. Lett.* 2, 1625 (2002).
 110. Maruoka K., Miyazaki T., Ando M., Matsumura Y., Sakane S., Hattori K., Yamamoto H.: *J. Am. Chem. Soc.* 105, 2831 (1983).
 111. Sakane S., Matsumura Y., Yamamura Y., Ishida Y., Maruoka K., Yamamoto H.: *J. Am. Chem. Soc.* 105, 672 (1983).
 112. Hesse M.: *Ring Enlargement in Organic Chemistry*. Verlag Chemie, Weinheim 1991.
 113. Wasserman H. H., *Tetrahedron Lett.* 23, 405 (1982).
 114. Wasserman H. H., Robinson R. P., Matsuyama H.: *Tetrahedron Lett.* 21, 3493 (1980).
 115. Bienz S., Guggisberg A., Wälchli R., Hesse M.: *Helv. Chim. Acta* 71, 1708 (1988).
 116. Ohnuma T., Tabe M., Shiiya K., Ban Y., Date T.: *Tetrahedron Lett.* 24, 4249 (1983).
 117. Castro A. M. M.: *Chem. Rev.* 104, 2939 (2004).
 118. Ohsawa T., Ihara M., Fukumoto K., Kametani T.: *J. Org. Chem.* 48, 3644 (1983).
 119. Marino J. P., Rubio M. B., Cao G., de Dios A.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 13398 (2002).
 120. Marino J. P., Bogdan S., Kimura K.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 5566 (1992).
 121. Ihara M., Fukumoto K.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 32, 1010 (1993).
 122. Hook J. M., Mander L. N.: *Nat. Prod. Rep.* 3, 35 (1986).
 123. Schultz A. G., Pettus L.: *J. Org. Chem.* 62, 6855 (1997).
 124. Schultz A. G., Malachowski W. P., Pan Y.: *J. Org. Chem.* 62, 1223 (1997).
 125. Nicolaou K. C., Montagnon T., Baran P. S., Zhong Y.-L.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 2245 (2002).
 126. Bottini A. T., Gal J.: *J. Org. Chem.* 36, 1718 (1971).
 127. Molander G. A., Roenn M.: *J. Org. Chem.* 64, 5183 (1999).
 128. Snider B. B., Liu T.: *J. Org. Chem.* 62, 5630 (1997).
 129. Snider B. B., Shi Z.: *J. Am. Chem. Soc.* 116, 549 (1994).
 130. Berlinck R. G. S.: *Nat. Prod. Rep.* 19, 617 (2002).
 131. Rice K. C.: *J. Org. Chem.* 45, 3135 (1980).
 132. Zezula J., Hudlický T.: *Synlett* 2005, 388.
 133. Rinner U., Hudlický T.: *Synlett* 2005, 365.
 134. Yamada S., Tomioka K., Koga K.: *Tetrahedron Lett.* 1976, 57.
 135. Shimizu K., Tomioka K., Koga K., Yamada S.: *Heterocycles* 8, 277 (1977).
 136. Tobinaga S.: *Bioorg. Chem.* 4, 110 (1975).
 137. Holton R. A., Sibi M. P., Murphy W. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 110, 314 (1988).
 138. Giese B., Kopping B., Göbel T., Dickhaut J., Thoma G., Kulicke K. J. v *Organic Reactions*. Díl 48, str. 301, (Paquette L. A., ed.). John Wiley & Sons, New York 1996.
 139. Parker K. A., Fokas D.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, 9688 (1992).
 140. Simon C., Hosztafi S., Makleit S.: *J. Heterocycl. Chem.* 34, 349 (1997).
 141. Hudlický T., Gonzalez D., Gibson D. T.: *Aldrichim. Acta* 32, 35 (1999).
 142. Butora G., Hudlický T., Fearnley S. P., Stabile M. R., Gum A. G., Gonzalez D.: *Synthesis* 1998, 665.
 143. Kuehne M. E., Wang T., Seaton P. J.: *J. Org. Chem.* 61, 6001 (1996).
 144. Li J. J. v *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Díl 15, str. 573. Elsevier Science, 2001.
 145. Atarashi S., Choi J.-K., Ha D.-C., Hart D. J., Kuzmich D., Lee C.-S., Ramesh S., Wu S. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 119, 6226 (1997).
 146. Tanino H., Fukuishi K., Ushiyama M., Okada K.: *Tetrahedron Lett.* 43, 2385 (2002).
 147. Harley-Mason J., Kaplan M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1967, 915.
 148. Andriamialisoa R. Z., Langlois N., Langlois Y.: *J. Org. Chem.* 50, 961 (1985).
 149. Ng F. W., Lin H., Danishefsky S. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9812 (2002).
 150. Nicolaou K. C., Snyder S. A.: *Angew. Chem., Int.*

- Ed. Engl. 44, 1012 (2005).
151. Weinreb S. M.: *Acc. Chem. Res.* 36, 59 (2003).
 152. Cohen F., Overman L. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 123, 10782 (2001).
 153. Kotha S.: *Tetrahedron* 50, 3639 (1994).
 154. Nicolaou K. C., Bella M., Chen D. Y.-K., Huang X., Ling T., Snyder S. A.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 41, 3495 (2002).
 155. Nicolaou K. C., Rao P. B., Hao J., Reddy M. V., Rassias G., Huang X., Chen D. Y.-K., Snyder S. A.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 42, 1753 (2003).
 156. Burgett A. W. G., Li Q., Wei Q., Harran P. G.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 4961 (2003).
 157. Baxendale I. R., Ley S. V., Piutti C.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 41, 2194 (2002).
 158. Ley S. V., Baxendale I. R., Bream R. N., Jackson P. S., Leach A. G., Longbottom D. A., Nesi M., Scott J. S., Storer R. I., Taylor S. J.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2000, 3815.
 159. Gutzwiller J., Uskoković M.: *J. Am. Chem. Soc.* 100, 576 (1978).
 160. Stork G., Niu D., Fujimoto A., Koft E. R., Balkovec J. M., Tata J. R., Dake G. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 123, 3239 (2001).
 161. Smith B. T., Wendt J. A., Aubé J.: *Org. Lett.* 4, 2577 (2002).
 162. Raheem I. T., Goodman S. N., Jacobsen E. N.: *J. Am. Chem. Soc.* 126, 706 (2004).
 163. Igarashi J., Katsukawa M., Wang Y.-G., Acharya H. P., Kobayashi Y.: *Tetrahedron Lett.* 45, 3783 (2004).
 164. Hermet J.-P. R., McGrath M. J., O'Brien P., Porter D. W., Gilday J.: *Chem. Commun.* 2004, 1830.
 165. Kaufman T. S., Rúveda E. A.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 44, 854 (2005).
 166. Hoffmann H. M. R., Frackenpohl J.: *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 4293.
 167. Nicolaou K. C., Baran P. S.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 41, 2679 (2002).
 168. Baran P. S., Guerrero C. A., Corey E. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 125, 5628 (2003).
 169. Baran P. S., Corey E. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7904 (2002).
 170. Hall N.: *Chem. Commun.* 2003, 661.
 171. Corey E. J.: *J. Org. Chem.* 69, 2917 (2004).

J. Hájiček (*Zentiva/Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, a.s., Prague*): **Trends in Total Synthesis of Alkaloids**

The article deals with implementation of general synthetic reactions in total synthesis of alkaloids. The use of both classical and newly developed synthetic methodologies is illustrated with examples selected from the whole alkaloid kingdom.

OPRAVA

Redakce uveřejňuje opravu schématu v referátu **Josefa Hájička: Mannichova a příbuzné reakce v totální syntéze alkaloidů** (*Chem. Listy* 98, 1096 (2004)).

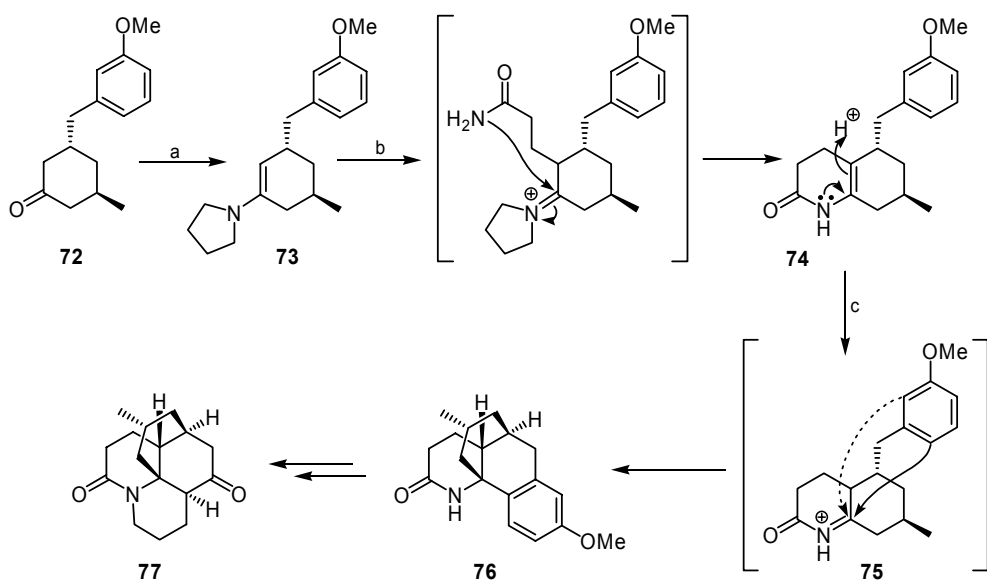


Schéma 12. **Syntéza (+)-lykopsodinu**; činidla a podmínky: a) pyrrolidin. b) $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$, dioxan, rfl přes noc, potom H_2O , rfl 2 h (74 20–25 % + isomer). c) 80% $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{HCOOH}$ (1:1), rt 20 h (76 55 % + isomer 29 %)

OXAZOLIDINOVÉ DERIVÁTY EFEDRINU

MARTINA ASTROVÁ, LADISLAV KURC
a LIBOR ČERVENÝ

Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
martina.astrova@vscht.cz, ladislav.kurc@vscht.cz,
libor.cerveny@vscht.cz

Došlo 10.6.04, přijato 25.11.04.

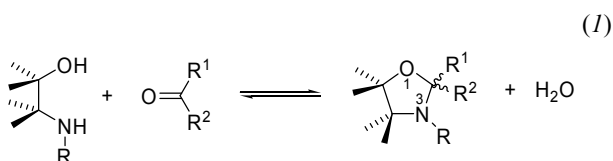
Klíčová slova: oxazolidin, efedrin, kondenzace, hydrolyza

Obsah

1. Úvod
2. Stereochemie vzniku derivátů oxazolidinu
3. Vliv rozpouštědla na stereoselektivitu reakce efedrinu s aromatickými aldehydy
4. Hydrolyza derivátů oxazolidinu
5. Závěr

1. Úvod

Oxazolidin je nasycený pětičlenný heterocyclus s atomem kyslíku v poloze 1 a atomem dusíku v poloze 3. Některé jeho deriváty jsou biologicky aktivními látkami s potenciálním uplatněním ve farmacii. Deriváty 1,3-oxazolidinů vznikají^{1,2} kondenzací β -aminoalkoholů s aldehydy nebo ketony podle (1).



Při nestejných substituentech na jednotlivých uhlíkových atomech oxazolidinu vznikají chirální centra. Může tedy vznikat široká paleta stereoisomerů, jejichž biologická aktivita je značně různorodá. Například deriváty oxazolidinu vznikající z 3-[1-hydroxy-2-(methylamino)ethyl]fenolu se ukázaly jako lokální mydriatika, deriváty oxazolidinů odvozené od efedrinu se osvědčily jako sympatomimetika³⁻⁶. Čtyři stereoisomery efedrinu a jim odpovídající deriváty oxazolidinu (vzniklé reakcí efedrinu se salicylaldehydem) byly testovány jako látky zvyšující pohybovou aktivitu⁶. Tento účinek mají všechny stereoisomery efedrinu, s výjimkou (-)-(1*R*,2*R*)-pseudeofedrinu. Účinek klesá

v řadě (-)-(1*R*,2*S*)-efedrin > (+)-(1*S*,2*S*)-pseudeofedrin > (+)-(1*S*,2*R*)-efedrin.

Kondenzační reakce (1) vedoucí ke vzniku derivátů oxazolidinu je rovnovážná. Právě vratnost reakce poskytuje nové možnosti přípravy léčiv s retardovanými účinky. Hydrolyzou oxazolidinového derivátu, připraveného z vhodného prekursoru (například ze skupiny amfetaminů), se v organismu postupně uvolňuje účinná substance. Takto lze přiblížit farmakokinetiku léčiva léčebným potřebám pacienta. Je známo, že absorpci, resorpci a eliminaci léčiva lze popsat kinetickou rovnicí prvního řádu. To znamená, že k zdvojnásobení doby trvání účinku je potřebné podat několikanásobně vyšší dávku. Aplikací neúčinného prekursoru se obvykle omezuje presystemická eliminace léčiva, tudíž je možno dávkování snížit a tím je organismus méně zatěžován.

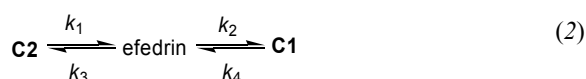
Cílem práce bylo shrnutí poznatků o vzniku oxazolidinových derivátů efedrinu a jejich hydrolyze. Pozornost byla věnována vlivu rozpouštědla a vlivu substituentu aromatického aldehydu na rovnováhu kondenzační reakce efedrinu a na stereoselektivitu této reakce.

2. Stereochemie vzniku derivátů oxazolidinu

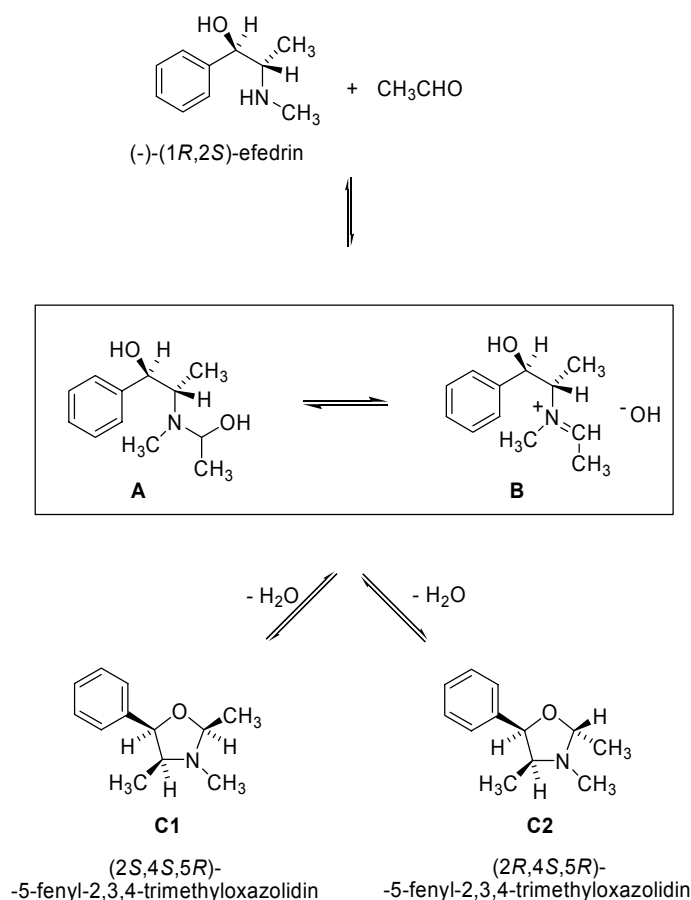
Stereochemií reakce (1) se zabývali Breckett a Jones⁷. Jako modelovou reakci zvolili kondenzaci (-)-(1*R*,2*S*)-efedrinu s acetaldehydem. Autoři uvádějí, že tato reakce poskytuje dva produkty, jejichž poměr zjišťovaný GLC byl 10:1. Na základě spektroskopických metod (IR, NMR a MS) bylo zjištěno, že menší i větší pik v chromatogramu přísluší stereoisomerům 5-fenyl-2,3,4-trimethyloxazolidinu.

Následně bylo autory⁷ navrženo reakční schéma 1. Vznik derivátu oxazolidinu **C1** z acetaldehydu a efedrinu zřejmě probíhá přes hemiaminal **A** a přes iminiovou sůl **B**, jde však pouze o předpokládané meziproducty, které nebylo možné izolovat z reakční směsi. Předpokládá se však, že struktura **A** je nejpravděpodobnějším meziproductem vzniku 5-fenyl-2,3,4-trimethyloxazolidinu. Průběh reakce byl sledován⁷ metodou NMR. Během prvních 4 min vymizely signály (-)-(1*R*,2*S*)-efedrinu a vznikly látky **C1** a **C2**. Intenzita signálů odpovídající isomeru **C2** následně začala klesat spolu s postupným nárůstem signálů isomeru **C1**. **C1** je termodynamicky výhodnější než isomer **C2**. Podobné výsledky dávala analýza GLC.

Z představ o mechanismu a z naměřených dat byl autory⁷ navržen kinetický model vyjádřený vztahem (2).



Pro tento vztah a kinetiku prvního řádu byly nalezeny relativní hodnoty rychlostních konstant: $k_1 = 72,3$; $k_2 = 36,4$; $k_3 = 16,3$ a $k_4 = 1$.

Schéma 1. Vznik derivátů oxazolidinu C1 a C2 z (-)-(1R,2S)-efedrinu a acetaldehydu⁷

Výskyt dvou diastereoisomerních derivátů oxazolidinu (**C1**, **C2**) je důsledkem vzniku dalšího chirálního centra (na atomu C2 oxazolidinu). Analogickou reakcí (+)-(1S,2S)-pseudofedrinu s acetaldehydem vznikly také dva diastereoisomery, hlavní (cca 95 %) a vedlejší (cca 5 %).

Breckett a Jones⁷ dále testovali aktivitu hydroxyskupiny a sekundární aminové skupiny při reakci s acetaldehydem. Jako modelové látky byly vybrány *N*-methylamfetamin a *N*-methylefedrin. Jde o reaktanty pouze s jednou reaktivní funkční skupinou (NH v prvním případě, resp. OH u druhého modelu). Bylo zjištěno, že tyto látky s acetaldehydem nereagují. Podobného výsledku bylo dosaženo při reakci acetaldehydu s *O*-trimethylsilylovým derivátem (-)-(1R,2S)-efedrinu. Z uvedeného vyplývá, že pro cyklizaci na oxazolidinový kruh musí být u derivátů efedrinu volné skupiny OH i NH (viz reakce 1).

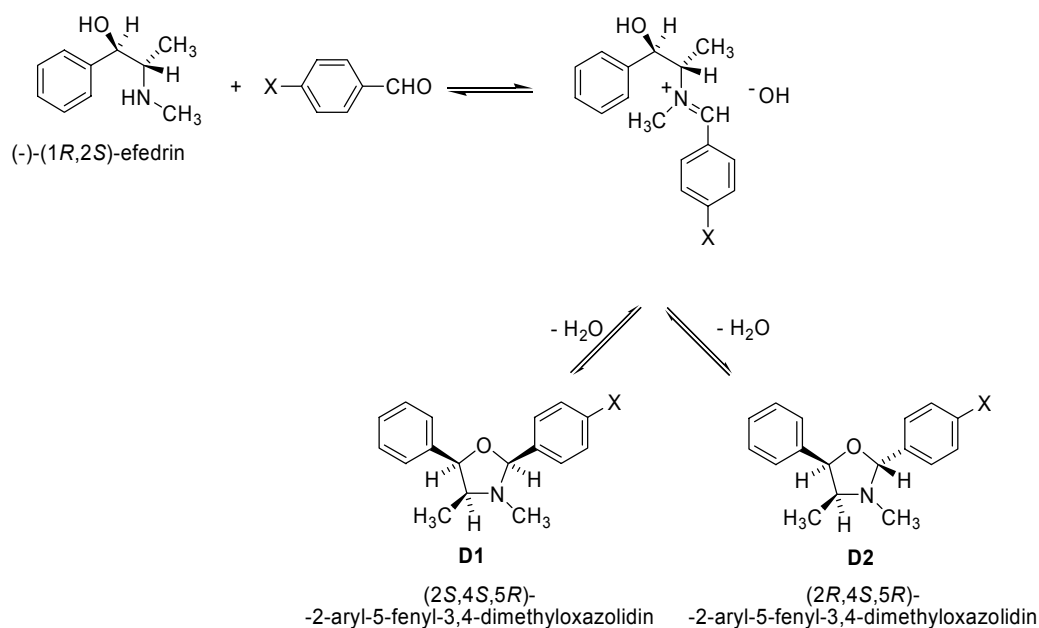
Využití derivátů oxazolidinu pro syntézu farmak s prodlouženým účinkem vyžaduje, aby při syntéze i hydrolyze v organismu nedocházelo k isomerizaci, a tím k degradaci účinné látky. Kyselá hydrolyza oxazolidinového derivátu připraveného z (-)-(1R,2S)-efedrinu a acetaldehydu vedla ke vzniku pouze efedrinu s původní konfigurací.

3. Vliv rozpouštědla na stereoselektivitu reakce efedrinu s aromatickými aldehydy

Aromatické aldehydy reagují s (-)-(1R,2S)-efedrinem podle schématu 2 v několika rovnovážných stupních⁸. Mechanismus reakce byl odvozen na základě dobře známé vratné reakce, tj. hydrolyzy derivátů oxazolidinu.

Stupněm určujícím konfiguraci produktu je intramolekulární adice hydroxyskupiny na dvojnou vazbu iminiové skupiny. Diastereodiferenciace může být řízena kineticky i termodynamicky. Významně se projeví vliv substituentu na aromatickém jádře aldehydu, jednak v preferenci určitého směru nukleofilního ataku na atom uhlíku nesoucí aryl a jednak v ovlivnění kondenzačně-hydrolytické rovnovážné konstanty.

V chloroformu nebo methanolu reaguje benzaldehyd (X=H) nebo 4-methoxybenzaldehyd (X=OCH₃) s (-)-(1R,2S)-efedrinem za vzniku (2S,4S,5R)-isomeru (**D1**) jako hlavního produktu (90 %) a (2R,4S,5R)-isomeru (**D2**) jako minoritního produktu. Konfigurace produktů byla stanovena na základě ¹H NMR. Poměr isomerů **D1** : **D2** = 9:1 je v reakční směsi konstantní a nezávisí na stupni konverze. Naproti tomu reakcí (-)-(1R,2S)-efedrinu s 4-kyanbenz-

Schéma 2. Reakce $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu s aromatickými aldehydy

aldehydem ($X=\text{CN}$) nebo 4-nitrobenzaldehydem ($X=\text{NO}_2$, chloroform, teplota $0\text{--}20\text{ }^\circ\text{C}$) vznikají zpočátku oba isomery **D1** i **D2** v přibližném poměru 50:50. Při konverzi blíže se rovnovážné byl sledán podobný výsledek jako v případě benzaldehydu nebo 4-methoxybenzaldehydu. Obsah hlavního produktu s konfigurací 2*S*,4*S*,5*R* byl přibližně 85 %.

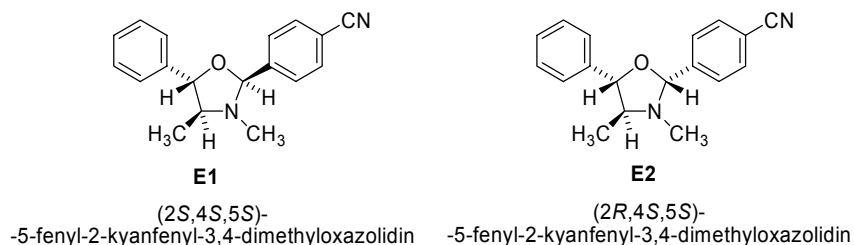
Jestliže kondenzace 4-kyan- nebo 4-nitrobenzaldehydu s $(-)-(1R,2S)$ -efedrinem probíhá v methanolu namísto chloroformu, uplatňuje se kinetický vliv substituentu na aromatickém jádře ještě výrazněji. Na počátku reakce vzniká výhradně produkt **D2**, po dlouhé reakční době již převládá produkt **D1**, podobně jako ve všech případech popsanych výše.

Významný vliv rozpouštědla vedl Agamiho a Rizka⁸ k ověření sporných výsledků Neelakantana^{1,2} získaných kondenzací $(-)-(1R,2S)$ -efedrinu a 4-brombenzaldehydu ($X=\text{Br}$) v absolutním ethanolu. Tato práce z roku 1971 uvádí, že produktem je isomer **D2**. Reprodukcí kondenzace za podmínek uvážených v práci Neelakantana^{1,2} bylo

zjištěno, že produktem reakce je hlavně isomer **D1**. Nicméně isomer **D2** je možno izolovat za pečlivě řízených podmínek, pouze však v případě, že reakce probíhala ve vodném ethanolu.

Isomerizace oxazolidinu **D2** ($X = \text{Br}$) na **D1** isomer v methanolu vede ke vzniku rovnovážné směsi obou isomerů (**D1/D2** = 87/13). Již dříve bylo publikováno⁹, že oxazolidin jako součást artisinu je náchylný k isomerizaci, aniž je reakce katalyzována. Autoři⁸ zjistili, že isomerizace probíhá také při pokojové teplotě v méně polárních rozpouštědlech (benzen, dioxan).

Tyto výsledky sice potvrdily, že oxazolidin **D2** je možno získat v prostředí ethanolu, ale podmínky navržené Neelaktanem a spol.^{1,2} nejsou nejvhodnější pro vznik tohoto isomeru. Je velice pravděpodobné, že jejich interpretace vyplývá z nižší rozpustnosti isomeru **D2** v porovnání s **D1** oxazolidinem, a tak náhodně vybraný krystal, který byl podroben rentgenostrukturním analýzám, nebyl dostatečně reprezentativním vzorkem izolovaného produktu.

Schéma 3. Produkty reakce $(+)-(1S,2S)$ -pseudoefedrinu s 4-kyanbenzaldehydem

Čistý isomer **D1** je možno pohodlně získat jednoduchou krystalizací z vroucího ethanolu, z rovnovážné směsi, která obsahuje jen velmi malé množství druhého isomeru **D2**.

Podobně jako v případě $(-)$ -(1*R*,2*S*)-efedrinu bylo i pro $(+)$ -(1*S*,2*S*)-pseudofedrin dosaženo na počátku reakce s 4-kyanbenzaldehydem v chloroformu poměru produktů **E1** : **E2** = 1:1, při dlouhé reakční době byl jediným produktem oxazolidinový derivát **E1** (schéma 3).

Výrazný rozdíl v reaktivitě $(-)$ -(1*R*,2*S*)-efedrinu a $(+)$ -(1*S*,2*S*)-pseudofedrinu se projevil v reakci s 4-kyanbenzaldehydem v methanolu. Na počátku reakce $(+)$ -(1*S*,2*S*)-pseudofedrinu (při 10% konverzi) vznikají produkty **E1** a **E2** v poměru 3:1, zatímco na počátku reakce $(-)$ -(1*R*,2*S*)-efedrinu vzniká výhradně jeden produkt, a to isomer **D1**.

Je patrné, že jak substituenty benzaldehydu, tak rozpouštědlo, ovlivňují rychlost reakce efedrinu s deriváty benzaldehydu. Přesto, že nejsou uváděny reakční rychlosti, lze z publikovaných údajů vyvozovat, že se v polárních rozpouštědlech rychlost reakce snižuje. Rovněž elektroakceptorové substituenty snižují reaktivitu derivátů benzaldehydu. Kondenzace efedrinu s arylaldehydem se patrně za uvedených podmínek pohybuje na rozhraní kinetického a termodynamického řízení. Při snížení rychlosti kondenzace uvedenými substitučními vlivy nebo nižší reakční teplotou se více projeví různé reakční rychlosti jednotlivých jednosměrných reakcí (kinetické řízení). Naopak probíhají-li reakce rychle, zdánlivě vzniká rovnou konečný – rovnovážný produkt **D1** nebo **E1** (termodynamické řízení). Přestože jednotlivé reakce probíhají rychle, výsledná rychlost přeměny efedrinu nemusí být extrémně vysoká. Ta je totiž pro uvažovanou soustavu reakcí zachycenou rovnicí (3) závislá na rychlosti čtyř dílčích reakcí (viz vztah (2)):

$$-r_{\text{ef}} = r_2 + r_3 - r_1 - r_4 \quad (3)$$

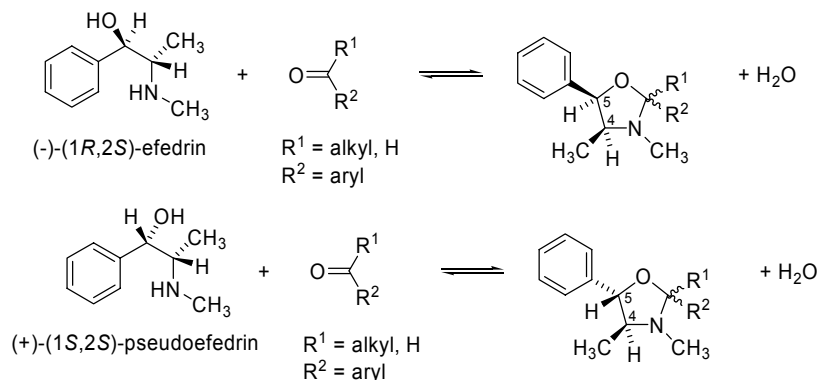


Schéma 4. Relativní konfigurace na atomech C4 a C5 kondenzačních produktů efedrinu a pseudofedrinu

4. Hydrolýza derivátů oxazolidinu

Deriváty oxazolidinu podléhají ve vodném prostředí velice snadno hydrolýze za vzniku β -aminoalkoholů a karbonylových sloučenin, ze kterých byly syntetizovány^{10,11}. Měřením poločasu hydrolýzy derivátů oxazolidinu ve vodném pufru bylo zjištěno¹⁰, že se deriváty odvozené od $(-)$ -(1*R*,2*S*)-efedrinu hydrolyzují rychleji než jejich analoga z $(+)$ -(1*S*,2*S*)-pseudofedrinu. U derivátů oxazolidinu bylo prokázáno^{3,12}, že tvoří komplexy s cyklodextriny. Rychlost hydrolýzy těchto komplexů, v porovnání s volnými deriváty oxazolidinu, je podstatně nižší^{3,5}.

Nejčastěji v přírodě se vyskytující cyklodextriny jsou α -, β - a γ -cyklodextriny³, které obsahují šest, sedm, resp. osm glukosových jednotek. β -Cyklodextriny mají nejvhodnější vlastnosti pro tvorbu komplexů s mnoha léčivými, mají však velice nízkou rozpustnost ve vodě a mohou být i nefrotoxické. Několik substituovaných cyklodextrinů vykazuje vyšší rozpustnost ve vodě a zároveň nižší toxicitu než nemodifikované β -cyklodextriny. Nejpoužívanější jsou hydroxypropyl- β -cyklodextrin (HP- β -CD), heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -cyklodextrin (DM- β -CD) a sulfobutylether- β -cyklodextrin (SBE- β -CD).

Biologická aktivita byla testována³ u jednoho cyklodextrin-oxazolidinového komplexu. Jako prekurzor účinné látky, $(-)$ -(1*R*,2*S*)-efedrinu, byl zvolen 5-fenyl-2-(4-methoxyfenyl)-3,4-dimethyloxazolidin, vznikající reakcí efedrinu s 4-methoxybenzaldehydem. Tento oxazolidinový derivát tvoří komplex s HP- β -CD. Bylo zjištěno³, že jak $(-)$ -(1*R*,2*S*)-efedrin, tak odpovídající 5-fenyl-2-(4-methoxyfenyl)-3,4-dimethyloxazolidin zvyšují u krys pohybovou aktivitu, jsou-li podány perorálně či intraperitoneálně. Při perorálním podání je pro dosažení optimálního účinku třeba podat vyšší dávku. Komplex derivátu oxazolidinu s HP- β -CD začíná účinkovat pomalu, ale působí delší dobu.

Objasnění mechanismu hydrolýzy derivátů oxazolidinu bylo věnováno několik prací^{10,13–15}. Bylo prokázáno, že

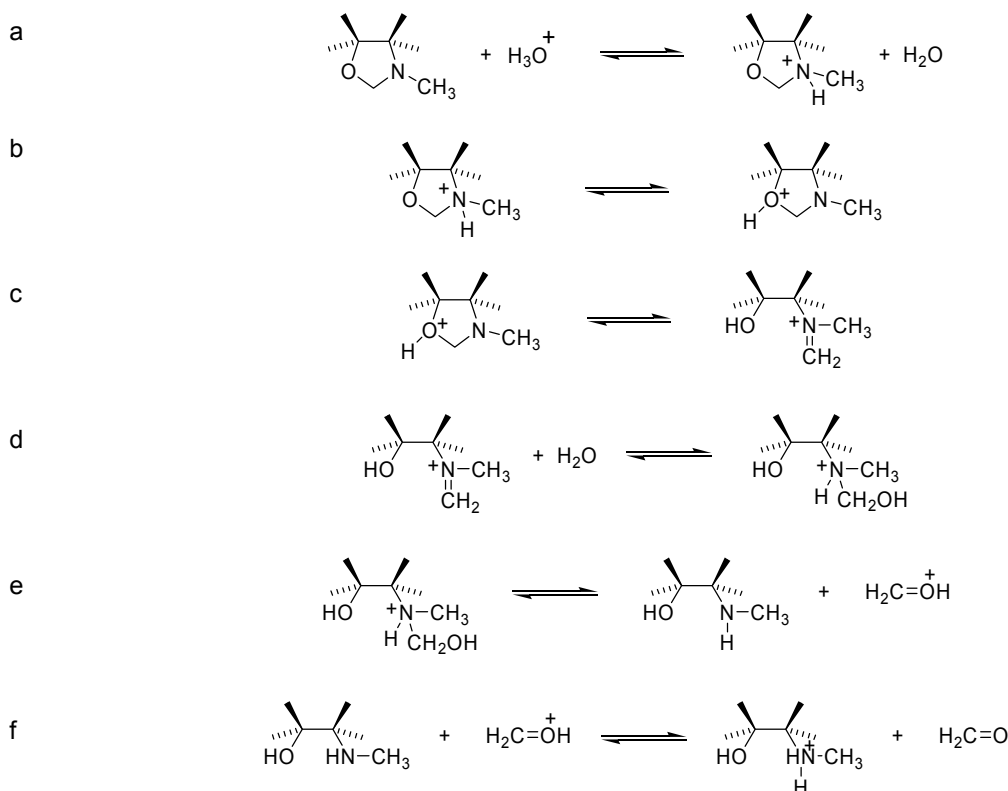


Schéma 5. Mechanismus hydrolyzy derivátů oxazolidinu¹⁵; a) protonace na N-3; b) protonace na O-1; c) otevření O-protonovaného oxazolidinu; d) hydratace iminia na protonovaný aminoalkohol; e) rozklad protonovaného aminoalkoholu; f) reprotonace dusíkového atomu

změna prostředí či změna konfigurace na chirálních centrech derivátů oxazolidinu má vliv na rychlost hydrolyzy¹⁰. (-)-(1*R*,2*S*)-Efedrin reaguje s aldehydem nebo ketonem za vzniku derivátu oxazolidinu s *cis*-konfigurací na atomech C4 a C5. Naproti tomu (+)-(1*S*,2*S*)-pseudofedrin poskytuje oxazolidin s relativní konfigurací *trans* na C4 a C5 (schéma 4). Experimentálně bylo dokázáno, že z uvedených derivátů oxazolidinu obvykle při neutrálním nebo alkalickém pH se hydrolyzuje rychleji *cis*-isomer odvozený od (-)-(1*R*,2*S*)-efedrinu než analogický *trans*-isomer odvozený od (+)-(1*S*,2*S*)-pseudofedrinu¹⁰.

Matematickým modelováním byl navržen mechanismus hydrolyzy a vysvětleny rozdíly v rychlostech hydrolyzy isomerů derivátů oxazolidinu¹⁵. Jako modelové látky byly zvoleny *cis*- a *trans*-isomer 5-fenyl-3,4-dimethyl-oxazolidinu. Tyto látky snadno vznikají reakcí formaldehydu s (-)-(1*R*,2*S*)-efedrinem a (+)-(1*S*,2*S*)-pseudofedrinem^{10,11}. Rozdíl v rychlosti hydrolyzy *cis*- a *trans*-isomeru je způsoben faktem, že protonace kyslíku a následné otevření kruhu za vzniku iminiového iontu vyžaduje pro *cis*- isomer nižší energii než je tomu v případě *trans*-isomeru. Nepříznivé sterické interakce v *cis*-isomeru upřednostňují otevření oxazolidinového kruhu. *Cis*-isomer prochází lidskými tkáněmi rychleji¹¹ a má určité sympatomimetické účinky na pokusná zvířata^{5,6}. Jestliže je rozpuš-

těn ve vodném roztoku o neutrálním nebo alkalickém pH, dochází k velice rychlé hydrolyze na (-)-(1*R*,2*S*)-efedrin a formaldehyd^{6,10,11}. Bylo prokázáno, že nedochází k úplné hydrolyze derivátu oxazolidinu, ale k ustavení rovnovážné koncentrace oxazolidinu, (-)-(1*R*,2*S*)-efedrinu a formaldehydu¹¹.

Obecně akceptovaný mechanismus hydrolyzy derivátů oxazolidinu tohoto typu je znázorněn schématem 5.

U několika derivátů oxazolidinu odvozených od (-)-(1*R*,2*S*)-efedrinu a (+)-(1*S*,2*S*)-pseudofedrinu a různých

Tabulka I

Poločas hydrolyzy oxazolidinových derivátů na (-)-(1*R*,2*S*)-efedrin a uvedený aldehyd nebo keton⁸

Produkt hydrolyzy	Poločas hydrolyzy [min]
Formaldehyd	0,08
Salicylaldehyd	0,08
Propionaldehyd	0,3
Aceton	4
Benzaldehyd	5
Cyklohexanon	6
2,2-Dimethylpropanal	30

aldehydů či ketonů byla studována rychlost jejich hydrolyzy¹⁰. Bylo zjištěno, že oxazolidiny se při teplotě 37 °C hydrolyzují v rozmezí pH 1–11, rychlost hydrolyzy však silně závisí na pH prostředí. Pro většinu derivátů oxazolidinu vykazuje závislost rychlosti hydrolyzy na pH esovitý tvar s maximem při pH vyšším než 7. Při pH 7,4 a teplotě 37 °C byly změněny poločasy hydrolyzy několika oxazolidinových derivátů (tabulka I).

Reakční rychlost v neutrálním a alkalickém prostředí klesá se vzrůstajícím sterickým efektem karbonylové sloučeniny a zároveň klesá se vzrůstající bazicitou derivátů oxazolidinu. Deriváty oxazolidinu jsou slabší báze (pK_a 5,2–6,9) než β -aminoalkoholy, z nichž vznikají, a zároveň jsou lipofilnější při fyziologickém pH. Při jejich farmaceutickém využití se však musí brát zřetel na toxicitu uvolněné karbonylové sloučeniny.

5. Závěr

Oxazolidinové deriváty jsou považovány za potenciální farmaceutické substance umožňující výrobu léčiv s retardujícím účinkem. Z důvodů možného použití oxazolidinových derivátů jako prolečiv byla věnována pozornost stereoselektivitě jejich vzniku a hydrolyze za fyziologických podmínek. Bylo zjištěno, že reakcí efedrinu s některými aldehydy nebo ketony vznikají dva produkty s odlišnou konfigurací. Existence dvou stereoisomerních derivátů oxazolidinů je důsledkem vzniku chirálního centra na uhlíku C2 oxazolidinu.

Volbou rozpouštědla a doby reakce je možné ovlivnit stereoselektivitu reakce efedrinu s aromatickými aldehydy. Při reakci 4-kyanbenzaldehydu nebo 4-nitrobenzaldehydu s (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinem v chloroformu vznikají na počátku reakce deriváty oxazolidinu s konfigurací 2*S*,4*S*,5*R* a 2*R*,4*S*,5*R* v poměru 1:1, zatímco při použití methanolu jako rozpouštědla je na počátku reakce jediným produktem derivát oxazolidinu s konfigurací 2*R*,4*S*,5*R*.

Výrazný vliv na rychlost vzniku derivátů oxazolidinu mají také substituenty aromatického aldehydu. Elektronodonorové substituenty rychlost zvyšují natolik, že obsah produktů kondenzace v reakční směsi vždy odpovídá rovnovážnému stavu.

Ve vodném prostředí oxazolidinové deriváty připravené z (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinu snadno hydrolyzují. Poločas hydrolyzy při 37 °C dosahuje maximálně několik minut. Během hydrolyzy se nemění konfigurace na chirálních centrech efedrinu. Z derivátů oxazolidinu obvykle při neutrálním nebo alkalickém pH hydrolyzuje rychleji *cis*-isomer (odvozený od (–)-(1*R*,2*S*)-efedrinu) než analogický *trans*-isomer odvozený od (+)-(1*S*,2*S*)-pseudofedrinu. Deriváty oxazolidinu tvoří komplexy s cyklodextriny. Tyto komplexy se hydrolyzují pomaleji. Proto je zvažováno jejich farmaceutické využití.

Tato práce vznikla za podpory GA ČR (grant č. 203/03/H140).

LITERATURA

1. Neelakantan L.: *J. Org. Chem.* **36**, 2256 (1971).
2. Neelakantan L., Molin-Case J. A.: *J. Org. Chem.* **36**, 2261 (1971).
3. Walker R., Dholakia V., Brasifield K., Bakhitar R.: *Gen. Pharmacol.* **30**, 725 (1998).
4. Walker R., Fitz L., Williams L., McDaniel Y.: *Gen. Pharmacol.* **27**, 109 (1996).
5. Walker R., Fitz L., Williams L., Linton H., Smith C.: *Gen. Pharmacol.* **24**, 669 (1993).
6. Walker R., Wood D., Akmal M., Sharks E.: *Gen. Pharmacol.* **23**, 729 (1992).
7. Beckett A. H., Jones G. R.: *Tetrahedron* **33**, 3313 (1977).
8. Agami C., Rizk T.: *Tetrahedron* **41**, 537 (1985).
9. Pelletier S. W., Mody N. V., Desai H. K., Finer-Moore J., Nowacki J., Joshi B. S.: *J. Org. Chem.* **48**, 1787 (1983).
10. Bundgaard H., Johansen M.: *Int. J. Pharm.* **10**, 165 (1982).
11. Young-Harvey J., Rae I., Pitman I.: *Int. J. Pharm.* **30**, 151 (1986).
12. Bakhatiar R., Hop C., Walker R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **729** (1997).
13. Fife T., Hutchings J.: *J. Org. Chem.* **45**, 2099 (1980).
14. McClelland R., Somani R.: *J. Org. Chem.* **46**, 4345 (1981).
15. Walker R., Ming-Ju Hang, Lesyczynski J.: *THEO-CHEM* **549**, 137 (2001).

M. Astrová, L. Kurc, and L. Červený (*Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Oxazolidine Derivatives of Ephedrine**

The knowledge of the formation of oxazolidine derivatives from ephedrine and an aromatic aldehyde and their back hydrolysis is reviewed. Their most significant potential utilization in pharmacy is based on their facile hydrolysis, which makes it possible to prepare pharmaceutical substances with retarded activity. This application depends on the configurational stability of the substance during condensation and hydrolysis.

FUKOSIDASY A OLIGOSACHARIDY OBSAHUJÍCÍ FUKOSU

EVA BENEŠOVÁ, MICHAELA MARKOVÁ,
PETRA LIPOVOVÁ a BLANKA KRÁLOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Technická 5,
166 28, Praha 6
urbankoe@vscht.cz

Došlo 9.11.04, přijato 20.12.04.

Klíčová slova: fukosidasa, fukosa, fukosidosa, cystická
fibrosa

Obsah

1. Úvod
2. Fukosidasy
3. Fukosa a glykokonjugáty obsahující fukosu
4. Fukoidan
5. Inhibitory fukosidas
6. Onemocnění související s fukosou a α -L-fukosidasou
 - 6.1. Fukosidosa
 - 6.2. Cystická fibrosa
 - 6.3. Revmatická artritida
 - 6.4. Rakovinová onemocnění
 - 6.5. Záněty
 - 6.6. Syndrom LAD
7. Závěr

1. Úvod

Alfa-L-fukosidasy jsou enzymy, které se vyskytují ve velkém množství organismů a odštěpují fukosylový zbytek z postranních řetězců oligosacharidů, glykoproteinů a glykolipidů. Účastní se mnoha důležitých metabolických procesů a jejich nedostatek je příčinou vzniku některých závažných onemocnění^{1,2}. Glykokonjugáty obsahující fukosu mají mnoho zajímavých biologických vlastností. Vyskytují se v úloze receptorů buněčného povrchu nebo růstových regulátorů, účastní se mezibuněčných interakcí, hraje důležitou roli jako antigenní determinanty a jsou nezbytné pro správnou funkci imunitního systému. Jejich chemická syntéza je velmi náročná, a proto se intenzivně studuje možnost jejich přípravy pomocí enzymů schopných katalyzovat transglykosylační reakce. Úspěch v této oblasti by umožnil lepší dostupnost mnoha látek potenciálně využitelných v medicíně³.

2. Fukosidasy

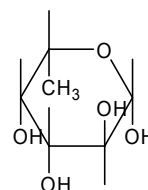
α -L-Fukosidasy (EC 3.2.1.51) jsou obecně rozšířené enzymy řazené do třídy hydrolas. Jedná se o exoglykosidasy, které odštěpují z neredukujících konců postranních řetězců oligosacharidů, glykoproteinů a glykolipidů fukosylový zbytek za vzniku fukosy a alkoholu^{1,4}. Glykosidasy se obecně dělí do 97 rodin na základě podobnosti primární struktury v okolí aktivního místa. α -L-Fukosidasy byly zařazeny pouze do dvou rodin, a to 29 a 95. Enzymy řazené do rodiny 29 katalyzují reakci způsobem, při kterém si produkt zachovává stejnou konfiguraci vazby, jako měl substrát, zatímco u enzymů z rodiny 95 tato konfigurace zachována nezůstává^{5,6}.

Výskyt α -L-fukosidas byl potvrzen u mnoha různých organismů včetně bakterií, plísní, měkkýšů, řas, rostlin a savců⁴ a bylo zjištěno, že substrátová specifita závisí na zdroji, ze kterého jednotlivé enzymy pocházejí. Obvykle platí, že fukosidasy savčích tkání mají širší substrátovou specifitu než jejich mikrobiální protějšky³.

Význam těchto enzymů spočívá v účasti na metabolismu mnoha biologicky aktivních molekul obsahujících L-fukosu a jejich nedostatek může být příčinou některých závažných onemocnění. Kromě toho jsou fukosidasy využívány při studiu struktury a funkce různých glykokonjugátů⁷. Vzhledem k tomu je s podivem, jak málo pozornosti jim bylo dosud věnováno, zvláště pak mechanismu jejich působení.

3. L-Fukosa a glykokonjugáty obsahující L-fukosu

L-Fukosa neboli 6-deoxy-L-galaktosa (obr. 1) je jeden z monosacharidů obvykle přítomných v glykokonjugátech jako jsou glykoproteiny a glykolipidy^{2,8,9}. Vyskytuje se převážně v α -anomerické konfiguraci a bývá připojena různými typy vazeb, např. α -(1,2) vazbou na D-galaktosu, nebo α -(1,3), α -(1,4), α -(1,6) vazbou na acetyl-D-glukosamin^{10,11}. Takto připojené zbytky se nejčastěji vyskytují na koncích sacharidových řetězců, což umožňuje jejich odštěpování fukosidasami⁴.



Obr. 1. Haworthův vzorec α -L-fukosy⁸

L-Fukosa patří mezi obtížně dostupné sacharidy, a proto jsou ověřovány různé metody, které by umožnily její jednoduché získávání. Jednou z těchto metod je např. hydrolýza fukoidanu neboli komplexní struktury sestávající ze sulfatovaných L-fukosových jednotek produkované některými řasami. Pro produkci L-fukosy touto hydrolýzou byly použity fukoidany produkované řasami *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosus* nebo *Ascophyllum nodosum*. Další možností produkce L-fukosy je přímá chemická syntéza, při které se využívá různých běžně se vyskytujících sacharidů, jako je L-arabinosa, D-glukosa, methyl-L-rhamnosa, D-mannosa nebo D-galaktosa. Byla testována i enzymová syntéza L-fukosy, při které jako výchozí sloučeniny sloužily dihydroxyacetonfosfát a lactaldehyd. Jako zdroj fukosy je také možno využít přímo fukosu obsahující polysacharidy a lipopolysacharidy některých bakterií. Chemická syntéza je velmi obtížná a drahá, stejně tak i extrakce z rostlinných a živočišných tkání, kde je situace ještě komplikována dostupností zdrojových materiálů².

Vyvinutí snadné a levné metody produkce fukosy je v současné době důležitým cílem, neboť její vlastnosti ji předurčují k aplikaci v různých medicínských odvětvích. Např. bylo zjištěno, že pokud by bylo tělo uměle zásobováno tímto sacharidem, mohlo by dojít k zamezení vazby lektinů na bakteriálním povrchu na sacharidové receptory hostitelských buněk, a tím k zeslabení nebo úplnému potlačení infekce¹⁰. L-Fukosa našla uplatnění i v kosmetice. Byl objeven extracelulární bakteriální polysacharid sestávající z L-fukosy, D-galaktosy a galakturonové kyseliny, který je schopen vytvořit ochranný film ochraňující pokožku před vstupem látek způsobujících podráždění¹². V současné době je distribuován pod názvem Fucogel 1000. Dále bylo potvrzeno, že L-fukosa má schopnost potlačovat kožní alergickou reakci^{2,9,10}.

Glykoproteiny a glykolipidy obsahující L-fukosylový zbytek na neredukujícím konci jsou známy jako důležité složky mezibuněčné komunikace, jako receptory buněčného povrchu nebo jako růstové regulátory^{3,9,13}. Mimo to obecně platí, že cukerná složka glykoproteinu ovlivňuje jeho stabilitu, kinetické vlastnosti, svinování, intracelulární transport i sekreci¹.

V lidském organismu se glykokonjugáty obsahující L-fukosu vyskytují velmi hojně. Byly detegovány např. v mozku a na synaptických spojích, což naznačuje roli v přenosu signálu, v proximálních tubulech ledvin, ve fotoreceptorové vrstvě oční sítnice, v epidermálních buňkách kůže, v endotelu žláz a cév, v makrofázích a v antigenech červených krvinek, čehož je využíváno při rozlišování krevních skupin. Důležitou roli nepochybně hrají i v reprodukčním procesu^{4,9,10}. Dále byly L-fukosylované glykokonjugáty detegovány v mateřském mléce, kde byla prokázána jejich schopnost inhibovat vazbu patogenů v trávicím traktu kojenců na specifické receptory, a tím zamezovat infekci buňky. Příkladem takto inhibovaných patogenů mohou být některé kmeny bakterie *Escherichia coli* nebo *Campylobacter jejuni*¹⁴. Také přítomnost glykokonjugátů na povrchu bakteriálních buněk hraje důležitou roli v rozpoznávání a imunitní odpovědi vyšších organis-

mů na infekci.

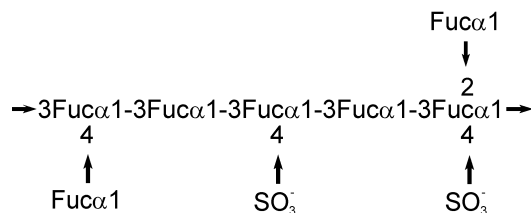
L-Fukopyranosylové jednotky se také vyskytují v rostlinných polysacharidech, kde mohou být v některých případech methylované. Dále jsou součástí již dříve zmiňovaného polysacharidu chaluhy (fukoidanu) a extracelulárních polysacharidů bakterií, hub a mikrořas².

Vzhledem k významu glykokonjugátů obsahujících fukosu bylo provedeno mnoho chemických syntéz, které měly napomoci objasnění jejich biologické funkce. Vedle studia mnoha struktur vyskytujících se v přírodě byla testována i syntéza konjugátů nových^{4,15}. Chemický způsob syntézy glykokonjugátů je ovšem velmi komplikovaný, a proto se využívá i možnosti aplikace fukosidas, schopných katalyzovat transglykosylační reakce. Výhodou použití těchto enzymů je jejich vysoká stereo- a regioselektivita a také fakt, že pro reakci nejsou potřebné drahé kofaktory ani donory přenášeného L-fukosylového zbytku. Schopnost katalyzovat transglykosylační reakce byla detegována například u fukosidas pocházejících z prasečích jater, hovězích ledvin, z tkání šneka *Ampullaria*, z plísní *Aspergillus niger* a *Penicillium multicolor* a bakterií *Alcaligenes* sp a *Corynebacterium* sp. Jako donor L-fukosylového zbytku byl používán *p*-nitrofenyl- α -L-fukopyranosid nebo α -L-fukopyranosyl fluorid, jako akceptory sloužily D-galaktosa, D-glukosa a acetyl-D-glukosamin^{3,11,15,16}.

4. Fukoidan

Některé chaluhy jsou schopné syntetizovat komplexní polysacharidové struktury, složené ze sulfatovaných L-fukosových polymerů, zvané fukoidany. V těchto strukturách byly detegovány různé typy glykosidických vazeb a cílené studie prokázaly, že struktura fukoidanů může být velmi komplikovaná¹⁷ (obr. 2). Pro extrakci fukoidanu jsou používány například chaluhy *Ecklonia kurome*, *Laminaria angustata* var *longissima*, *Fucus vesiculosus*, *Kjellmaniella crassifolia*, *Pelvetia canaliculata* a *Fucus serratus* L (cit.²).

Po zjištění, že fukoidan má mnohé medicínsky významné vlastnosti a zároveň nepůsobí toxicky ani dráždivě na lidský organismus, začala být této sloučenině věnována výrazná pozornost. Byl prokázán inhibiční účinek na adhezi bakteriálních buněk na buňky hostitelské¹⁸, antivirální



Obr. 2. Příklad struktury fukoidanu z *Fucus vesiculosus*¹⁷

působení proti herpes simplex viru a lidskému cytomegaloviru, potvrzeny byly i antikoagulační a antitrombotické schopnosti¹⁹ a protinádorové působení vyvolávající samodestrukci nádorových buněk bez poškozování buněk zdravých²⁰. V současné době je snaha o detailní pochopení struktury a mechanismu působení fukoidanu, neboť to by mohlo vést k novým možnostem léčby některých onemocnění.

5. Inhibitory fukosidas

Fukosidas se spolu s dalšími enzymy účastní metabolismu glykokonjugátů obsahujících fukosu, a proto jsou inhibitory těchto enzymů důležitým nástrojem při studiu biologických procesů zahrnujících fukosylované glykokonjugáty^{21,22}. Aplikace inhibitorů ke kontrole a modulaci buněčných procesů ovšem není jejich jediné možné využití. Jsou důležité i pro studium reakčního centra enzymu nebo mechanismu, kterým enzymy katalyzují příslušné reakce²³. Neméně významná je i jejich role jako potenciálních látek při léčbě různých nemocí, jako jsou cukrovka, rakovina, virální infekce včetně AIDS nebo fukosidosa²³⁻²⁵. Inhibitory reálně využitelné v medicíně však musí splňovat mnoho zásadních požadavků, mj. netoxický vliv na lidský organismus a enzymovou specifitu²¹. Proto v současné době roste snaha o získání jednoduchého způsobu přípravy velkého množství různých inhibitorů, jejichž vlastnosti by následně mohly být testovány v lékařské praxi.

6. Nemoci související s fukosou a α -L-fukosidasou

S α -L-fukosidasami a L-fukosou souvisí mnohá závažná onemocnění. Některá z nich jsou způsobena defektní nebo úplně chybějící α -L-fukosidasou, u jiných jsou změny fukosylace pouze doprovodným jevem. Je ovšem nutné si uvědomit, že změny v glykosylacích byly detegovány i např. v těhotenství a nemusí tedy být v každém případě indikátorem některého z níže uvedených onemocnění¹⁰.

6.1. F u k o s i d o s a

Fukosidosa je velmi vzácné dědičné lysosomální onemocnění, které je způsobeno nedostatkem α -L-fukosidasy a jedná se tedy o vrozenou vadu metabolismu, která specificky ovlivňuje lysosomální trávení. Dochází k abnormálnímu ukládání glykokonjugátů obsahujících L-fukosu v mnoha tělních orgánech, jako jsou játra, slezina, srdce, brzlík, štítná žláza, ledviny nebo mozek^{23,26-28}.

Nedostatek α -L-fukosidasy je způsoben mutacemi v genu FUCA 1, lokalizovaném na chromosomu 1. V současné době bylo popsáno přibližně dvacet různých mutací tohoto genu^{28,29}.

Nemoc se dělí na dva nebo tři typy. Při dvoutypovém dělení je pro klasifikaci rozhodující síla projevu jednotli-

vých symptomů. Typem 1 je nazýván těžší průběh nemoci a první projevy se objevují přibližně v 6 měsících života. Smrt pacienta pak nastává během prvních deseti let života. Průběh nemoci je provázen neurologickou degenerací, retardací růstu a deformacemi kostí, zvětšením útrobních orgánů, ztrátou dříve získaných intelektuálních vlastností a chybou funkcí některých orgánů²⁶⁻²⁸. Typem 2 je označována lehčí forma nemoci a vyskytuje se u většiny pacientů. Průběh degenerace je zde výrazně pomalejší, je provázen tvorbou angiokeratomu a pacienti se v některých případech dožívají až čtvrté dekády života²⁶⁻²⁸.

Při klasifikaci nemoci do tří typů je rozhodujícím faktorem věk, ve kterém se příznaky nemoci objeví. U typů 1 a 2 dochází k vypuknutí nemoci v 10 resp. 18 měsících života. Typem 3 je i zde označována mírnější forma nemoci^{26,28}.

Nemoc je diagnostikována stanovením enzymové aktivity α -L-fukosidasy v moči, leukocytech, fibroblastech a případně dalších tkáních. V současné době je možná i prenatální diagnostika. Dosud však neexistuje žádná specifická terapie³⁰.

6.2. C y s t i c k á f i b r o s a

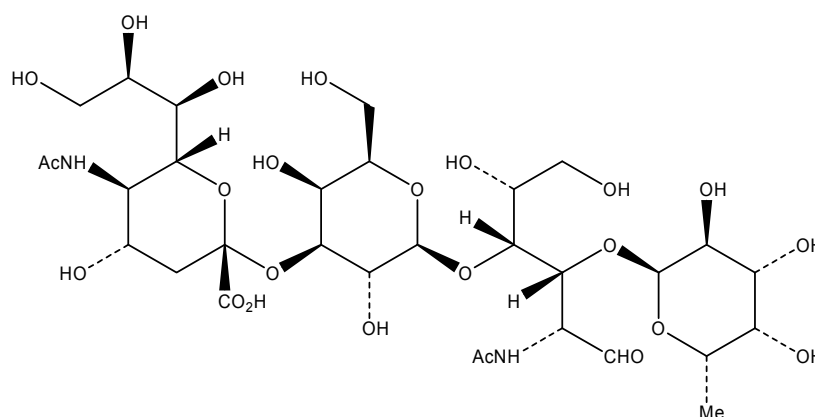
Cystická fibrosa je nejčastější smrtelné genetické onemocnění mezi bělochy. Příčinou tohoto onemocnění je poškození genu CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který kóduje transmembránový protein sloužící jako kanál pro přechod iontů Cl⁻ (cit.³⁰). Bylo identifikováno více než 900 možných mutací, které byly rozděleny do několika tříd podle efektu na expresi, následnou modifikaci a funkci proteinu^{31,32}.

Při poškození genu CFTR dochází k narušení výměny chloridových iontů, sodných iontů a molekul vody a v poškozených orgánech vzniká abnormálně hustý hlen³³. V plicích je znemožněno dokonalé a rychlé odstraňování nečistot a mikroorganismů a dochází ke kolonizaci bakteriemi. Nejčastěji se jedná o bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Kolonizace je podporována i zvýšenou koncentrací sodíku a chloru v tekutině na povrchu dýchacích cest, neboť dochází k inaktivaci některých peptidů, u nichž byly prokázány antimikrobiální vlastnosti³⁰.

Při cystické fibrose jsou ovšem zasaženy i orgány trávicího traktu. Dochází k omezení průchodnosti slinivky břišní, čímž je znemožněn přístup některých trávicích enzymů do střev. Živiny proto zůstávají nevyužity, dochází k negativnímu ovlivnění růstu pacientů, k úbytku na hmotnosti a k postupnému zhoršování celkového stavu. Různé komplikace se ovšem mohou vyskytnout téměř ve všech tělních systémech a průběh nemoci je u jednotlivých pacientů odlišný³³.

U pacientů s cystickou fibrosou byly zjištěny změny v glykosylaci některých glykokonjugátů. Zaznamenána byla zvýšená fukosylace a/nebo snížená sialylace^{31,32}. Zvýšený výskyt L-fukosylových zbytků může být následkem snížené aktivity enzymu α -L-fukosidasy^{9,32}.

Cystická fibrosa patří v současné době mezi neléčitelné choroby, existují však inhalační a rehabilitační terapie, které napomáhají zlepšení kvality života pacientů. I přes



Obr. 3. Struktura tetrasachridu Sialyl Lewis X

několikrát denně opakovanou terapii se však onemocnění s věkem zhoršuje. Proto je v současné době prováděno několik studií genové terapie, která by měla umožnit vložení nepoškozené DNA genu CFTR do buněk respiračního traktu. Jiným přístupem k léčbě této nemoci by mohla být aplikace metod plicní transplantace^{30,33}.

6.3. Revmatická artritida

Revmatická artritida je jedna z nejběžnějších forem artritidy. Jedná se o poměrně běžné onemocnění, které napadá celé tělo a při kterém dochází k zánětům vnitřní vrstvy kloubního pouzdra. Příčina této nemoci nebyla ještě přesně zjištěna, ale je známo, že jde o autoimunitní onemocnění, kdy chybná funkce imunitního systému vyústí v napadení vlastních zdravých kloubních tkání, vzniká zánět a může dojít až k úplnému zničení chrupavky kosti případně okolních tkání. Průvodními znaky této nemoci jsou bolesti a ztuhlost kloubů, zarudnutí a otoky^{34,35}.

Analýzou vzorků pacientů trpících revmatickou artritidou byl zjištěn vztah mezi snižujícím se obsahem L-fukosy v séru a dobou trvání nemoci, počtem napadených kloubů a narušením kostí. Obsah L-fukosy v séru může tedy být indikátorem postupu nemoci².

6.4. Nádorová onemocnění

Změny ve fukosylaci molekul, jako jsou oligosacharidy, glykoproteiny a glykolipidy, byly zjištěny ve tkáních pacientů trpících rakovinovými onemocněními^{5,9}. Tento jev souvisí s aktivitou fukosyltransferasy, jejíž několikanásobně zvýšená aktivita byla detegována v séru pacientů s maligním či metastatickým nádorovým onemocněním. Mimo to bylo ověřeno, že v moči pacientů s diagnostikovanou rakovinou je výrazně vyšší hladina volné L-fukosy než u kontrolních vzorků². Tím se naskytá možnost využívat stanovení fukosyltransferasové aktivity k predikci a včasné diagnostice nádorových onemocnění¹³.

Během studia nádorových onemocnění bylo zjištěno, že ne všechny nádorové buňky jsou schopné metastatického šíření tělem. Za toto šíření je ve skutečnosti zodpovědná jen malá skupina buněk a významnou roli v tomto pro-

cesu hrají glykokonjugáty na povrchu buněk, neboť se účastní adhesních procesů. Např. byl na povrchu plicních buněk identifikován protein vážící α -L-fukosu, u kterého se předpokládá účast na adhesi buněk šířících se z místa vzniku primárního nádoru, neboť na povrchu některých nádorových buněk byl prokázán vysoký obsah fukosy. Intenzivně je nyní studována možnost zamezení metastatického šíření aplikací specifických cukrů a glykokonjugátů. V úvahu přichází mimo jiné i L-fukosa nebo fukoidan. Jejich účinkem by mělo dojít k zablokování proteinů vážících fukosu pro interakci s nádorovými buňkami⁹. Celou situaci ovšem opět komplikuje finanční stránka věci. L-Fukosa patří v současné době mezi poměrně drahé chemikálie a stejně tak výroba různých derivátů obsahujících fukosu není zatím dokonale vyřešena. Tím se opět potvrzuje význam testování různých způsobů získávání fukosy a jejich sloučenin².

6.5. Záněty

V zánětlivých procesech hraje důležitou roli tetrasacharid Sialyl Lewis X (SLeX). Jde o komplexní molekulu vyskytující se na povrchu leukocytů, složenou ze čtyř specificky k sobě vázaných sacharidů – sialové kyseliny, D-galaktosy, N-acetyl-D-glukosaminu a L-fukosy (obr. 3). Na tento antigen se váže specifický protein selektin, který je při porušení tkáně produkován na povrchu cév jako signál o poškození. Dochází k expanzi cév a k přechodu bílých krvinek do místa porušení tkáně. Stejný mechanismus komplikuje například operace zahrnující transplantace orgánů, neboť velké množství bílých krvinek je schopno zničit i nově implantovaný zdravý orgán. Řešením by mohla být aplikace SLeX do krevního řečiště, čímž by se zablokovala možnost vazby selektinu na SLeX bílých krvinek a tedy se skryl signál o porušení tkáně. Stejně tak se předpokládá, že aplikace struktur podobných SLeX by mohla být užitečná při léčbě nádorů šířících se metastaticky. Chemická syntéza této sloučeniny je velmi nákladná, v současnosti již ale byly vyvinuty i méně finančně náročné enzymové způsoby přípravy².

6.6. Syndrom LAD

Jako syndrom LAD (leukocyte adhesion deficiency) je označována vzácná metabolická choroba, při které dochází k poruchám produkce proteinu CD18, který je nezbytný pro migraci bílých krvinek do místa poranění či infekce. Porucha produkce se může projevit buď jako nedostatečné množství aktivního proteinu nebo jako vznik proteinu defektního. I u této choroby byla zjištěna snížená fukosylace některých glykokonjugátů^{9,36}.

7. Závěr

Fukosidasy i samotná L-fukosa mají v živých organismech svou nezastupitelnou roli. Účastní se mnoha důležitých procesů nezbytných pro správnou funkci organismu a jejich nedostatek může být příčinou některých závažných onemocnění. Mnoho otázek týkajících se fukosidas a glykokonjugátů obsahujících L-fukosu zůstává ještě stále nezodpovězených. Není vyřešen přesný mechanismus působení jednotlivých enzymů a nejsou většinou známy aminokyseliny účastníci se katalytické reakce v aktivním centru. Z toho důvodu je důležitý i vývoj potenciálních substrátů a inhibitorů fukosidas. Ani vliv jednotlivých glykokonjugátů na lidský organismus není podrobně prozkoumán, nehledě na to, že chemická i enzymová syntéza nových strukturních typů nabízí nepřeborné množství sloučenin potenciálně využitelných v léčebných terapiích. Snaha o poznání by ovšem neměla být zaměřována pouze na lidskou α -L-fukosidasu a na glykokonjugáty obsahující L-fukosu, ale i na enzymy a sloučeniny prokaryotní, kvassinkové a rostlinné. Jejich specifické vlastnosti by totiž mohly být užitečné při syntéze různých sacharidových struktur a při vývoji nových léčebných postupů.

LITERATURA

- De Carlos A., Montenegro D., Alonso-Rodríguez A., de la Cadena M. P., Rodríguez-Berrocal F. J., Martínez-Zorzano V. S.: *J. Chromatogr.*, B 786, 7 (2003).
- Vanhooren P. T., Vandamme E. J.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 479 (1999).
- Farkas E., Thiem J., Ajisaka K.: *Carbohydr. Res.* 328, 293 (2000).
- Berteau O., Bielicki J., Kilonda A., Machy D., Anson D. S., Kenne L.: *Biochemistry* 43, 7881 (2004).
- Tarling Ch. A., He S., Sulzenbacher G., Bignon Ch., Bourne Y., Henrissat B., Withers S. G.: *J. Biol. Chem.* 278, 47394 (2003).
- <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>, staženo 11. listopadu 2004.
- Tsuji Y., Yamamoto K., Tochikur T.: *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 928 (1990).
- <http://www.biorama.ch/biblio/b20gfach/b35bchem/b10kh/kh020.htm>, staženo 12. listopadu 2004.
- http://www.glycoscience.com/glycoscience/document_viewer.wm?FILENAME=F002, staženo 18. listopadu 2004.
- <http://www.innvista.com/health/nutrition/essensug/fucose.htm>, staženo 19. října 2004.
- Ajisaka K., Fujimoto H., Miyasato M.: *Carbohydr. Res.* 309, 125 (1998).
- http://www.eucerin.co.uk/product_info/actives.html, staženo 16. listopadu 2004.
- Cobucci-Ponzano B., Trincone A., Giordano A., Rossi M., Moracci M.: *J. Biol. Chem.* 17, 14622 (2003).
- Ruiz-Palacios G. M., Cervantes L. E., Ramos P., Chavez-Munguia B., Newburg D. S.: *J. Biol. Chem.* 278, 14112 (2003).
- Murata T., Usui T.: *Trends in Glycosci. Glycotechnol.* 12, 161 (2000).
- Koeller K. M., Wong CH.-H.: *Chem. Rev.* 100, 4465 (2000).
- <http://www.bentham.org/sample-issues/cmcaiaa1-1/flier/fig5.gif>, staženo 16. listopadu 2004.
- Matsumoto S., Nagaoka M., Hara T., Kimura-Takagi I., Mistuyama K., Ueyama S.: *Clin. Exp. Immunol.* 136, 432 (2004).
- Lee J. B., Hayashi K., Hashimoto M., Nakano T., Hayashi T.: *Chem. Pharm. Bull.* 52, 1091 (2004).
- <http://www.naturodoc.com/library/detox/U-Fucoidan.htm>, staženo 12. listopadu 2004.
- Gerber-Lemaire S., Popowycz F., Rodriguez-García E., Schütz C., Carmona Asenjo A. T., Robina I., Vogel P.: *Arkivoc.* 2002, 23.
- Gu G., Du Y., Hu H., Jin Ch.: *Carbohydr. Res.* 338, 1603 (2003).
- Asano N., Yasuda K., Kizu H., Kato A., Fan J. Q., Nash R. J., Fleet G. W. J., Molyneux R. J.: *Eur. J. Biochem.* 268, 35 (2001).
- Tite T., Lallemant M. Ch., Poupon E., Kunesch N., Tillemont F., Gravier-Pelletier Ch., Le Merrer Y., Husson H. P.: *Bioorg. Med. Chem.* 12, 5091 (2004).
- Ogawa S., Maruyama A., Odagiri T., Yuasa H., Hashimoto H.: *Eur. J. Org. Chem.* 2001, 967.
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=OMIM&dopt=Detailed&tmpl=dispomimTemplate&list_uids=230000, staženo 18. září 2004.
- http://my.webmd.com/hw/health_guide_atoz/nord1095.asp, staženo 18. září 2004.
- Galluzzi P., Rufa A., Balestri P., Cerase A., Federico A.: *Am. J. Neuroradiol.* 22, 777 (2001).
- Önenli-Mungan N., Özer G., Altunbaşak Ş., Besley G., Yüksel B., Topaloğlu A. K., Soyupak S.: *Turk. J. Pediatr.* 46, 170 (2004).
- http://nova.medicina.cz/verejne/clanek.dss?s_id=2079&s_rub=0&s_sv=91&s_ts=38279,3774768518, staženo 19. října 2004.
- Glick M. C., Kothari V. A., Liu A., Stoykova L. I., Scanlin T. F.: *Biochimie* 83, 743 (2001).
- Maler T., Duthie M., Riordan J. R.: *FEBS Lett.* 121, 153 (1980).
- <http://www.cfklub.cz/?pageid=1&nid=2>, staženo 19. října 2004.
- <http://www.arthritis.org/conditions/DiseaseCenter/>

ra.asp, staženo 21. října 2004.

35. <http://www.healthnowny.com/kbase/topic/special/hw86269/sec1.htm>, staženo 21. října 2004.
36. <http://www.ladinfo.org/>, staženo 27. října 2004

E. Benešová, M. Marková, P. Lipovová, and B. Králová (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Fucosidase and Fucose-Containing Glycoconjugates**

α -L-fucosidase, an important exoglycosidase, is involved in the metabolism of fucose-containing glycoconju-

gates. The deficiency of the enzyme causes some incurable diseases, such as fucosidosis. Fucose-containing glycoconjugates are essential, as they are involved in several processes such as inflammation, reproduction, cell-cell interaction, signal transduction, growth regulation, and ligand-receptor interaction. The knowledge of fucosidase (its active site and catalytic mechanisms) and of fucose-containing glycoconjugates is not yet complete. At present, some uncomplicated methods for synthesis of fucose and fucose-containing glycoconjugates are sought, as the compounds can find some applications in therapy of severe diseases, such as cancer. For the synthesis of fucose-containing glycoconjugates, fucosidases with the ability to catalyze transglycosylation reaction can be used.



VÚFB a.s.

U kabelovny 130, 102 01 Praha 10

si Vás dovoluje pozvat na 5. odbornou konferenci s mezinárodní účastí

„Moderní metody v syntéze a analýze aktivních farmaceutických substancí“

Konference se koná ve dnech 23. a 24. listopadu 2005 v kongresovém sále Obchodního centra firmy Zentiva, U kabelovny 130, Praha 10.

Tématické okruhy letošní konference jsou:

- asymetrické reakce, enantioselektivní katalýza,
- enzymatické metody v přípravě opticky aktivních látek,
- pokroky v syntéze ve vybraných skupinách léčiv,
- moderní analytické metody v hodnocení aktivních farmaceutických substancí.

Program bude upřesněn v červenci 2005 na stránkách www.vufb.cz.

Přihlášky či své dotazy prosím zasílejte na schneiderova@zentiva.cz (tel. 267 243 705).

Za organizační výbor konference
Ing. Miroslav Kuchař, DrSc.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

CHARAKTERISTIKA TLAKOVÝCH FLUKTUACÍ V RŮZNÝCH REŽIMECH SUSPENZÍ PLYN – TUHÁ LÁTKA

OTAKAR TRNKA, MILOSLAV HARTMAN
a VÁCLAV VESELÝ

Ústav chemických procesů, Akademie věd České republiky,
Rozvojová 135, 165 02 Praha 6
trnka@icpf.cas.cz

Došlo 25.8.03, přepracováno 8.4.04, přijato 29.4.04.

Klíčová slova: tlakové fluktuace, pracovní režimy fluidních vrstev, suspenze plyn - tuhá látka

Úvod

Fluidizace je důležitou průmyslovou operací již desítky let. Mezi první technologie, ve kterých byla fluidní vrstva úspěšně aplikována, patří např. fluidní krakování uhlovodíků a zplyňování nebo spalování hnědého uhlí^{1,2}.

Fluidní vrstva umožňuje účinný kontakt mezi zrnitými materiály a vertikálně proudící fluidační tekutinou, kterou bývá nejčastěji plyn. Způsob fluidizace nebo hydrodynamický režim fluidních vrstev je velice proměnlivý. Je ovlivňován hlavně fyzikální charakteristikou částic a rychlostí proudění fluidačního média. Významný je též vliv geometrie fluidní kolony či reaktoru.

Rozdílné režimy fluidní vrstvy lze podle rostoucí rychlosti plynu rámcově seřadit následovně: nehybná vrstva, bublinové fluidace, pístová fluidace, turbulentní případně rychlá fluidace a pneumatický transport. Podrobně jsme se stavy v systémech tuhá látka – plyn zabývali ve svých dřívějších pracích^{3,4}. Hydrodynamické chování těchto systémů je velmi složité. S výjimkou několika silně zjednodušených případů není potřebný hydrodynamický popis dosud dostupný. Přechody mezi jednotlivými režimy nejsou obvykle ostré a až na některé výjimky jsou stanovány vizuálním pozorováním.

Užitečné informace o hydrodynamice systému lze získat ze studia fluktuací tlaku uvnitř vrstvy. Je zřejmé, že tlakové fluktuace jsou vyvolávány vznikem a pohybem bublin (plynných kapes) a shlukem částic ve vrstvě. Na druhé straně řada detailů kolem šíření tlakových vln ve vrstvě zůstává nejasná⁵⁻⁸.

Ve své dřívější práci⁸ jsme navrhli flukтуаční model

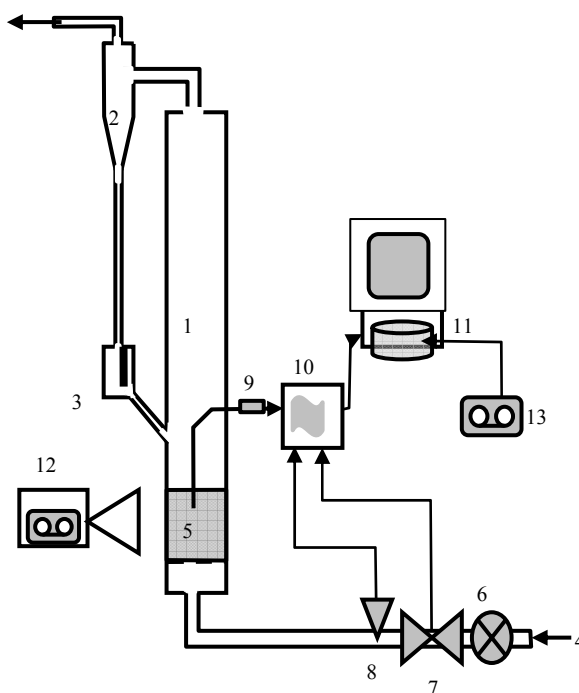
fluidní vrstvy, odvozený na základě průběhu vlastností spektrálních parametrů tlakových fluktuací v sledované vrstvě během změny průtoku plynu od nulové hodnoty až k průtokům, za nichž dochází k trvalému úletu částic z vrstvy. Cílem této práce je určit vztahy mezi fyzikálními stavy vrstvy a její flukтуаční charakteristikou plynoucí z výše zmíněného modelu.

Experimentální část

Aparatura

Celkové uspořádání experimentálního zařízení je schematicky znázorněno na obr. 1.

Základním fluidním prostorem je skleněný válec o průměru 8 cm a výšce 600 cm. Přívod vzduchu je realizován spodem přes kruhový rošt s propustnou plochou cca 12 %. Rošt zaručuje nepropustnost částic od 0,1 mm výše. V horní části je zařízení ukončeno odlučovačem částic (cyklonem). Z něj jsou částice po úletu vedeny zpět přes fluidní uzávěr do kolony cca 60 cm nad rošt.



Obr. 1. Experimentální systém; 1 – reaktor, 2 – cyklon, 3 – fluidní uzávěr, 4 – přívod vzduchu, 5 – fluidní vrstva, 6 – uzávěr vzduchu, 7 – průtokoměr, 8 – teploměr, 9 – tlakové čidlo, 10 – analogově-digitální převodník, 11 – počítač, 12 – digitální videokamera, 13 – záznam na digitální videopáse

Přívod vzduchu je regulován elektricky ovládaným uzávěrem. Zdrojem plynu je centrální rozvod tlakového vzduchu (0,4–0,5 MPa), který umožňuje dosahovat ve fluidním prostoru lineární rychlosti plynu U až 4 m s^{-1} . Aktuální rychlost U plynu je měřena clonovým průtokoměrem. Současně je elektrickým teploměrem o rozsahu 0 až $200 \text{ }^\circ\text{C}$ měřena teplota T přiváděného vzduchu. Průtok i teplota jsou v analogovém tvaru vedeny na vstup analogově-digitálního převodníku.

Tlak plynu P ve vrstvě je snímán ve středu válce 4 cm nad roštem. Měděná trubička průměru 5 mm je vyvedena gumovou propustí mimo skleněný válec. Na jejím konci je připevněno tlakové čidlo s rozsahem 0–100 kPa. Analogový signál je veden z čidla na vstup analogově-digitálního převodníku.

Analogové signály, reprezentující okamžitý stav průtoku, teploty a tlaku jsou po převodu do digitální formy on-line zpracovávány počítačem.

Fluidní prostor je během experimentů snímán digitální videokamerou se záznamem na pásky DVD. Po ukončení experimentu lze záznamy počítačem zpracovat na kratší videoklipy.

Pracovní postup

S cílem srovnat vlastnosti fluktuací plynu ve fluidních vrstvách pro různé materiály byla provedena série experimentů, a to v unifikovaném provedení. Přehled zkoumaných materiálů je uveden v tabulce I.

Pro každý materiál byly pořízeny tři řady měření, a to pro klidové objemy m vrstvy 400, 700 a 1000 ml. Tyto objemy odpovídají výškám vrstvy cca 8, 14 a 20 cm. Každá experimentální řada je reprezentována 30 až 35 experimentálními body, které odpovídají diskrétně vzrůstajícím rychlostem vzduchu od 0 až do cca $3,8 \text{ m s}^{-1}$. Měření v každém experimentálním bodě bylo zahájeno až po ustálení stavu sledovaného systému. Probíhala při teplotách vzduchu $20\text{--}21 \text{ }^\circ\text{C}$.

Během měření v jednom experimentálním bodě byly digitalizované hodnoty tlaku P , rychlosti plynu U a teploty T snímány bez přerušení do vnitřní paměti počítače. Délka snímání činila 64 s při počtu 512 vzorků za sekundu. Současně byla po celou dobu snímání pořizována digitální videokamerou obrazová sekvence, zaznamenávající vizuálně děj, probíhající ve fluidní vrstvě během měření. Po uplynutí intervalu 64 s bylo snímání přerušeno, přečtené hodnoty přepočteny podle kalibrační tabulky a výsledná data uložena jako jediný soubor na pevný disk počítače.

Po ukončení experimentu na jedné experimentální řadě byla pořízená data doplněna protokolem o experimentu a uložena do archivu na nezávislá velkokapacitní média.

Protokol experimentu obsahuje tyto parametry – název experimentu, název a frakčnost zkoumaného materiálu, objem a výšku vrstvy v klidovém stavu, hmotnost vrstvy a prahovou rychlost daného materiálu. Prahová rychlost (práh fluidace) byla určena pro každý materiál předem nezávislým experimentem.

Tabulka I
Charakteristika použitých zrnitých materiálů

Veličina	Balotina	Vápenec	Keramzit
Velikost částic, mm	0,8–1	0,5–0,65	1–1,25
Střední velikost částic, mm	0,9	0,575	1,125
Hustota částic, kg m^{-3}	2510	2700	1490
Sypná hustota ρ_v , kg m^{-3}	1570	1390	780
Tvar a povrch částic	kulový, hladký povrch	nepravidelný, povrch hladký	nepravidelný, povrch nerovný
Práh fluidace U_{mf} , m s^{-1} ^a	0,50	0,15	0,51
Počátek turbulentní fluidace U_{turb} , m s^{-1} ^b	0,97	0,70	1,11
Počátek řídké vrstvy U_{dil} , m s^{-1} ^b	2,06	1,22	1,44
Počátek trvalého úletu U_{out} , m s^{-1} ^b	3,50	2,53	2,80

^a Stanoveno klasickou metodou tlakové ztráty, ^b stanoveno na základě fluktuční charakteristiky

Zpracování experimentálních dat

Pro účely určování vztahu mezi fluktuacemi plynu ve fluidních vrstvách na jedné straně a jim odpovídajících fluidních režimů na straně druhé byla zvolena metoda fluktučních charakteristických křivek, popsána v cit.⁸, založená na spektrální analýze tlakových fluktuací. Jejím základem je zpracování časových řad metodou diskrétní Fourierovy transformace (dále FFT), která je uvedena například v cit.⁹.

Experiment je zpracováván postupně po jednotlivých experimentálních bodech, odpovídajících určitým rychlostem U proudění plynu. Podél sekvence hodnot tlaku P délky 64 s (U konstantní) je postupně posunováno časové okno o délce 4 s, a to s krokem posuvu 1 s. Původních 2048 vzorků připadajících na časový interval 4 s je redukováno postupným průměrováním na počet 512 vzorků. Na datovou řadu každého okna je aplikován algoritmus FFT. Obdržíme 256 hodnot c_i (komplexních čísel), která reprezentují hodnoty spektrálních čar z oboru frekvencí $f_i \in [f_{min}, f_{max}]$, kde $f_{min} = 0,25 \text{ Hz}$ a $f_{max} = 64 \text{ Hz}$. Komplexní spektrum je přepočteno na spektrum amplitudové ($a_i = |c_i|$). Amplitudy a_i jsou následně seříděny sestupně podle svých hodnot.

Pro vlastní vyhodnocení je třeba spočítat následující veličiny:

Medián f_M setříděného spektra je definován jako

$$f_M = f_{i_M} \quad (1)$$

kde i_M splňuje podmínku

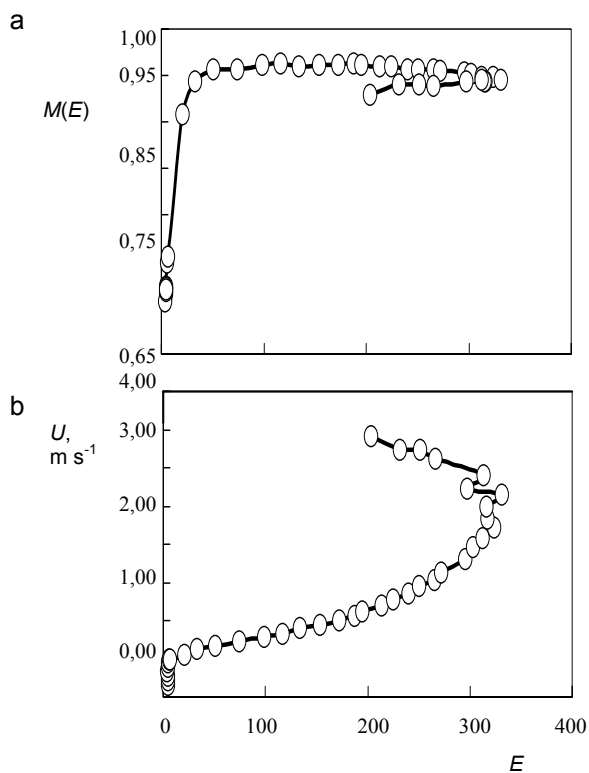
$$\sum_{i=1}^{i_M} a_i = \sum_{i=i_M+1}^{256} a_i \quad (2)$$

Výkon spektra W je dán vzorcem

$$W = \frac{4}{256} \cdot \sum_{i=1}^{256} a_i^2 \quad (3)$$

Fluktuace tlaku v daném časovém okně jsou charakterizovány dvojicí hodnot M a E definovaných vztahy

$$M = 1 - \frac{f_M}{f_{\max}} \quad (4)$$



Obr. 2. Příklad grafu fluktuální charakteristiky; a – projekce fluktuální charakteristiky do roviny $E \times M$, b – projekce do roviny $E \times U$. Příklad reálné vrstvy: balotina, frakce 0,65 až 0,9 mm, objem 700 ml, hmotnost 1135 g, sypná výška 13,9 cm, prahová rychlost $0,5 \text{ m s}^{-1}$

$$E = \sqrt{W} \quad (5)$$

Veličina M nabývá hodnot z intervalu $[0,66, 1]$ a lze ji chápat jako míru dominantnosti spektra. Pro náhodný signál $M \rightarrow 0,66$, pro signál s jedinou (dominantní) frekvencí $M \rightarrow 1$ (cit.⁸).

Hodnoty $M(U)$ a $E(U)$, přiřazené určitému experimentálnímu bodu U , definujeme jako výsledek průměrování hodnot M a U každého 4. sekundového okna podél jeho posuvu 64 sekundovým záznamem dat.

Trojici hodnot $\mathbf{p} = [E(U), M(U), U]$ z třírozměrného prostoru $\mathbf{F} \equiv E \times M \times U$ nazýváme fluktuálním bodem (stavem) fluidní vrstvy při rychlosti U proudícího plynu. Pro danou fluidní vrstvu je \mathbf{p} funkcí průtokové rychlosti plynu U , t.j. $\mathbf{p} = \mathbf{p}(U)$. Pro $U \in [0, U_{\max}]$ reprezentuje $\mathbf{p}(U)$ křivku v prostoru \mathbf{F} , kterou nazýváme fluktuální charakteristikou (fluidní vrstvy). Projekcí křivky do rovin $E \times M$ a $E \times U$ obdržíme graf fluktuální charakteristiky. Do tohoto grafu zaneseme změřené body $\mathbf{p}(U_i)$ pro $i = 1, 2, \dots, n_{\text{exp}}$, kde n_{exp} je počet experimentálních bodů daného experimentu.

Jestliže se během provozu nemění žádný jiný provozní parametr fluidní vrstvy kromě rychlosti průtoku U , nazýváme tuto skutečnost konkrétní realizací fluidní vrstvy. Fluktuální charakteristika konkrétní realizace fluidní vrstvy je reprezentována křivkou neměnnou v čase. Změnou realizace fluidní vrstvy dochází obecně ke změně průběhu její charakteristické křivky.

Příklad grafu fluktuální charakteristiky určité realizace fluidní vrstvy je uveden na obr. 2.

Výsledky a diskuse

Obecné vlastnosti fluktuálních charakteristik

Fluktuální charakteristiku je možno rozdělit na několik typických úseků. Ty velice dobře korespondují s jednotlivými třídami fluidních režimů, definovanými dle tabulky II. Z tohoto důvodu pojmenujeme jednotlivé úseky fluktuální charakteristiky stejnými názvy, jakými jsou označeny odpovídající třídy režimů fluidací.








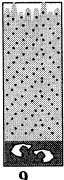

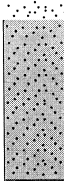

Přestože globální vlastnosti fluktuálních charakteristik byly již prezentovány v literatuře⁸, z naší současné experimentální práce vyplynuly jisté změny a korekce. Uvádíme je zde proto znovu poměrně podrobně. Pro ilustraci výkladu slouží obr. 3.

Úsek F-B odpovídá nehybným vrstvám. Pro rostoucí rychlost plynu U je veličina E prakticky konstantní, a to s velice malou hodnotou. Vlastní vrstva nevytváří žádné fluktuace tlaku, malá hodnota veličiny E reprezentuje šum pozadí resp. šum při průchodu plynu mezi nehybnými částicemi. Veličina M se pohybuje v okolí hodnot 0,66 až 0,67.

Úsek B-T (počáteční rychlost U_{mf}) je charakterizován prakticky lineárním růstem hodnoty E při rostoucím průtoku U . Tento úsek reprezentuje bublinové režimy fluidací.

Tabulka II

Přehled režimů vrstvy zrnitého materiálu vertikálně protékané plynem^a

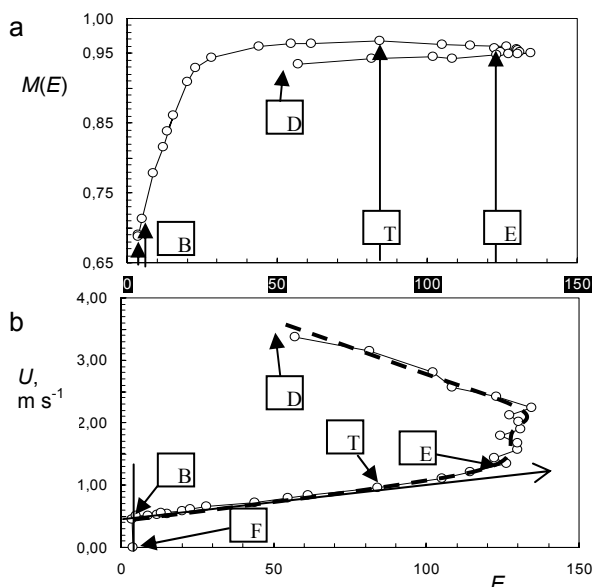
Statické vrstvy	Bublinové vrstvy	Turbulentní vrstvy	Řídké vrstvy
 <p>1</p> <p>nehybná vrstva</p>	 <p>2+</p> <p>četné bubliny, částice v pohybu</p>	 <p>6</p> <p>střední turbulence</p>	 <p>8</p> <p>začínající úlet částic</p>
 <p>2-</p> <p>sporadické bubliny, částice v klidu</p>	 <p>3</p> <p>velké bubliny</p>	 <p>7</p> <p>plná turbulence</p>	 <p>9</p> <p>řídká vrstva</p>
	 <p>4</p> <p>explodující bubliny</p>		 <p>10</p> <p>transportní řídká vrstva</p>
	 <p>5</p> <p>pístování</p>		

^a Rychlost plynu a mezerovitost vrstvy stoupají shora dolů a zleva doprava

Rozhodující podíl fluktuací je vytvářen částicemi husté fluidní vrstvy. Převládajícím směrem pohybu částic je směr vertikální. Veličina M roste monotónně od 0,68 až k hodnotě M_{\max} na konci úseku. Velikost M_{\max} závisí na vlastnostech fluidní vrstvy a představuje schopnost (ochotu) vrstvy k pístování. Podle vizuálního pozorování vrstva pístuje pro hodnoty M od 0,96 výše.

Úsek T-E odpovídá turbulentním režimům fluidních vrstev (počáteční rychlost U_{turb}). Pro rostoucí U veličina E roste pomaleji než lineárně (konkávně), ale stále monotónně. Fluktuace jsou vytvářeny turbulentně se pohybujícími částicemi. Stále více částic je ve formě gejzírů vyvrhováno

nad blízké okolí horní části vrstvy. Konkávnost průběhu charakteristické křivky lze poměrně dobře vysvětlit tím, že jistý podíl hmoty v gejzírech setrvává mimo aktivní prostor vrstvy po čas srovnatelný s délkou časového okna použitého k výpočtu FFT. Tyto částice pak přispívají k vytváření fluktuací (ve zvoleném frekvenčním pásu) podstatně méně než zbytek vrstvy. Hodnoty veličiny M pro rostoucí U zpravidla mírně klesají, mohou ale vytvářet i menší nevýrazná lokální maxima. Přesto však setrvávají na poměrně vysokých hodnotách (nad 0,9). Tomu odpovídá i fakt, že vizuálně lze pozorovat i v turbulentních vrstvách výrazné periodicity pohybu částic.



Obr. 3. Úseky (třídy) fluktuální charakteristiky; Úsek F-B konstantní (pevná vrstva), B-T lineární (bublinové režimy), T-E rostoucí konkávně (turbulentní režimy), E-D oscilující, klesající resp. nerostoucí (řídke vrstvy). Přerušovaná čára označuje lineární trend. Úseky jsou demonstrovány na provedeném experimentu: keramzit, frakce 1 až 1,2 mm, objem 700 ml, hmotnost 545 g, sypná výška 13,9 cm, prahová rychlost 0,47 m s⁻¹

Úsek E-D (počáteční rychlost U_{dil}) má průběh podstatně komplikovanější než úseky předchozí. Reprezentuje režimy fluidací, označených v tabulce II jako řídke vrstvy. Za počáteční bod E považujeme bod na grafu charakteristiky, ve kterém veličina E poprvé začíná klesat. Od tohoto bodu setrvává jistý podíl částic m_e nad vrstvou delší časový interval než je délka časového okna pro FFT. Tyto částice nazveme řídskou fluidační frakcí. Řídská frakce se nepodílí (resp. podílí velmi málo) na vytváření fluktuací ve frekvenčním pásmu daném délkou časového okna a počtem vzorků v okně obsažených. Zbytek částic m_k s periodou pohybu kratší než je časové okno nazveme fluktuacním jádrem vrstvy. Fluktuace ve vrstvě jsou generovány výhradně fluktuacním jádrem. Přitom celkový klidový objem částic ve vrstvě $m = m_k + m_e$. Definujme specifickou veličinu E_s (generovanou jednotkou hmoty v jádře) jako:

$$E_s = \frac{E}{m_k} \tag{6}$$

Potom:

$$E = E_s \cdot m_k \tag{7}$$

Průběh veličiny E pro rostoucí rychlost U je dán výslednicí dvou faktorů: růstem specifické hodnoty E_s na straně jedné a poklesu objemu m_k ve fluktuacním jádru na straně druhé. V počáteční partii úletových režimů může

mít funkce $E(U)$ několik lokálních maxim a minim. Tento efekt je způsoben frakčností materiálu vrstvy. Pro větší rychlosti U funkce $E(U)$ monotónně klesá, resp. je funkcí nerostoucí. Hodnoty veličiny M pro rostoucí U po poměrně dlouhý úsek mírně klesají, pro extrémně velká U však nelze průběh jednoznačně charakterizovat.

Pro určení prahu U_{dil} řídských režimů existuje jako alternativa poněkud spolehlivější kritérium. Definujme relativní veličinu E_r vztahem

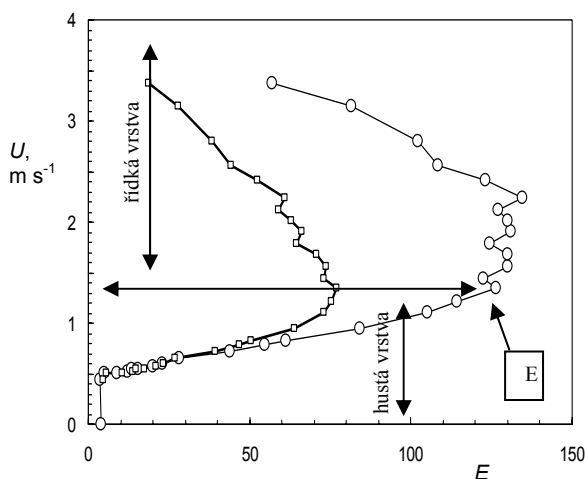
$$E_r = E / \Delta P \tag{8}$$

kde ΔP je tlaková ztráta mezi místem odběru tlakových fluktuací a tlakem na výstupu z fluidního prostoru. Prahem U_{dil} pro úletovou třídu fluidací pak lze označit průtok, při kterém hodnota E_r začíná klesat. Situace je zobrazena na obr. 4. Základním kritériem, rozlišujícím husté fluidační režimy od vrstev řídkých (resp. již částečně řídkých, úletových), je pak následující tvrzení:

V hustých fluidačních vrstvách relativní veličina fluktuací E_r s rostoucím průtokem roste, v režimech řídkých (úletových) tato veličina s rostoucím průtokem U klesá.

Fluktuace ve fluidních režimech

V následujícím textu popíšeme detailně vlastnosti fluktuacní charakteristiky v jednotlivých fluidačních třídách a jejich režimech, uvedených v tabulce II. Diskutovány jsou také souvislosti těchto vlastností s ději uvnitř vrstvy, tak jak se nabízejí z pozorování videozáznamů, pořízených během experimentů.



Obr. 4. Rozhraní hustých a řídkých fluidních vrstev; E práh úletových tříd, křivka $E(U)$, závislost $E_r = E / \Delta P$ na U . Rozhraní je demonstrováno na výsledku experimentu: keramzit, frakce 1,0 až 1,2 mm, objem 700 ml, hmotnost 545 g, sypná výška 13,9 cm, prahová rychlost 0,47 m s⁻¹

Třída statické vrstvy

Třída obsahuje režimy:

Režim 1 – pevná vrstva. Funkce $E(U)$ je konstantní. Její hodnoty jsou velice malé, představují náhodný šum pozadí. Veličina M nabývá hodnot kolem 0,66. Částice vrstvy jsou nepohyblivé, vizuálně je vrstva zcela v klidu.

Režim 2- – sporadické bubliny, částice v klidu. Oblast flukuační charakteristiky kolem bodu B (viz obr. 3). Funkce $E(U)$ přechází plynulým ohybem k začátku úseku B-T, její hodnoty mírně rostou. Veličina $M \in [0,66, 0,7]$. Částice vrstvy ve vzájemném dotyku. Mezi částicemi je možno pozorovat sporadický průchod drobných bublin. Ty jsou také zdrojem mírných fluktuací procházejícího plynu. Režim 2- existuje v poměrně malém intervalu hodnot průtoku U . V tomto intervalu leží také prahová rychlost fluidace U_{mf} , určitelná i jinými klasickými metodami.

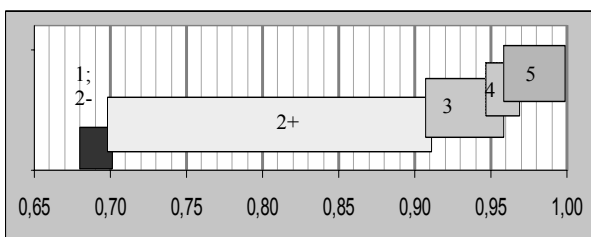
Třída bublinové režimy

Tato třída obsahuje fluidní režimy 2+ – četné bubliny, částice v pohybu, 3 – velké bubliny, 4 – explodující bubliny a 5 – pístování. Funkce $E(U)$ roste lineárně (viz obr. 3). Množství částic m_k flukuačního jádra je konstantní a je rovno celkovému množství částic m ve vrstvě. Lineárně tedy roste i veličina E_s , definovaná vztahem (6). Množství částic m_e ve stavu řídkém je rovno 0.

Jednotlivé režimy bublinové třídy lze spolehlivě identifikovat intervaly hodnot, kterých nabývá flukuační veličina M . Porovnáním hodnot M pro experimenty z archivu dat s vizuálními záznamy fluidací během experimentů byla sestavena tabulka intervalů hodnot M pro jednotlivé bublinové režimy (tabulka III a obr. 5). Z tabulky je patrné, že jednotlivé intervaly veličiny M pro bublinaté režimy se částečně překrývají. Tato jejich vlastnost je zcela přirozená, vyjadřuje jistý stupeň neurčitosti a subjektivitu při vizuálním rozhodování, jaký pozorovaný režim ve vrstvě právě probíhá. Stejně neurčitý charakter mají ostatně přechody mezi režimy ve všech třídách i přechody mezi třídami samotnými.

Třída turbulentní režimy

Třidu turbulentních režimů (režimy 6 a 7 v tabulce II) můžeme ve smyslu rostoucí rychlosti U považovat za nejvyšší skupinu režimů ještě plně hustých. Veškerá hmota ve fluidačním prostoru patří k flukuačnímu jádru ($m_k^o m$).



Obr. 5. Znázornění vzájemných proporcí a překrývání intervalů hodnot veličiny M pro statické a bublinové režimy fluidních vrstev; čísla režimů jsou stejná jako v tabulce II

Tabulka III

Hodnoty flukuační veličiny M pro statické a bublinaté režimy vrstev^a

Číslo režimů	Režim	M
1,2-	nehybná vrstva, sporadické bubliny, částice v klidu	0,66–0,71
2+	četné bubliny, částice v pohybu	0,69–0,91
3	velké bubliny	0,90–0,96
4	explodující bubliny	0,95–0,97
5	pístování	0,96–0,99

^a Označení a čísla režimů jsou stejná jako v tabulce II

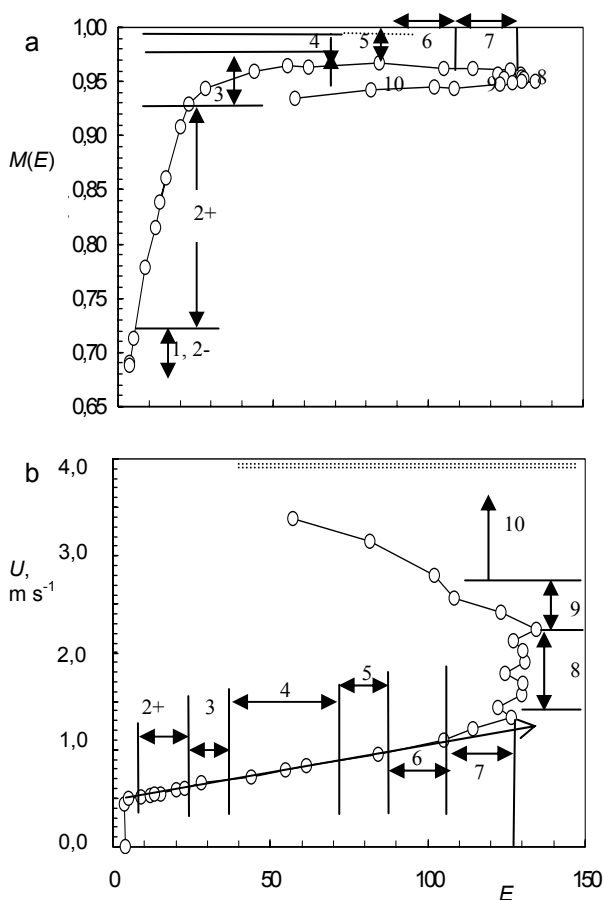
Nad horní část husté vrstvy však vystřelují gejzíry, jejichž částice setrvávají mimo vrstvu, a to čas kratší, než je délka časového okna pro výpočet FFT spektra. Protože návrat částic do vrstvy je současně kontinuálně provázen novým výronem gejzírů, jeví se z hlediska tvorby fluktuací děj tak, jako by permanentně byl v hustém jádru přítomen poněkud menší klidový objem hmoty než celkové m . Tato disproporce se zvyšuje s růstem U , hmota v gejzírech roste.

V důsledku popsaného děje roste veličina $E(U)$ postupně stále více pomaleji než lineárně. Průběh křivky $E(U)$ má konkávní charakter (viz úseky 6 a 7 na obr. 6). Relativní veličina $E_r(U)$ v turbulentních režimech ještě roste, naopak veličina $M(E)$ již klesá. Přechody mezi v tabulce II uvedenými turbulentními režimy (6 – střední turbulence a 7 – plná turbulence) jsou při pozorování v reálu po vizuální stránce velice těžko rozeznatelné a nejednoznačné. To je ve shodě s faktem, že totéž platí i pro přechody mezi úseky 6 a 7 na flukuační charakteristice.

Třída řídké (úletové) režimy

Ve spodní části vrstvy (nad roštem) vždy existuje hustá turbulentní vrstva (flukuační jádro), která je rozhodujícím zdrojem tlakových fluktuací. S rostoucí rychlostí U však stále více částic opouští hustou vrstvu a setrvává ve vyšších partiích fluidačního prostoru ve stavu řídké vrstvy. V řídké vrstvě částice přispívají k vytváření fluktuací daleko méně. Část z nich se může vracet zpět do nižších poloh, ale s periodami daleko převyšujícími délku časového okna pro výpočet FFT. Pokud jejich pohyb vůbec vytváří tlakové fluktuace, potom díky jejich dlouhým periodám jsou zahrnuty do konstantní složky FFT a tudíž ignorovány ve spektru. S dalším zvyšováním rychlosti U se stále větší podíl částic volně vznáší a opouští vlastní fluidační prostor. Jinými slovy, zmenšuje se množství m_k jádra ve prospěch množství m_e řídké složky.

Z experimentů vyplývá, že je výhodné třídu řídkých vrstev rozčlenit na tři režimy (viz tabulka II), jejichž kvalitativní rozdíl je patrný jak při vizuálním pozorování, tak i na vlastnostech příslušných partií charakteristické flukuační křivky.



Obr. 6. Přehled poloh fuidačních režimů na flukuační charakteristice; čísla režimů jsou stejná jako v tabulce II. Polohy jsou demonstrovány na experimentu: keramzit, frakce 1,0 až 1,2 mm, objem 700 ml, hmotnost 545g, sypaná výška 13,9 cm, prahová rychlost $0,47 \text{ m s}^{-1}$

Režim 8 – začínající úlet částic. Na křivce $E(U)$ odpovídá části kolem jejího globálního maxima. Funkce $E(U)$ má z počátku trend růst ale v detailu může vytvářet řadu drobných lokálních maxim a minim. Za počátek režimu 8 lze považovat rychlost U_{dil} , při které $E(U)$ poprvé (byť lokálně) začne klesat. V každém případě však od začátku tohoto režimu permanentně klesá relativní veličina $E_r(U)$ (viz obr. 4). Za konec režimu 8 lze považovat rychlost, při které začne veličina $E(U)$ na flukuační charakteristice trvale klesat. Veličina $M(E)$ v tomto režimu trvale mírně klesá. Fakt, že hodnota $E(U)$ pro rostoucí U má několik lokálních maxim a minim, odpovídá představě, že v režimu 8 dochází k výraznému rozduřování částic, které je dáno buď i mírnými odlišnostmi fluidujících částic, a to nejen jejich velikostí, ale hlavně jejich aerodynamickými vlastnostmi. Jestliže při růstu U přejde do řídkého prostoru větší množství částic stejných vlastností, klesá vlivem zmenšení hmoty m_k jádra hodnota $E(U)$. V opačném pří-

padě (m_k beze změny) roste energie flukuačního jádra a veličina $E(U)$ pak opět (lokálně) roste. V každém případě platí pro celý režim 8 $m_k + m_e = m$, t.j. celkové množství částic ve fluidačním prostoru zůstává zachováno.

Při vizuálním pozorování lze režim 8 charakterizovat takto:

Dolní hustá vrstva silně turbuluje. Její gejzíry pronikají do podstatné části horní řídké vrstvy. Řídká frakce je stále v patrném pohybu, jen málo částic se ale vznáší volně.

Režim 9 – řídká vrstva. Z vizuálního hlediska lze tento režim popsat následovně: Flukuační jádro při rostoucím U získává na turbulentní dynamice, ale zcela evidentně rychle ztrácí svou hmotnost. Horní mez turbulující složky včetně gejzírů expandujících do řídké vrstvy nad ní se postupně limitně blíží jakési (v dané vrstvě) maximálně dosažitelné hodnotě. Naopak nad ní existující řídká vrstva poměrně rychle nabývá na výšce. V její dolní části lze zaznamenat výrazný chaotický pohyb, vyvolaný především pronikáním gejzírů z nižších částí. Směrem k vrcholu řídké vrstvy však vzniká stále objemnější část, ve které se částice volně vznášejí a vykonávají pohyb podobný Brownovu pohybu. Mezerovitost vrstvy podél výšky zaručuje, že lokální průtoková rychlost $U_{\text{lok}}(y)$ (závislá na vertikální souřadnici) je prakticky rovna individuálním pádovým rychlostem u_e jednotlivých částic. Při jakémkoliv zvýšení průtokové rychlosti U přibude množství m_e v řídké vrstvě. Současně se zvýší výška řídké vrstvy a mezerovitost se přeskupí do nové konfigurace, zaručující podél výšky lokální rychlosti rovné u_e . S jistým průměrem lze tuto vlastnost nazvat „nasyčeností“ řídké vrstvy.

Proces pokračuje až do okamžiku, kdy řídká část fluidní vrstvy dosáhne horního konce fluidního prostoru. Rychlost U , odpovídající tomuto stavu, považujeme za konec režimu 9, označíme ji symbolem U_{out} a nazveme prahem úletu fluidní vrstvy. Jakékoliv další zvýšení rychlosti U vede k tomu, že část částic opouští fluidní prostor (ať již trvale v klasické fluidní vrstvě nebo do zpětného transportu ve fluidní vrstvě s vnější cirkulací). Důležitým faktem je, že pro všechny režimy, které pracují před dosažením rychlosti U_{out} je splněna podmínka $m_k + m_e = m$, t.j. celkové množství částic ve fluidním prostoru zůstává zachováno.

Z hlediska vlastností flukuační charakteristiky lze režimu 9 odpovídající úsek popsat takto. Veličina $E(U)$ trvale klesá. Hodnoty veličiny $M(E)$ mírně klesají, ale stále odpovídají turbulentnímu chování hustého flukuačního jádra.

Důležitou vlastností flukuačních charakteristik fluidních vrstev, provozovaných výhradně pro rychlosti $U < U_{\text{out}}$, tj. v režimech 1 až 9, je jejich stacionarita: tvar charakteristické křivky nezávisí na čase. Při zvolené (v čase konstantní) rychlosti U se poloha stavového bodu $\mathbf{p} = \mathbf{p}(U) \equiv [E, M, U]$ nemění. Při libovolné změně $U < U_{\text{out}}$ směrem k menším hodnotám se bod $\mathbf{p} = \mathbf{p}(U)$ pohybuje po stejné charakteristické křivce (efekt podobný hysterezi nelze pozorovat). Jinými slovy, za předpokladu konstantních provozních podmínek určité fluidní vrstvy se charak-

teristická křivka nemění, pokud ovšem nenastanou určité materiálové a fyzikální změny provozu.

Režim 10 – transportní řídká vrstva. Režim začíná při průtokové rychlosti $U = U_{out}$. Tato hodnota průtoku silně závisí pro daný materiál na výšce fluidačního prostoru (s výškou roste) a na množství materiálu v zařízení. Pro velmi vysoké zařízení (nekonečný sloupec) může být tak velká, že pro daný materiál k úletu mimo fluidační prostor vůbec nemusí dojít. Klesá-li množství materiálu ve fluidním prostoru, rychlost U_{out} roste. V zařízení s vnější cirkulací pak k cirkulaci vůbec nedochází. V takovém zařízení při dané realizaci fluidní vrstvy je nejvyšším dostupným režimem režim 9.

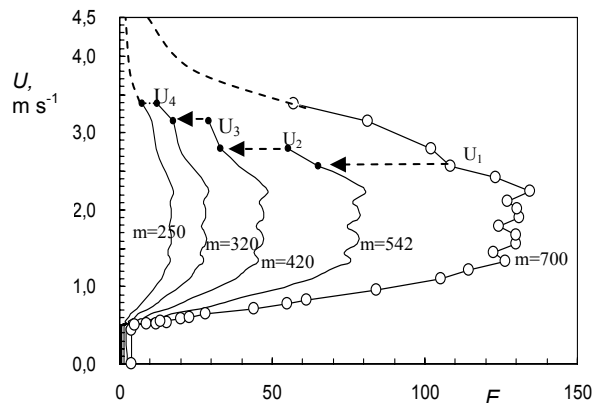
Nechť daná realizace fluidní vrstvy připouští přechod do stavu režimu 10. Přechodem se změní podmínka $m_k + m_e = m$ na relaci $m_k + m_e < m$. Další průběh charakteristické křivky i dějů ve vrstvě probíhající se nedá popsat zcela jednoznačně. Podstatným faktorem je okolnost, zda jde o fluidní prostor bez cirkulace (s nevratným úletem) nebo prostor s vnější cirkulací částic. Proberme oba případy.

Prostor bez cirkulace

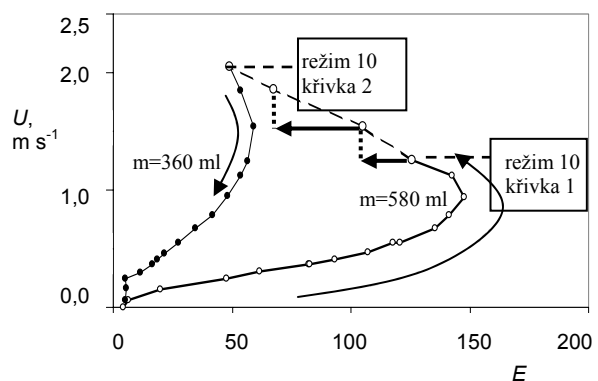
Děj ve fluidní vrstvě je v tomto případě nestacionární. Při zachování daného konstantního průtoku $U_{konst} > U_{out}$ pokračuje transport částic mimo zařízení. To se projeví postupným snižováním flukтуаční veličiny E v závislosti na čase, přičemž souřadnice U_{konst} grafu $E(U)$ zůstává nezměněna. Celý pokles trvá do té doby, než ze zařízení nevratně ulétne část materiálu (zpravidla částic drobnějších frakcí). Tím se posunuje hodnota prahu U_{out} směrem k vyšším hodnotám. Děj se ustálí v okamžiku, kdy je splněna relace $U_{konst} \approx U_{out}$. Jinými slovy, vrstva přejde k jiné realizaci a to ke konci režimu 9. Po případném novém zvýšení průtoku U_{konst} se celý nestacionární děj opakuje (obr. 7). Celý cyklus končí při úplném vyprázdnění celého fluidního prostoru, kdy $E(U) \rightarrow 0$. Jestliže u neprázdné vrstvy přejdeme snižováním průtoku U k režimům 9 a nižším, lze na křivce $E(U)$ pozorovat silný hysteretický efekt (obr. 8). Ten je dán jako důsledek faktu, že v zařízení pracuje při zpětném snižování hodnoty U již jiná realizace fluidní vrstvy, než se kterou se pracovalo původně. Oproti původní je v této realizaci menší množství m částic a obsahuje zpravidla hrubší frakce.

Prostor s vnější cirkulací

V tomto případě nelze dost dobře uvést obecně platné vlastnosti flukтуаční charakteristiky. Děje ve fluidní vrstvě i flukтуаční charakteristiky závisí na celé řadě faktorů, resp. způsobu cirkulace (vynucený transport, spojitost či nespojitost, rychlost zpětného toku atd.). Režim 10 lze pak nazvat cirkulující vrstvou. Pro takový režim je vhodné zkoumat děje ve vrstvě jinak uspořádanými experimenty. Zcela zřejmé je, že pro posuzování dějů v cirkulující vrstvě je daleko důležitější např. měřit a zpracovávat tlakové fluktuace v jiných místech fluidního aparátu jako např.



Obr. 7. Postupný úlet hmoty částic vrstvy a změna flukтуаční charakteristiky; demonstrováno na experimentu: keramzit, frakce 1 až 1,2 mm, původní objem 700 ml, hmotnost 545 g, sypaná výška 13,9 cm, prahová rychlost 0,47 m s. Hodnoty m udávají ustálená zbytková množství fluidující hmoty po překročení příslušného prahu úletu a ustálení děje. Prahy trvalého úletu U_{out} jsou : $U_{out} = 2,6 \text{ m s}^{-1}$ pro $m = 542 \text{ ml}$; $U_{out} = 2,8 \text{ m s}^{-1}$ pro $m = 420 \text{ ml}$; $U_{out} = 3,1 \text{ m s}^{-1}$ pro $m = 320 \text{ ml}$; $U_{out} = 3,4 \text{ m s}^{-1}$ pro $m = 250 \text{ ml}$



Obr. 8. Hysteretické flukтуаční křivky po nevratném úletu části materiálu z fluidní vrstvy; materiál vrstvy tvoří částice vápence, \circ křivka 1 – charakteristická křivka pro vrstvu 580 ml s frakcí 0,1 až 0,65 mm, s prahem fluidace $0,11 \text{ m s}^{-1}$ a prahem nevratného úletu $1,25 \text{ m s}^{-1}$; \bullet křivka 2 – charakteristika vrstvy po nevratném úletu části materiálu, objem vrstvy 360 ml, frakce 0,5 až 0,65 mm, prah fluidace $0,27 \text{ m s}^{-1}$, prah nevratného úletu $2,06 \text{ m s}^{-1}$

v horní části (v řídké fázi) nad místem návratu částic do fluidního prostoru nebo přímo ve fluidním uzávěru a jeho okolí. Celá problematika fluktuací fluidujících vrstev ve stavu cirkulace přesahuje ale rámec této práce.

Závěr

Předloženou metodou zjišťování aktuálních fluidačních tříd a režimů s použitím flukтуаční charakteristiky lze poměrně dobře určovat stav fluidní vrstvy při daném průtoku plynu zařízením. Popsané příčinné vztahy mezi vlastnostmi flukтуаčních charakteristik a momentálními režimy fluidních vrstev mohou navíc osvětlit dynamické mechanismy jevů fluidací systémů tuhých částic ve vertikálním proudu plynů. Kromě toho vztahy mezi flukтуаčními charakteristikami a režimy fluidních vrstev umožňují definovat jednotlivé režimy na základě definovaných úseků flukтуаčních křivek. Definice režimů se tak dostává z dosavadních oblastí značně subjektivních popisů vizuálně pozorovaných chování do oblasti objektivně definovaných a měřitelných dat.

S e z n a m s y m b o l ů

a_i	amplituda i -té spektrální čáry
c_i	komplexní hodnota i -té spektrální čáry (příslušné frekvenci f_i), Pa
d	průměr vrstvy, cm
E_0	hodnota E pro šum pozadí
E_r	relativní veličina, definovaná vztahem (8), bezrozměrná
E_s	specifická veličina, definovaná vztahem (6), Pa ml ⁻¹
$E(U)$	charakteristická veličina tlakových fluktuací při rychlosti U , definovaná vztahem (5), Pa
F	trojrozměrný prostor $E \times M \times U$
FFT	rychlá Fourierova transformace
f_i	frekvence spektrální čáry, Hz
f_M	medián setříděného spektra, Hz
f_{max}	maximální frekvence diskrétního Fourierova spektra, Hz
f_{min}	minimální frekvence diskrétního Fourierova spektra, Hz
h	výška vrstvy, cm
m	množství částic ve vrstvě (klidový objem vrstvy), ml
m_e	množství částic v řídké fluidační frakci vrstvy (klidový objem), ml
m_k	množství částic ve fluidačním jádru vrstvy (klidový objem), ml
$M(U)$	charakteristická veličina tlakových fluktuací při rychlosti U , definovaná vztahem (4), bezrozměrná
P	tlak plynu ve vrstvě, Pa
p	vektor [$E(U)$, $M(U)$, U], flukтуаční stavový vektor
ΔP	tlaková ztráta, Pa
T	teplota přiváděného plynu (vzduchu), °C
U	rychlost plynu ve volném průřezu kolony, m s ⁻¹
U_{dil}	práh třídy řídkých režimů fluidní vrstvy, m s ⁻¹
u_e	individuální pádová rychlost jednotlivé částice, m s ⁻¹
U_{out}	práh trvalého úletu fluidní vrstvy (režimu 10), m s ⁻¹

$U_{lok}(y)$	lokální lineární rychlost (závislá na vertikální souřadnici y), m s ⁻¹
U_{max}	maximálně dosažená průtoková rychlost, m s ⁻¹
U_{mf}	práh fluidace fluidní vrstvy, m s
U_{turb}	práh třídy turbulentních režimů fluidní vrstvy, m s ⁻¹
W	výkon spektra, Pa ²

Ř e c k é s y m b o l y

ρ_v	sypaná hustota, kg m ⁻³
----------	------------------------------------

Předkládaný text vznikl na základě experimentálních prací v rámci grantového projektu A4072001 Grantové agentury Akademie věd ČR a s podporou GA ČR (grant 203/021002).

LITERATURA

1. Yates J. G.: *Fundamentals of Fluidized-Bed Chemical Processes*. Butterworths, London 1983.
2. Yates J. G., Simons S. J. R.: *Int. J. Multiphase Flow* 20, Suppl., 297 (1994).
3. Hartman M., Svoboda K., Veselý V., Ziolkowski D.: *Chem. Listy* 81, 1233 (1987).
4. Hartman M., Beran Z., Svoboda K., Veselý V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60, 1 (1995)
5. Svoboda K., Čermák J., Hartman M., Drahoš J., Selucký K.: *Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev.* 22, 514 (1983).
6. Svoboda K., Čermák J., Hartman M., Drahoš J., Selucký K.: *AIChE J.* 30, 513 (1984).
7. Zhao G.-B., Zang Z.-R.: *AIChE J.* 49, 869 (2003).
8. Trnka O., Veselý V., Hartman M., Beran Z.: *AIChE J.* 46, 509 (2000).
9. Press W. H., Flannery B. P., Teukolsky S. A., Vetterling W. T.: *Numerical Recipes in Pascal*. Cambridge Univ. Press, Cambridge 1992.

O. Trnka, M. Hartman and V. Veselý (*Institute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Characteristics of Pressure Fluctuations in Different Operation Regimes of Gas-Solid Suspensions**

Pressure fluctuation signals were measured in a transparent fluidized-bed column 8 x 600 cm. A novel treatment procedure using the fast Fourier transform of the measured pressure fluctuations was elaborated, which makes it possible to construct plots describing the evolution of hydrodynamic behaviour of suspension from static bed to vertical pneumatic transport of particulate materials.

STANOVENÍ SORPČNÍ KAPACITY SORBENTU TENAX TA PRO URČENÍ KONCENTRACÍ VYBRANÝCH ORGANICKÝCH LÁTEK V OVZDUŠÍ

ANTONÍN KROUPA, IVAN VÍDEN
a STANISLAV VODRÁŽKA

Ústav plynárenství, koksochemie a ochrany ovzduší, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

antonin.kroupa@seznam.cz

Došlo 17.3.04, přepracováno 1.11.04, přijato 25.11.04.

Klíčová slova: průnikový objem, bezpečný vzorkovací objem, Tenax TA, VOC

Úvod

Pro analýzu VOC (volatile organic compounds – těkavé organické látky) v ovzduší se nejčastěji používá metoda využívající adsorpci látek na sorpčních materiálech¹. Tato metoda běžně využívá několik hlavních druhů sorbentů. Vedle přírodních materiálů, jako jsou např. zeolity (také syntetické), existuje široká paleta uhlíkatých materiálů (např. kokosové uhlí, Carbotrap, Carbopack aj.) a polymerních sorbentů, z nichž nejnámější jsou sorbenty značek Porapak, Tenax a sorbenty Century Series (Chromosorb 101–108). Tenax TA je široce používaný sorbent na bázi polymeru 2,6-difenyl-*p*-fenylen oxidu. Jedná se o polymer se specifickým povrchem 35 m² g⁻¹, objemem pórů 2,4 cm³ g⁻¹, průměrnou velikostí pórů 200 nm a hustotou 0,25 g cm⁻³, jehož teplotní stabilita je uváděna až do 350 °C. Díky uvedeným vlastnostem, nízkému obsahu nečistot a dobré stabilitě matrice lze Tenax TA použít při analýze poměrně široké škály VOC.

Pro praktické použití sorbentu v analýze ovzduší pomocí sorpčních trubiček jsou důležité údaje o bezpečných vzorkovacích objemech. Bezpečný vzorkovací objem vyjadřuje objem kontaminovaného ovzduší (vztážený na hmotnost sorbentu), který je možné odebrat bez rizika průniku některé z látek s nejmenší retencí v analyzované směsi. V literatuře¹ je SSV (save sampling volume – bezpečný vzorkovací objem) uváděn například jako 2/3 průnikového objemu BTV (breakthrough volume), tedy objemu plynu, při jehož průchodu sorbetem již právě dojde k eluci analytu, a to za dané teploty (opět vztážno na hmotnost sorbentu). Z toho je patrné, že stanovení BTV hraje důležitou

rolí pro praktické využití – stanovení SSV, a je vedle dalších charakteristik, jako sorpční kapacita, počet teoretických pater a teplotní stabilita, důležitým parametrem sorpčního materiálu. Informací o BTV na Tenaxu TA je však v literatuře značně omezené množství^{3–5}. Publikovaná data zpravidla uvádějí údaje v omezeném teplotním rozsahu zpravidla nad 150 °C. Stanovení BTV za normálních teplot je totiž náročnější na aparaturu a její obsluhu. Je nezbytné použití malých množství sorbentů a specializovaných přístrojů k přesné regulaci nízkých teplot a vhodných průtoků. Poměrně velké množství informací o BTV organických látek obsahují internetové stránky společnosti Scientific Instrument Services, Inc⁶, které však neuvádějí BTV sirných sloučenin. Prezentovaná data byla získána metodou popsanou J. J. Manrou⁷. Ten však neobjasňuje podmínky popsanych měření, zejména pak nespecifikuje, které BTV jsou přímo experimentálně naměřeny a které jsou pouze extrapolovány z dat naměřených při teplotách vyšších.

V této práci, která byla provedena na Ústavu organické chemie Fakulty zemědělských a aplikovaných biologických věd, Univerzita Ghent, Belgie, na pracovišti výzkumné skupiny ENVOG (Environmental Organic Chemistry), bylo vybráno 15 organických látek (viz Experimentální část), u nichž byly stanoveny jejich průnikové objemy a adsorpční entalpie na Tenaxu TA v celkovém teplotním rozmezí od –10 °C do +170 °C.

Výpočetní vztahy

Pro výpočet průnikového objemu byl použit vztah^{8,9}:

$$\text{BTV} = \frac{F_A t'_R}{M} j \frac{T_M}{T_A} = \frac{F_A t'_R}{M} \frac{3}{2} \frac{\left(\frac{p_i}{p_o}\right)^2 - 1}{\left(\frac{p_i}{p_o}\right)^3 - 1} \frac{T}{T_A} \quad (1)$$

kde BTV je průnikový objem [ml g⁻¹] při teplotě sorbentu T [K], F_A je objemový průtok nosného plynu [ml min⁻¹] měřený za teploty T_A [K], t'_R je retenční čas dané látky [min], M je hmotnost sorbentu [g], j je tlakový korekční faktor vypočtený z p_i a p_o , což jsou vstupní a výstupní tlaky na trubičce se sorbentem [kPa].

Teplotní závislost BTV je obecně vyjádřena van Hoffovou rovnicí¹⁰:

$$\frac{d(\ln \text{BTV})}{dT} = \frac{\Delta H_T}{RT^2} \quad (2)$$

kde ΔH_T je adsorpční entalpie [J mol⁻¹] při teplotě T [K] a R je univerzální plynová konstanta.

Za předpokladu, že je adsorpční entalpie konstantní, dostaneme po úpravě a zjednodušení rovnice (2) vztah:

$$\ln \text{BTV} = \frac{A_1}{T} + C_1 \quad (3)$$

kde $A_1 = -\Delta H_T/R$ a C_1 je integrační konstanta. Rovnice (3) vyjadřuje lineární závislost logaritmu BTV na reciproké hodnotě absolutní teploty¹¹. Tuto rovnici lze využít pro výpočet BTV při dané teplotě odběru ze znalosti A_1 a C_1 zjištěných experimentálně.

Pro stanovení SSV [ml g^{-1}] za daných podmínek je pak použita jednoduchá rovnice¹:

$$\text{SSV} = \frac{2}{3} \text{BTV} \quad (4)$$

Experimentální část

Příprava vzorků

Použité látky

V této práci byly použity VOC, které byly rozděleny do dvou skupin podle očekávaných retenčních časů. První skupina zahrnovala *n*-pentan (čistota 99 %, Fluka Chemika, Buchs, Německo), *n*-hexan (98%, VEL, Leuven, Belgie), 1-hexen (97%) methylacetát (99%), aceton (99,9%), dimethylsulfid (99%), dimethyldisulfid (99%) (vše od Acros Organics, New Jersey, USA) a chloroform (99%, Janssen Chimica, Geel, Belgie). Ve druhé skupině pak byl ethylacetát (99,99%, Acros Organics, New Jersey, USA), *m*-xylen (99%, Fluka Chemika, Buchs, Německo), benzen (99%), 2-pentanon (99%), tetrachlorethen (99%) (vše od Janssen Chimica, Geel, Belgie), toluen (99,8%) a trichlorethen (99,5%) (Aldrich Chemical, Milwaukee, USA). Jako rozpouštědlo byl použit methanol (99,8%, J. T. Baker, Phillipsburg, USA). Uvedené látky byly použity bez následného čištění. Dále bylo použito helium (Helium 2 od Alphagaz, Liege, Belgie) jako nosný plyn a sorbent Tenax TA (zrnění 60–80 Mesh od Supelco, Bellefonte, USA) utěsněný v trubičce křemennou vatou (od Interscience, Louvain-la-Neuve, Belgie).

Příprava plyných vzorků

Pro dávkování byly připraveny dva směsné základní roztoky látek obou skupin v methanolu. Pro přípravu plyných vzorků o požadované koncentraci 4 až 6 g m^{-3} byl využit dvoufázový uzavřený systém založený na rovnovážném rozdělení látky mezi vodnou a plynou fází v uzavřené nádobě. Nejdříve byl do speciální odměrné baňky nadávkován známý objem destilované vody. Pod její hladinu bylo následně nastříknuto potřebné množství základního roztoku a baňka byla okamžitě uzavřena zátkou opatřenou septem. Koncentrace dané látky v plyné fázi byly vypočítána z Henryho zákona podle vztahu¹²:

$$C_g = \frac{m}{V_g + V_w / H^*} \quad (5)$$

kde C_g je koncentrace látky v plyné fázi [g m^{-3}], m je množství látky v systému [g], V_g je objem volné plyné fáze baňky [m^3], V_w je objem vodné fáze [m^3] a H^* je bezrozměrná Henryho konstanta za teploty teploty $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Bezrozměrné Henryho konstanty byly převzaty z literatury¹³. Temperování vzorků probíhala přes noc.

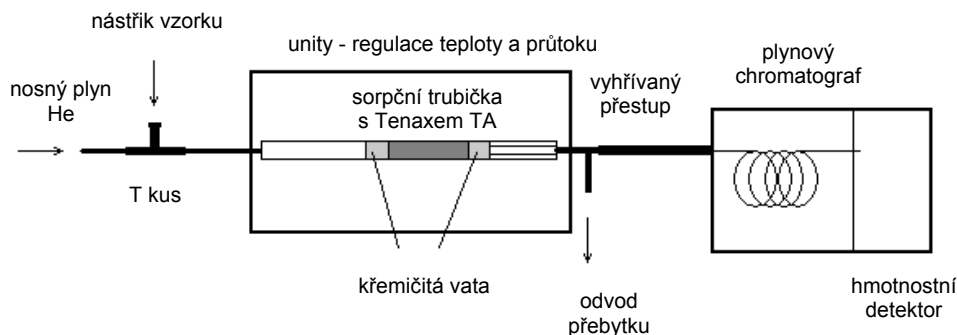
Zjištění tlakového korekčního faktoru

Korekční faktor j byl stanoven na aparatuře skládající se z tlakové lahve nosného plynu, průtokového regulátoru s tlakoměrem Chrompack BFU103 a termostatu plynového chromatografu HP 5890, kde byla umístěna sorpční trubička s Tenaxem TA.

Stanovení průnikových objemů

Aparatura

Aparatura pro stanovení průnikových objemů je schematicky znázorněna na obrázku 1. Do proudu nosného plynu (He) byl přes 1/8" T kus (Swagelok, Solon, USA) zakončený septem (Alltech Associates, Lokeren, Belgie) nastříknut 500 μl plynotěsnou stříkačkou Hamilton 1750 (Hamilton, Bonaduz, Švýcarsko) plyný vzorek směsi látek v rozmezí od 100 do 250 μl . Ten pak procházel



Obr. 1. Schéma experimentální aparatury pro měření BTV

sorpční trubičkou (Markes International, Pontyclum, Anglie, UK) o délce 120 mm, vnitřním průměru 2 mm a vnějším průměru 2,9 mm, umístěnou v Unity – jednotce regulace teplot a průtoků (Markes International, Pontyclum, Anglie, UK). Trubička obsahovala 29,4 resp. 3,0 mg Tenaxu TA. Za trubičkou následovalo dělení toku plynu a vstup vyhřívaným přestupem do plynového chromatografu GC Trace 2000 (ThermoFinnigan, Milan, Itálie),

kteřý obsahoval kapilární kolonu Chrompack CP-SIL 5 (60 m; 0,32 mm; 0,25 μm). Systém byl ukončen hmotnostním detektorem MS Trace DSQ WE – 250 (ThermoFinnigan, Austin, USA) a byl ovládán osobním počítačem Compaq PC-EVO-310 vybaveným softwarem Unity 1.2.0 (Markes International, Pontyclum, Anglie, UK) a Xcalibur 1.3 (ThermoFinnigan, Austin, USA).

Tabulka I

Stanovené hodnoty průnikových objemů BTV [ml g^{-1}] zkoumaných VOC na Tenaxu TA a jejich relativní standardní odchylky RSD (%) z pěti opakování.

Látka	BTV při t [$^{\circ}\text{C}$]												
	0	10	20	30	35	40	50	60	80	100	120	140	160
n-Pentan					1260	1000	812	600	226	92,8			
RSD, %					5,2	7,9	3,2	2,5	5,7	8,1			
n-Hexan				7160		4970	3380	2270	779	305			
RSD, %				8,1		5,9	2,2	3,9	1,9	4,15			
1-Hexen				10900	8060	6330	3860	2300	817	298	118		
RSD, %				2,4	4,3	4,4	5,1	2,4	1,8	5,1	7,7		
Benzen						12800	6790	3810	1390	662	285	124	
RSD, %						2,7	1,5	1,6	2,1	2,0	5,9	9,3	
Toluen				84200			30900	15800	4840	1950	758	314	
RSD, %				6,7			3,9	1,5	1,1	0,7	2,0	5,1	
<i>m</i> -Xylen ^a										6150	2000	773	321
RSD, %										0,8	0,9	2,0	3,1
Aceton ^b				2880	2140	1560	970	695	283				
RSD, %				2,6	1,4	1,6	2,8	1,8	2,7				
2-Pentanon				125000		35600	17300	8750	2670	1090	431		
RSD, %				3,8		2,6	2,8	0,9	0,6	1,0	3,7		
Dimethylsulfid	25700	13800	8130	2750	2030	1520	931	627	245	93,7			
RSD, %	5,6	3,8	2,3	1,4	2,0	1,1	2,5	1,4	4,0	6,8			
Dimethyldisulfid			2,67.10 ⁵				21400	11800	3380	1140	447	171	72,5
RSD, %			2,3				0,9	1,0	0,4	1,1	1,5	7,4	4,0
Chloroform	63100	39500	26800	10800	7890	5770	3440	2160	786	331	132		
RSD, %	5,9	3,9	3,7	1,9	1,4	2,0	1,7	0,6	1,0	1,4	5,3		
Trichlor-ethen				29800		16500	8460	4500	1540	701	285		
RSD, %				2,5		1,8	1,7	1,6	1,6	2,0	3,7		
Tetra-chlorethen				85800			30600	15400	4830	2010	765	321	
RSD, %				5,5			4,2	1,8	1,5	0,8	2,4	2,6	
Methyl-acetát	76100	39200	24100	5450	3930	2920	1790	1130	421	166			
RSD, %	4,9	3,7	4,3	1,6	1,3	1,5	1,9	1,2	2,0	4,4			
Ethyl-acetát			69200	37100		12600	5890	3100	1010	476	174		
RSD, %			8,2	4,4		1,8	4,0	2,4	2,2	2,1	8,8		

^a *m*-Xylen - při $t = 170^{\circ}\text{C}$ BTV = 180 ml g^{-1} , RSD = 7,3 %, ^b aceton - při $t = -10^{\circ}\text{C}$ BTV = 1,75.10⁵ ml g^{-1} , RSD = 4,0 %

Podmínky měření

Retenční čas organické látky se skládal ze tří složek, vyjádřených vztahem:

$$t_{\text{VOC}} = t'_{\text{R}} + t'_{\text{GC}} + t_{\text{N}_2} \quad (6)$$

kde t_{VOC} je celkový retenční čas látky [min], t'_{R} je čistý retenční čas látky na sorbentu, t'_{GC} je čistý retenční čas na koloně plynového chromatografu a t_{N_2} je mrtvý retenční čas odpovídající retenčnímu času dusíku, který se do systému dostal spolu s plynným vzorkem z CTS. Během všech měření byla teplota kolony 200 °C.

Nejprve byl stanoven t'_{GC} všech složek tak, že teplota sorpční trubičky byla 280 °C, kdy byla předpokládána nulová zádrž VOC na sorbentu. Během dalších experimentů byly měřeny rozdíly retenčních časů Δt ($\Delta t = t_{\text{VOC}} - t_{\text{N}_2}$) v celkovém teplotním intervalu sorbentu od -10 °C do 170 °C. V případě příliš dlouhé doby zdržení látek za dané teploty na větším množství (29,4 mg) sorbentu bylo použito množství menší (3,0 g). Byly tak stanoveny t'_{R} uvedených patnácti organických látek podle vzorce:

$$t'_{\text{R}} = \Delta t - t'_{\text{GC}} \quad (7)$$

Průtok nosného plynu sorbentem byl v rozmezí od 15 do 55 ml min⁻¹ s dělicím poměrem 1:27 až 1:96, který umožnil udržovat konstantní průtok do hmotnostního spektrometru na 0,58 ml min⁻¹. Všechna měření byla pětikrát opakována.

Zpracování výsledků

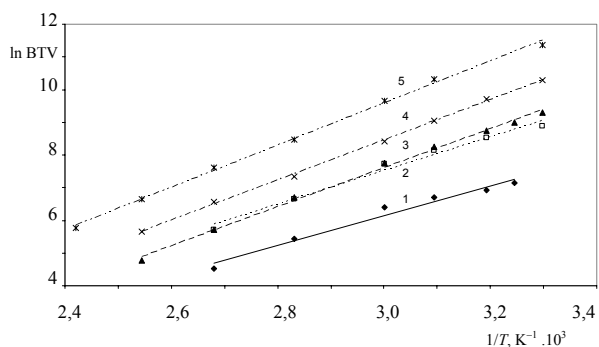
Pro statistické zpracování naměřených dat byl využit program SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA), a to části vyhodnocující lineární regresi použitého modelu a dále programy řady MS Office XP, předně Microsoft Excel.

Výsledky a diskuse

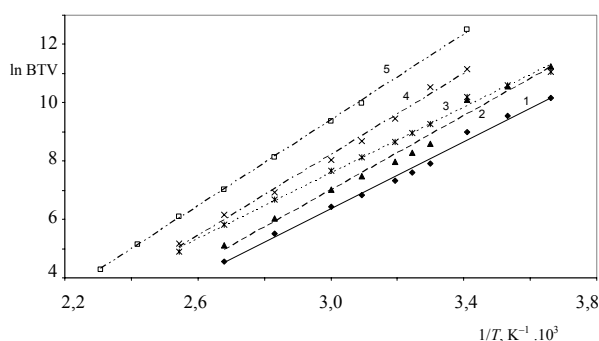
Hodnoty BTV vypočtené podle rovnice (1) z naměřených čistých retenčních časů a tlakových korekčních faktorů jsou uvedeny v tabulce I.

Výsledky ukazují na silnou teplotní závislost průnikových objemů zkoumaných VOC na Tenaxu TA. Např. BTV chloroformu klesá v rozmezí teplot od 0 °C do 100 °C 190×, u methylacetátu potom činí tento pokles během stejného teplotního intervalu násobek 482. I v malém teplotním rozmezí běžných odběrových teplot (0 až 30 °C) může být změna BTV řádová, a to např. u dimethylsulfidu (9,3×) a methylacetátu (14×).

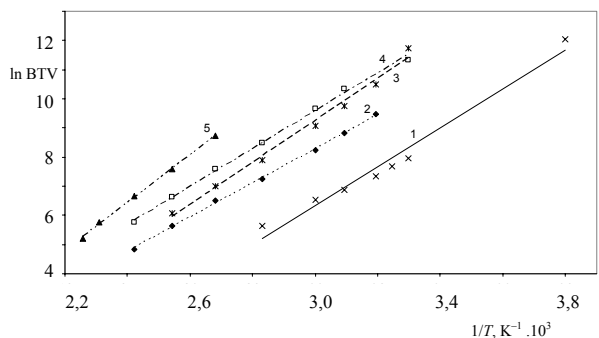
V dostupné literatuře nebyly nalezeny informace o experimentálně zjištěných BTV za běžných odběrových teplot. Srovnání našich výsledků s BTV uveřejněnými společností SIS, Inc.⁶ ukazuje například pro chloroform při teplotách 0, 20, 40 a 60 °C rozdíly pohybující se v intervalu 0,57 až 1,6 násobku našich experimentálních výsledků. To může být způsobeno rozdílným postupem při výpočtu (nebyl použit tlakový korekční faktor) a tím, že



Obr. 2. Graf závislosti přirozeného logaritmu BTV na recipročné hodnotě absolutní teploty pro n-pentan (1), n-hexan (2), 1-hexen (3), trichlorethen (4) a tetrachlorethen (5).



Obr. 3. Graf závislosti přirozeného logaritmu BTV na recipročné hodnotě absolutní teploty pro dimethylsulfid (1), methylacetát (2), chloroform (3), ethylacetát (4) a dimethyldisulfid (5).



Obr. 4. Graf závislosti přirozeného logaritmu BTV na recipročné hodnotě absolutní teploty pro aceton (1), benzen (2), 2-pentanon (3), toluen (4) a m-xylen (5).

data SIS, Inc. jsou pro tyto odběrové teploty extrapolována z vyšších teplot.

Dalším krokem při zpracování dat byla aplikace rovnice (3) na výsledky BTV z našeho měření. Ze statistických výsledků, prezentovaných v tabulce II, je patrné, že rovnice (3) uspokojivě vysvětluje teplotní závislost BTV s hodnotami spolehlivosti R^2 od 0,9737 (aceton, počet

Tabulka II

Výsledky aplikace rovnice (3) na experimentální data BTV. A_1 a C_1 jsou konstanty rovnice (3), ΔH_T je adsorpční entalpie [kJ mol^{-1}] látek na Tenaxu TA, R^2 je hodnota spolehlivosti pro n naměřených bodů, BTV 20 °C je předpokládaný průnikový objem látky při 20 °C [ml g^{-1}] a SSV 20 °C je bezpečný vzorkovací objem vzduchu pro danou látku při 20 °C [ml g^{-1}] vypočítaný z rovnice (4)

Látka	A_1	C_1	$-\Delta H_T$	R^2	n	BTV 20 °C	SSV 20 °C
Pentan	4567 ± 368	-7,55 ± 1,11	38,0 ± 3,1	0,9746	6	3,07E+03	2,05E+03
Hexan	5168 ± 321	-7,99 ± 0,97	43,0 ± 2,7	0,9848	6	1,54E+04	1,02E+04
Hex-1-en	5955 ± 136	-10,25 ± 0,41	49,5 ± 1,1	0,9969	8	2,35E+04	1,57E+04
Benzen	5869 ± 92	-9,32 ± 0,26	48,8 ± 0,8	0,9988	7	4,44E+04	2,96E+04
Toluen	6455 ± 150	-9,78 ± 0,43	53,7 ± 1,2	0,9973	7	2,07E+05	1,38E+05
<i>m</i> -Xylen	8180 ± 201	-13,19 ± 0,49	68,0 ± 1,7	0,9982	5	2,46E+06	1,64E+06
Aceton	6650 ± 489	-13,62 ± 1,58	55,3 ± 4,1	0,9737	7	8,64E+03	5,76E+03
Pentan-2-on	7212 ± 319	-12,41 ± 0,94	60,0 ± 2,7	0,9903	7	1,97E+05	1,31E+05
Dimethylsulfid	5769 ± 165	-10,95 ± 0,53	48,0 ± 1,4	0,9935	10	6,18E+03	4,12E+03
Dimethyldisulfid	7349 ± 69	-12,66 ± 0,20	61,1 ± 0,6	0,9995	8	2,45E+05	1,63E+05
Chloroform	5631 ± 127	-9,30 ± 0,40	46,8 ± 1,1	0,9954	11	2,01E+04	1,34E+04
Trichlorethen	6166 ± 90	-10,04 ± 0,27	51,3 ± 0,7	0,9989	7	5,95E+04	3,97E+04
Tetrachlorethen	6430 ± 138	-9,71 ± 0,39	53,5 ± 1,1	0,9977	7	2,04E+05	1,36E+05
Methylacetát	6399 ± 285	-12,20 ± 0,91	53,2 ± 2,4	0,9844	10	1,52E+04	1,01E+04
Ethylacetát	6908 ± 230	-12,51 ± 0,70	57,4 ± 1,9	0,9934	8	6,32E+04	4,22E+04

naměřených bodů $n = 7$) do 0,9995 (dimethylsulfid, $n = 5$). Grafické znázornění naměřených hodnot a lineárního modelu rovnice (3) je zobrazeno na obr. 2 až 4.

Ze směrnice regresní přímky byly vypočítány adsorpční entalpie uvedených látek na Tenaxu TA. Jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce II a pohybují se v rozmezí od $-38,0 \pm 3,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ (*n*-pentan) do $-68,0 \pm 1,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ (*m*-xylen). S rostoucí absolutní hodnotou adsorpční entalpie roste interakce mezi adsorbentem a adsorbátem, a to v řadě *n*-pentan, *n*-hexan, chloroform, dimethylsulfid, benzen, 1-hexen, trichlorethen, methylacetát, tetrachlorethen, toluen, aceton, ethylacetát, 2-pentanon, dimethyldisulfid a *m*-xylen. Z hodnot adsorpčních entalpií lze odhadnout, že tato interakce byla pouze fyzikálního charakteru a nedocházelo k tvorbě kovalentních vazeb¹⁴. Zjištěné hodnoty adsorpční entalpie je možné porovnat s literaturou^{10,15-17}, kde jsou však použity jiné sorbenty než Tenax TA. Např. Bilgiç a Aşkin ve své práci¹⁵ zjistili adsorpční entalpie pro *n*-hexan na alumině ($-41,0 \text{ kJ mol}^{-1}$) a molekulových sítích 5A ($-27,5 \text{ kJ mol}^{-1}$) a 3A ($-34,7 \text{ kJ mol}^{-1}$) při experimentech provedených za teplot nad 200 °C. Grajek a spol.¹⁶ uvedli adsorpční entalpie několika látek na třech typech aktivního uhlí (WS-4, NP-5 a R) a výsledky pro *n*-hexan činily $-75,9$; $-100,2$ a $-88,3 \text{ kJ mol}^{-1}$, v teplotním rozmezí od 250 do 320 °C.

Výsledky měření průnikových charakteristik patnácti

organických látek na Tenaxu TA v celkovém teplotním rozsahu od -10 °C do 170 °C ukazují na vysokou teplotní závislost průnikových objemů a tedy i bezpečných vzorkovacích objemů. Důsledkem toho pak musí být uváženo vzorkování kontaminovaného ovzduší tak, aby během tohoto, z hlediska analýzy organických látek nejdůležitějšího procesu, nedocházelo k úniku analytů a k znehodnocení výsledků celého měření. Praktickým příkladem jsou pak v tabulce II průnikové objemy a bezpečné vzorkovací objemy látek při běžné odběrové teplotě 20 °C, vypočtené z rovnic (3) a (4). Z výsledků vyplývá, že zkoumaný analyt s nejnižší retencí vůči Tenaxu – *n*-pentan – lze vzorkovat na trubičku s obsahem 1 gram Tenaxu TA pročerpáním maximálního doporučeného objemu vzorku zkoumané atmosféry (SSV) v množství 2,05 litrů.

Autoři děkují profesoru Jo Dewulfovi, profesoru Hermanu Van Langenhovi a Patricku De Wispelaere (Ústav organické chemie, Univerzita Gent, Belgie) za jejich významnou pomoc při provádění laboratorních experimentů a dále profesoru Miklósi Görgényimu (Ústav fyzikální chemie, Univerzita Szeged, Maďarsko) za odborné rady.

Seznam používaných zkratk

BTV	Breakthrough volume – průnikový objem
CTS	Close two phase system – uzavřený dvoufázový systém
SSV	Save sampling volume – bezpečný vzorkovací objem
VOC	Volatile organic compounds – těkavé organické látky

LITERATURA

1. U.S. Environmental Protection Agency: Compendium Method TO-17, Determination of Volatile Organic Compounds in Ambient Air Using Active Sampling Onto Sorbent Tubes, Cincinnati USA, 1999.
2. Alltech, Catalog 550, <http://www.alltechweb.com/US/Catalog.asp>, 141, (2003), staženo 25. března 2003.
3. Maier I., Fieber M.: *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 11, 566 (1988).
4. Simon V., Riba M. L., Waldahrt A., Torres L.: *J. Chromatogr., A* 704, 465 (1995).
5. Baya M. P., Siskos P. A.: *Analyst* 121, 303 (1996).
6. Scientific Instrument Services, Inc.: Tenax™ TA Adsorbent Resin Physical Properties, SIS, Inc., <http://www.sisweb.com/index/referenc/tenaxta.htm>, staženo 25. března 2003.
7. Manura J. J.: Calculation and Use of Breakthrough Volume Data, SIS, Inc., <http://www.sisweb.com/index/referenc/resin10.htm>, staženo 25. března 2003.
8. Rotzsche H.: *Stationary Phases in Gas Chromatography*. Elsevier Science, Amsterdam, 1991.
9. Halász I., Heine E.: *Anal. Chem.* 39, 1313 (1967).
10. Stanetzek I., Giese U., Schuster R. H., Wunsch G.: *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 57, 128 (1996).
11. Brown R. H., Purnell C. J.: *J. Chromatogr.* 179, 79 (1979).
12. Dewulf J., Ponnet D., Van Langenhove H.: *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 62, 289 (1996).
13. Sander R.: Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry (Version 3), <http://www.mpch-mainz.mpg.de/~sander/res/henry.html>, (1999), staženo 25. března 2003.
14. Popl M., Fährnich J.: *Analytická chemie životního prostředí*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 1999.
15. Bilgiç C., Aşkin A.: *J. Chromatogr., A* 1006, 281 (2003).
16. Grajek H., Witkiewicz Z., Jankowska H.: *J. Chromatogr., A* 787, 87 (1997).
17. Chiang H. L., Huang C. P., Chiang P. C.: *Chemosphere* 46, 143 (2002).

A. Kroupa, I. Viden, and S. Vodrážka (*Department of Gas, Coke and Air Protection, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Breakthrough Characteristics of Selected Organic Compounds on Tenax TA**

Tenax TA is a widely used sorbent in analysis of trace levels of organic compounds in ambient air due to its excellent properties – strongly hydrophobic, heat-stable and having low analytical background. The use of Tenax TA for field sampling requires the knowledge of safe sampling volumes (SSV). The breakthrough volumes (BTV) and adsorption enthalpies of 15 organic compounds (*n*-pentane, *n*-hexane, hex-1-ene, benzene, toluene, *m*-xylene, acetone, pentan-2-one, dimethyl sulfide, dimethyl disulfide, chloroform, trichloroethene, tetrachloroethene, methyl acetate and ethyl acetate) on Tenax TA were determined and their SSV were calculated.

DIFERENCIÁLNÍ PERMEAMETR URČENÝ K MĚŘENÍ PROPUSTNOSTI PLYNŮ A PAR ORGANICKÝCH LÁTEK SKRZE PLOCHÉ POLYMERNÍ MEMBRÁNY

LADISLAV HENDRICH, VLADIMÍR HYNEK
a MILAN ŠÍPEK

Ústav fyzikální chemie, Fakulta chemicko-inženýrská,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
hendrich@centrum.cz

Došlo 1.11.04, přijato 19.1.05.

Klíčová slova: diferenciální permeametr, koeficient propustnosti, polymerní membrány

Úvod

Pro výběr vhodné polymerní membrány určené k separaci plynů nebo par je nezbytná znalost jejich transportních vlastností. Predikce transportních vlastností je komplikována anomáliemi v chování polymer – čistá látka nebo trojice polymer – složka 1 – složka 2, zejména pro směsi par při různém stupni sycení. Literárních údajů o těchto vlastnostech je stále nedostatek.

Proto byl zkonstruován nový diferenciální permeametr, který lépe vyhovuje pro stanovení koeficientů propustnosti nejen plynů, ale také nasycených i nenasyčených par a jejich směsí, a u kterého byly realizovány některé úpravy, umožňující měření v širším rozsahu propustností a řízení experimentu počítačem.

Při konstrukci přístroje bylo užito osvědčených prvků z dřívějšího uspořádání¹, zejména použití katarometru s termistory, integrovaného do výstupního oddělení měřicí cely² a kohoutu V1 (obr. 1) do vstupního oddělení cely, obojí pro snížení deformace signálu vlivem parazitních časových konstant a dopravního zpoždění.

U diferenciální metody jsou páry látky prošle skrze membránu odváděny nosným plynem s průtokem v k detektoru a pro hustotu difúzního toku látky vzhledem k nehybnému polymeru lze ve stacionárním stavu $J_s(t \rightarrow \infty)$ psát²:

$$J_s = \frac{v \cdot c_s}{A} \quad (1)$$

kde c_s je molární koncentrace dané látky ve stacionárním stavu a A je aktivní plocha membrány. Ve stacionárním

stavu je $J_s = \text{konst.}$, $A = \text{konst.}$ a z toho plyne, že součin $v \cdot c_s$ je rovněž konstantní. Protože platí, že signál čidla je přímo úměrný koncentraci měřené látky, pak ve stacionárním stavu

$$v \cdot u_s = \text{konst.} \quad (2)$$

kde u_s je maximální signál katarometrického čidla ve stacionárním stavu (dále jen *maximální signál*, obrázek 2).

Za předpokladu, že koncentrace látky (plynu nebo par) v membráně je lineární funkcí vnějšího rovnovážného tlaku, lze na základě 1. Fickova zákona při konstantním difúzním koeficientu vyjádřit hustotu difúzního toku J vztahem⁴

$$J = -P \left(\frac{\partial p}{\partial x} \right) \quad (3)$$

kde $(\partial p / \partial x)$ je gradient tlaku látky v membráně a P je koeficient propustnosti udávající množství látky prošle jednotkovou plochou membrány za jednotku času při jednotkovém gradientu tlaku. Integrací vztahu (3) za počátečních a okrajových podmínek $p = p_1$ při $x = 0$ a $p = p_2$ při $x = L$ v čase $t \geq 0$ získáme pro stacionární stav vztah:

$$P = \frac{J_s \cdot L}{(p_1 - p_2)} \quad (4)$$

kde p_1 a p_2 jsou stále rovnovážné tlaky látky po obou stranách membrány ($p_1 > p_2$) a L je tloušťka membrány.

Za podmínek experimentu, kdy předpokládáme na jedné straně polymerní membrány stálou koncentraci měřené látky a na druhé straně při $x = L$ předpokládáme její koncentraci stále nulovou, je $p_2 = 0$. Při stanovení koeficientu propustnosti par je gradient tlaku dán parciálním tlakem par p_V v nosném plynu a ze vztahu (4) plyne, že

$$P = J_s \frac{L}{p_V} \quad (5)$$

Pro diferenciální metodu je hustota difúzního toku ve stacionárním stavu konstantní a dosazením rovnice (1) do rovnice (5) dostaneme

$$P = \frac{v \cdot c_s \cdot L}{A \cdot p_V} \quad (6)$$

Nalezení vztahu mezi koncentrací měřené látky c_s a signálem katarometrického čidla u_s je popsáno v kapitole Kalibrace přístroje.

Experimentální část

Popis přístroje

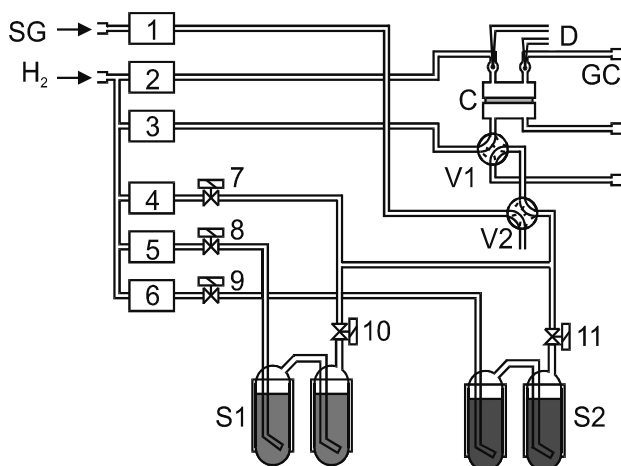
Blok měřicí cely

Blok měřicí cely byl konstruován⁵ ve spolupráci s firmou MIKROPUR s.r.o., kde byla cela také vyrobena.

Hlavním cílem při konstrukci nové měřicí cely bylo snížení vlivu parazitních rušivých vlivů na stabilitu signálu katarometrického čidla při zachování nízkých časových konstant a dopravních zpoždění. Proto bylo osvědčené pístové uspořádání² nahrazeno kompaktním nerezovým blokem, děleným v úrovni membrány na část vstupní, sdruženou s ventilem V1 (obrázek 1) a část výstupní, která obsahuje katarometrické čidlo indikující koncentraci permeátu v nosném plynu¹. Hlavním důvodem k těmto změnám bylo to, aby umístění obou termistorů, referenčního i měřicího, bylo dokonale shodné vzhledem k toku nosného plynu. Tím bylo dosaženo podstatného snížení změn výstupního signálu vlivem změn průtoku a teploty přicházejícího nosného plynu.

Detektorová část je opatřena termostatovacím pláštěm spojeným s vnějším okruhem kapalinového kryotermostatu. Membrána o průměru 45 mm je fixována na detektorové části tak, aby po vložení mohla být vizuálně kontrolována. Účinná plocha membrány, 10 cm², je určena vnitřním průměrem nerezového přídržného kroužku a jediným O-kroužkem je těsněna jedna strana membrány proti druhé i proti exteriéru. Ventil V1 je součástí měřicí cely z důvodu minimalizace dopravního zpoždění při výměně nosného plynu za měřený plyn. Je ovládán elektromotorem bez reverzace přes odpruženou ojnici. Toto řešení umožňuje dostatečně rychle měnit polohu kohoutu bez tlakových rázů a rušivých elektrických pulzů. Počítač komunikuje s elektromotorem pomocí dvou bitů digitálního výstupu a polohu ventilu V1 kontroluje pomocí dvou bitů digitálního vstupu, spojených s elektromechanickými (koncovými) spínači.

Blok měřicí cely je umístěn ve skříni rozdělené na dvě oddělení, která jsou termostatována na teploty o 1 až 4 °C vyšší než je teplota měřicí cely. V této skříni je umístěna i saturační jednotka a trubice, kudy jsou vedeny



Obr. 1. Schéma diferenciálního permeamtru; SG – měřený plyn, H₂ – nosný plyn (vodík), C – měřicí cely, GC – plynový chromatograf, V1 a V2 – čtyřcestné ventily, S1 a S2 – saturátory, 1 až 6 – regulátory průtoku, 7 až 11 – elektromagnetické ventily, D – tepelně-vodivostní detektor

zejména nasycené páry, aby bylo vyloučeno riziko kondenzace par při nižších okolních teplotách.

Rozvod plynu, stabilizátory, saturátory

Jako nosný plyn je použit vodík, jehož vysoká tepelná vodivost je výhodná při použití katarometrického čidla. Vodík se přivádí do přístroje pod tlakem o 60–120 kPa vyšším, než je atmosférický tlak. Na vstupu se rozděluje do pěti větví (obr. 1).

Průtok vodíku ve všech větvích je stabilizován elektronickými stabilizátory 306 KA/RA firmy THEVIA s.r.o. Z výstupu prvního stabilizátoru je vodík veden do detektorového oddělení měřicí cely, z druhého do kohoutu V1, odkud při jeho klidové poloze proudí do vstupní části měřicí cely, při poloze „experiment“ do přímého výstupu. Dále je vodík veden do saturační jednotky. Měřený plyn je do kohoutu V1 veden rovněž přes elektronický stabilizátor průtoku. Všechny plyny přiváděné do bloku měřicí cely jsou termostatovány kapalinou z vnějšího okruhu kryotermostatu. Aby se zabránilo vzniku tlakového rozdílu na membráně, jsou výstupy plynů z cely a z kohoutu V1 vedeny krátkými trubicemi do společné vyrovnávací nádržky, odkud jsou odsávány. Všechny přívody plynů před měřicí celou, kde je tlak byt jen nepatrně vyšší než atmosférický, jsou kovové (nerezová ocel nebo měď).

Pro měření propustnosti par je třeba nasycit nosný plyn (vodík) parami na požadovaný stupeň sycení. Místo dvou jednostupňových saturátorů řazených za sebou u staršího permeamtru² bylo použito jednoho dvoustupňového nebo třístupňového saturátoru⁶. Jeden saturátor se může naplnit přibližně 50 cm³ kapaliny. Objemy parních prostorů saturátorů musí být voleny tak, aby nedocházelo ke strhávání kapek, výška každého stupně saturátoru musí být alespoň 3 cm, saturátory byly úspěšně odzkoušeny pro průtoky od 5 do 100 cm³ min⁻¹. Saturátory jsou vybaveny termostatovacími plášti a zapojeny do vnějšího okruhu kryotermostatu, stejně jako měřicí cely.

Saturační jednotka má tři větve. Dvě obsahují saturátory a třetí slouží k přimíchávání čistého vodíku k vodíku nasycenému parami a tímto způsobem se na výstupu saturační jednotky vytvářejí páry o daném stupni sycení. Dvě saturační větve slouží k tomu, aby mohly být měněny měřené páry bez demontáže saturátorů a k přípravě binárních směsí par (nasycených i nenasyčených)^{7,8}.

Elektronická část přístroje

Elektronické obvody pro napájení a zesílení výstupu katarometrického Wheatstoneova mostu byly s nepatrnými úpravami převzaty z předcházejícího přístroje². Termistory (firmy BETATHERM) použitelné do 150 °C jsou zapojeny v sousedních větvích Wheatstoneova mostu, jehož napájecí proud je stabilizován tak, aby byl udržován konstantní součet celkového proudu mostu a proudu referenčním termistorem. Tento způsob stabilizace potlačuje zpětný vliv změn odporu a tím pak i proudu měřicího termistoru na referenční termistor a zlepšuje stabilitu výstupního signálu, čímž se zrychluje odezva katarometru. Wheatstoneův most se vyvažuje potenciometrem, jehož začátek

a konec jsou zapojeny každý do jedné větve mostu a jezdec je přes snímací odpor celkového proudu mostu připojen k záporné větvi napájecího zdroje. To umožňuje vyvážit most nastavením proudů (teplot) v obou větvích mostu podle minima změny výstupního signálu vyvolané změnou napájecího proudu mostu. Nulové napětí na výstupu zesilovače se pak nastaví nezávisle na rovnováze mostu přičtením napětí v neinvertující větvi diferenčního zesilovače.

Komunikace permeamtru s počítačem, programové vybavení

Pro komunikaci počítače s analogovými a digitálními vstupy a výstupy permeamtru slouží univerzální měřicí karta PCA 1408AS firmy TEDIA spol. s r. o. Z karty jsou využívány 14-bitový A/D převodník s osmi vstupy s programovaným zesílením, dva 12-bitové D/A převodníky s rozsahem 0 až +5 V, 2 bity digitálního vstupu a 7 bitů digitálního výstupu.

Frekvence vzorkování je nastavitelná až do 3 kHz pro každý z 8 měřicích kanálů. Základní rozsah A/D převodníku je ± 5 V, zesílení vstupů je opět programovatelné samostatně pro každý kanál, je možno zvolit zesílení 0,5x, 1x, 2x, 4x, 5x, 8x, 16x, 50x. Možnosti měnit zesílení je využíváno jen u výstupu katarometru, protože jeho výstupní napětí se může měnit ve velkém rozsahu.

Při experimentu jsou počítačem sledovány tyto analogové vstupy – průtok vodíku detektorem, průtok vodíku dolní částí cely (pro nastavení nulové linie), průtok měřeného plynu, průtok vodíku prvním saturátorem, průtok vodíku pro získávání nenasycených par, průtok vodíku druhým saturátorem, teplota měřicí cely, výstup katarometrického detektoru. Zároveň jsou počítačem nastavovány hodnoty následujících analogových výstupů – průtok vodíku pro snížení sycení par a průtok vodíku saturátorem (prvním nebo druhým).

Podle hodnoty digitálních vstupů počítač kontroluje polohu páky ventilu V1 a digitální výstupy slouží k ovládní nastavení polohy páky ventilu V1, řízení saturátorů počítačem, otevření prvního nebo druhého saturátoru a otevření vodíku pro přípravu nenasycených par.

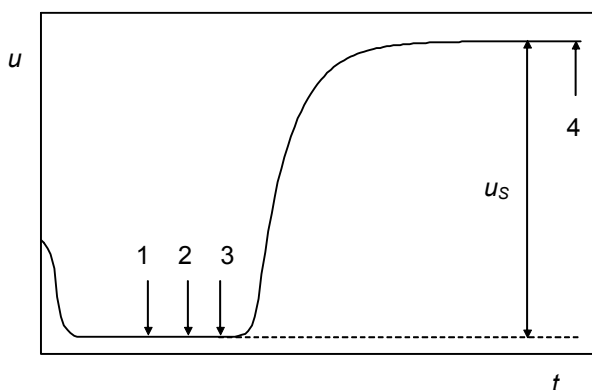
Řídicí program byl vytvořen v programu LabVIEW™ 5.0 firmy National Instruments™. Úkolem programového vybavení je pravidelné sledování parametrů, které mají rozhodující vliv na výsledek měření a zápis některých z nich do souborů pro pozdější matematické zpracování. Další část programového vybavení slouží k automatickému řízení experimentu.

Nejdůležitější proměnnou veličinou je signál katarometrického čidla. Tento signál je sledován ve dvou režimech: „nulová linie“ a „experiment“ (obr. 2). Řídicí program lze schématicky rozdělit takto:

- Páka kohoutu V1 se nastaví do polohy „nulová linie“, průtok vodíku přes saturátory se uzavře. Sledujeme průběh nulové linie a hodnoty ostatních parametrů pokusu. Kritériem stability signálu při „nulové linii“ je dostatečný časový interval od začátku měření

a dostatečně malý rozdíl průměrů signálů porovnávaných v určeném časovém intervalu, dále pak stabilita teploty a průtoků plynů.

- Jakmile jsou hodnoty parametrů v požadovaných mezích a „nulová linie“ je dostatečně stabilní, dojde k otevření některých elektromagnetických ventilů tak, aby vodík protékal těmi saturátory, jejichž páry chceme měřit.
- Po ustálení průtoků a vytlačení vzduchu ze saturátorů počítač spustí pokus, tj. nastaví kohout V1 do polohy „experiment“. Při pokusu zaznamenáváme čas, signál, teplotu, průtok vodíku detektorem a průtok měřených par. Během pokusu je možno měnit periodu vzorkování všech analogových vstupů, jejich zesílení, názvy souborů, do kterých se zapíše data, kritéria pro stabilitu nulové linie i počet měření s daným vzorkovým plynem (párou).
- Jakmile se dosáhlo ustáleného stavu (kritéria jsou stejná jako pro „nulovou linii“), program se vrací zpět k prvnímu bodu, naměřená data se zpracují a uloží. Pokud nejsou nastaveny údaje pro další pokus, pak program v tomto místě končí. Jednotlivé fáze měření jsou vidět na obr. 2.



Obr. 2. Závislost signálu na čase u diferenciální metody; 1 – ustálená nulová linie, 2 – nastavení průtoků přes saturátory, 3 – nastavení páky ventilu V1 do polohy „experiment“, 4 – přestavení páky ventilu V1 do polohy „nulová linie“, u_s – maximální signál katarometrického detektoru v ustáleném stavu (dále jen „maximální signál“)

Testování přístroje a kalibrace

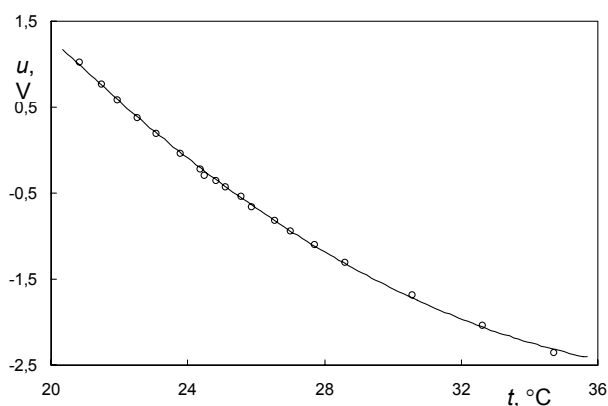
Aby permeametr poskytoval spolehlivé výsledky, je třeba otestovat vliv několika nejdůležitějších parazitních dějů na stabilitu signálu a hodnotu u_s . Z rušivých dějů, které mohou mít rozhodující vliv na stabilitu signálu, byly testovány:

- teplota měřicí cely
- průtok nosného plynu (vodíku) detektorem
- teplota vzduchu v okolí katarometrického detektoru
- teplota vzduchu v okolí vstupního kohoutu V1.

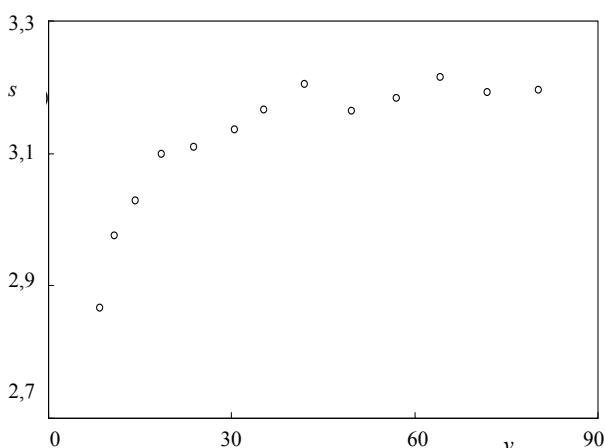
Hodnota u_s může záviset na použitém průtoku nosného plynu katarometrickým detektorem, proto se ověřuje, zda v daných podmínkách, v souladu s rovnicí (2), zůstává konstantní součin maximálního signálu a průtoku vodíku detektorem.

Testování vlivu teploty měřicí cely

Při měření nulové linie byl sledován signál katarometrického detektoru a signál převodníku teploty (čidlem teploty je tenkovrstvý platinový odporový teploměr Pt1000) a porovnáván s teplotou vodní lázně termostatu. Průtok vodíku na obou stranách membrány byl $50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Se zvyšující se teplotou klesá signál katarometrického čidla. Ustálení nulové linie při změně teploty o $0,5 \text{ K}$ trvá asi 15 min. Při zvýšení teploty o $0,003 \text{ K}$ klesne hodnota signálu katarometrického čidla zhruba o 1 mV .



Obr. 3. Závislost signálu katarometrického čidla na teplotě vodního termostatu



Obr. 4. Závislost součinu průtoku vodíku detektorem s ($\text{mV cm}^3 \text{ min}^{-1}$) a maximálního signálu na průtoku vodíku detektorem v ($\text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$)

Testování vlivu průtoku vodíku detektorem na hodnotu maximálního signálu

Vliv změny průtoku vodíku v rozmezí od 5 do $90 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ na stabilitu nulové linie byl zanedbatelný, přibližně $-0,2 \text{ mV min cm}^{-3}$. Vliv změny průtoku vodíku na druhé straně membrány byl neměřitelně malý.

Zvyšováním průtoku vodíku detektorovým oddělením cely se zřeďuje permeát a maximální signál musí klesat. V ideálním případě, podle rovnice (2), by mělo platit, že součin maximálního signálu a průtoku vodíku detektorem je konstantní. Odchytky od ideálního stavu mohou být způsobeny na vstupní straně membrány tím, že není udržena dostatečná koncentrace měřeného plynu (stupeň nasycení vodíku měřenou parou) a na výstupní straně tím, že koncentrace permeátu není nulová. Z naměřených dat je vidět, že průtok měřeného plynu (páry) i průtok vodíku detektorem budou muset být alespoň $30 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Menší průtoky se mohou použít u málo propustných membrán, aby se dosáhlo většího maximálního signálu.

Testování vlivu teploty vzduchu v okolí detektoru a v okolí vstupního kohoutu V1

Teploty vzduchu stabilizované pomocí vzdušných termostátů v okolí katarometrického detektoru a v okolí vstupního kohoutu V1 byly nastavovány v rozsahu $26 \text{ }^\circ\text{C}$ až $29 \text{ }^\circ\text{C}$. Teplota bloku měřicí cely byla $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a průtoky vodíku i měřeného plynu $30 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Za těchto experimentálních podmínek a v tomto rozsahu teplot nebyl vliv změny teplot na signál katarometrického čidla měřitelný. Okolí bloku měřicí cely musí být termostatováno na vyšší teplotu než blok měřicí cely, aby se zabránilo kondenzaci par měřených látek, což hrozí zvláště u nasycených par.

Kalibrace přístroje

Kalibrace přístroje znamená najít vztah mezi signálem katarometrického čidla permeamtru a koncentrací měřené látky v proudu vodíku vystupujícího z cely.

Nejdříve byl kalibrován chromatograf a zjištěn vztah mezi látkovým množstvím měřené látky n a plochou píku chromatogramu A_p :

$$n = k_{CH} \cdot A_p \quad (7)$$

Páry měřených látek byly do chromatografu dávkovány pomocí šesticeštného ventilu se smyčkou o objemu 1 cm^3 .

Poté byla nalezena závislost mezi maximálním signálem permeamtru a plochou píku na chromatogramu. Spojením těchto dvou předchozích kalibrací byl získán vztah mezi koncentrací měřeného plynu na výstupu z cely a maximálním signálem.

$$c_s = k_{per} \cdot u_s \quad (8)$$

Výsledky a diskuse

Při odvozování vztahů pro výpočet koeficientu propustnosti jsme při přechodu od rovnice (4) k rovnici (5)

předpokládali, že gradient tlaku je dán parciálním tlakem par nebo plynu p_V v nosném plynu. Jinak řečeno jsme předpokládali, že měřený plyn membránou prochází tak málo, že jeho koncentrace je stejná na vstupu do cely jako na jejím výstupu. V detektorové části cely jsme předpokládali, že membrána je stále ve styku s čistým vodíkem a z cely odchází prakticky čistý vodík. V tomto případě pak platí, že se změnou průtoku vodíku detektorem zůstává konstantní součin průtoku vodíku detektorem a maximálního signálu (2). Nenulový signál na detektoru znamená, že z horní části cely neodchází čistý vodík. Pokud vyjdeme ze stavové rovnice ideálního plynu, pak pro tlak měřené látky při $x = L$ dostáváme

$$p_2 = \frac{n \cdot R \cdot T}{V} = c \cdot R \cdot T \quad (9)$$

Dosazením za c z rovnice (8) dostaneme rovnici pro výpočet parciálního tlaku měřené látky v nosném plynu na výstupu z cely

$$p_2 = u_S \cdot k_{per} \cdot R \cdot T \quad (10)$$

Na následujícím grafu však je vidět, že průtok nosného plynu může značně ovlivnit naměřené koeficienty propustnosti, zvláště při měření propustnosti látky s malou tenzí skrze membránu s vysokou propustností. Proto nemůžeme považovat střední koncentraci látky na straně permeátu (výstupu do detektoru) za nulovou. Protože membrána nepředstavuje v ustáleném stavu zadrž měřených par, musí být o stejnou hodnotu (p_2) zmenšena koncentrace retentátu, pokud je průtok stejný na obou stranách membrány. Rozdíl tlaku, který je hnací silou permeace, je pak

$$p_{kor} = p_V - p_2 \cdot f \quad (11)$$

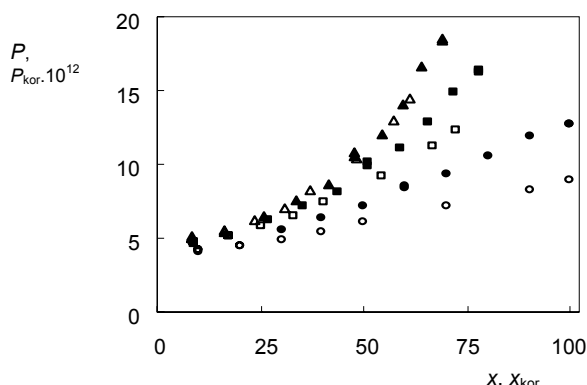
kde faktor f se může pohybovat v rozmezí od nuly do dvou a jeho velikost závisí na experimentálním uspořádání. Přesnou velikost tohoto faktoru můžeme stanovit ze závislosti koeficientu propustnosti na průtoku vodíku detektorem. Jeho vliv na koeficienty propustnosti je také ukázán v následujícím grafu. Spojením rovnic (11), (10) a $p_V = x_i \cdot p_i^\ominus$ dostaneme

$$x_{kor} = x_i - \frac{u_S \cdot k_{per} \cdot R \cdot T \cdot f}{p_i^\ominus} \quad (12)$$

a vztah (6) přejde na

$$P_{kor} = \frac{v \cdot u_S \cdot k_{per} \cdot L}{A \cdot x_{kor} \cdot p_i^\ominus} \quad (13)$$

Např. při měření koeficientu propustnosti par toluenu s parciálním tlakem toluenu rovným 50 % tenze par toluenu skrze polyether-blok-polyamidovou membránu a při průtoku vodíku detektorem 50 ml min⁻¹ je na výstupu z cely koncentrace par toluenu přibližně 13 % tenze par



Obr. 5. Závislost koeficientu propustnosti toluenu P (P_{kor}) (mol/m s Pa) na stupni sycení par toluenu x (x_{kor}) (%) pro polyether-blok-polyamidovou membránu, pro průtoky vodíku detektorem 50 cm³ min⁻¹ a 90 cm³ min⁻¹ a pro různě velkou korekci dle rovnice (13); ○ $v = 50$ ml min⁻¹ a $f = 0$, □ $v = 50$ ml min⁻¹ a $f = 1$, △ $v = 50$ ml min⁻¹ a $f = 1,4$, ● $v = 90$ ml min⁻¹ a $f = 0$, ■ $v = 90$ ml min⁻¹ a $f = 1$, ▲ $v = 90$ ml min⁻¹ a $f = 1,4$

toluenu. A to je hodnota, kterou už nejde zanedbat proti koncentraci par vstupujících do cely a proto budou nutné relativně velké korekce. Na obr. 5 je ukázán vliv korekce dle rovnice (13). Pro $f = 0$ není použito žádné korekce. Při korekci $f = 1$ snižujeme hnací sílu (rozdíl parciálních tlaků par mezi jednou a druhou stranou membrány) právě o koncentraci par toluenu na výstupu z horní části cely. Pro $f = 1$ jsou vypočtené koeficienty propustnosti méně závislé na průtoku nosného plynu, ale ještě stále nejsou na tomto průtoku nezávislé. Proto jsou v grafu body pro $f = 1,4$, kdy vypočtené koeficienty propustnosti na průtoku nosného plynu nezávislejší.

Při odhadu chyby měření se vycházelo z rovnice (6). Relativní chyba koeficientu propustnosti je rovna součtu následujících relativních chyb:

- Průtoku vodíku detektorem – Absolutní chyba v průtoku vodíku detektorem je asi 0,2 cm³ min⁻¹, což znamená relativní chybu 2,0 % až 0,2 % pro průtoky vodíku detektorem 10 cm³ min⁻¹ až 90 cm³ min⁻¹.
- Maximálního signálu – Tady je absolutní chyba přibližně 2 mV, což znamená relativní chybu 10 % až 0,04 % pro maximální signály 20 mV až 5 V.
- Konstanty k_{per} – Relativní chyby kalibračních konstant dosahují hodnot do 20 %.
- Tloušťky membrány – Vzorčky membrán nemají po celé ploše stejnou tloušťku a relativní chyba v tloušťce membrány je 2 %.
- Stupně sycení par – Největších chyb se dopouštíme u nízkých sycení par organických látek, relativní chyby stupně sycení par se pohybují v rozmezí 5 % až 0,5 %.
- Plochy membrány a tenze par čistých látek – Tyto chyby jsou v porovnání s předcházejícími zanedbatelné a dále nebudou uvažovány.

Závěr

- Provedené testy přístroje a naměřené výsledky ukazují:
- U nového permeamtru se podařilo snížit vlivy teploty a průtoku nosného plynu na stabilitu signálu katarometru.
 - Výhoda řízení permeamtru počítačem spočívá v možnosti předprogramování experimentů. Měření je produktivnější a látky v saturátorech vydrží déle bez doplnění.
 - Je patrné, že pro dosažení stavu, kdy hodnoty koeficientu propustnosti nezávisí na průtoku vodíku detektorem, je nutné použít korekci gradientu tlaku.
 - Průtoky je možno měnit v rozsahu od $10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ (při menších průtocích je velká relativní chyba průtoku) do $100 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ (maximální průtok regulátorem).
 - Zesílení signálu je možné volit tak, že rozsah A/D převodníku je $\pm 0,1 \text{ V}$ až $\pm 10 \text{ V}$ (rozlišení vždy 14 bitů). Zmenšení průtoku vodíku detektorem vede ke zvýšení maximálního signálu, což umožňuje měřit i málo propustné membrány.
 - Měření lze provádět při $10 \text{ }^\circ\text{C}$ až $50 \text{ }^\circ\text{C}$.
 - Mohou být měřeny membrány o celkové tloušťce $30 \text{ }\mu\text{m}$ (slabší membrány se příliš prohýbají) až 1 mm (maximální tloušťka membrány vyplývající z konstrukce cely).
 - Stupeň nasycení vodíku organickými parami se pohybuje v rozmezí 10% (nastavení menších stupňů nasycení je velmi nepřesné) až 90% (riziko kondenzace par).
 - Naměřené koeficienty propustnosti dosahují hodnot zhruba $10^{-11} \text{ mol m}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ až $10^{-15} \text{ mol m}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Práce vznikla za podpory grantu GA ČR č. 104030388 a MSM 6046137307.

S e z n a m s y m b o l ů

A	plocha membrány, $A=10 \text{ cm}^2$, m^2
A_p	plocha píku na chromatogramu, V s
c, c_S	látková koncentrace, látková koncentrace ve stacionárním stavu, mol m^{-3}
f	koeficient z rovnice (11), 1
J	hustota molárního difúzního toku látky, $\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$
J_S	hustota molárního difúzního toku látky ve stacionárním stavu, $\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$
k_{CH}	konstanta z rovnice (7), $\text{mol V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k_{per}	konstanta z rovnice (8), $\text{mol m}^{-3} \text{ V}^{-1}$
L	tloušťka membrány, m
n	látkové množství, mol
P	koeficient propustnosti, $\text{mol m}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \text{ s}^{-1}$
p	tlak, Pa
p_{kor}	rozdíl tlaku po korekci zodpovědný za permeaci, Pa

p_1, p_2	tlaky měřené látky na horní a dolní straně membrány, Pa
P_{kor}	korigovaný koeficient propustnosti, $\text{mol m}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \text{ s}^{-1}$
p^{θ}	parciální tlak par při teplotě saturátoru, Pa
p_V	parciální tlak par nebo plynu, Pa
R	univerzální plynová konstanta, $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
s	součin průtoku vodíku detektorem a maximálního signálu, $\text{V m}^3 \text{ s}^{-1}$
t	čas, s
T	teplota (saturátorů a cely), K
u	napěťový signál, V
u_S	napěťový signál ve stacionárním stavu, V
v	průtok vodíku detektorem (horní částí cely), $\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$
V	objem detektorové části cely, m^3
x	prostorová souřadnice, m
x_i	stupeň nasycení nosného plynu měřenou látkou i , 1
x_{kor}	stupeň nasycení nosného plynu měřenou látkou i po korekci, 1

LITERATURA

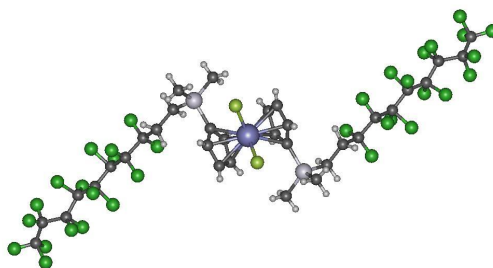
1. Yasuda H., Rosengren K.: *J. Appl. Polym. Sci.* 14, 2839 (1970).
2. Hynek V., Šípek M.: *Chem. Listy* 90, 938 (1996).
3. Crank J.: *The Mathematics of Diffusion*. Clarendon Press, Oxford 1975.
4. Crank J., Park G. S.: *Diffusion in Polymers*. Academic Press, London 1968.
5. Hendrich L., Hynek V.: *Konference Termodynamika 2001, Mlýn Břejlov u Týnce nad Sázavou, 13.–14. září 2001*, Sborník příspěvků, CD-ROM (bez editora). VŠCHT Praha, 2001.
6. Hovorka Š., Dohnal V.: *J. Chem. Eng. Data* 42, 924 (1997).
7. Bohatá K.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2001.
8. Friess K., Šípek M., Hynek V., Sysel P., Šindelář V.: *Ropa, uhlie, plyn a petrochémia* 42, 37 (2000).

L. Hendrich, V. Hynek, and M. Šípek (*Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemical Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Differential Measurement of Permeability of Gases and Organic Vapors through Flat Polymer Membranes**

A new type of differential measurement of permeability was described. The influence of temperature changes and flow rates on the accuracy of permeability measurement were tested and the device was calibrated by gas chromatography. The dependence of measured permeability coefficients on the flow rate of a carrier gas was investigated and a correction for elimination of the flow rate effect was proposed.



SIGMA-ALDRICH



V. MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ MLADÝCH BIOLOGŮ, BIOCHEMIKŮ A CHEMIKŮ

15. - 18. 6. 2005

Devět skal – Žďárské vrchy

sborník redigovali

Martin Fusek, Vladimír Pouzar, Pavel Drašar

V. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků

Pět let není mnoho, ale je to hodně tam, kde o něco jde. Pražská centrála firmy Sigma Aldrich je známa všem chemikům v zemi a slouží jim k jejich spokojenosti a k užítku věci. Slouží jim nicméně nejen jako obchodník; pracovníci firmy učí, přednáší, píšou odborné články atd. atd., a co víc, již pět let organizují setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků pracovně zvané „Amerika“, podle prvního místa konání, hotelu nedaleko Velkého Meziříčí.

Amerika se za pět svých pokračování stala prestižním setkáním toho nejlepšího, co mohou kolegové z nejmladší úspěšné skupiny přírodovědců nabídnout. Stala se prestižní kvůli výběru účastníků, kvůli úsilí, které účastníci i organizátoři věnují uspořádání a průběhu akce ale i kvůli společenské reflexi.

Když mi před nedávnem na schůzi v Bruselu vážení kolegové ze západnějších krajín doporučovali, ať i u nás uspořádáme konferenci mladých chemiků, mohl jsem odpovědět, že takové pořádáme již téměř třicet let, že byly velmi úspěšné a že jim jejich konání mohou doporučit též. Když jsem ale doplnil, že pražská společnost Sigma Aldrich již pět let pořádá spolu s naší společností a ČSBMB takovou akci s výběrem účastníků z několikanásobku přihlášených, akce má sborník otištěný v „impaktovaném“ časopise a nejlepší účastníci jsou vybráni porotou a odměněni firmou ΣA grantem v, na místní poměry, kulatní výši, dalších doporučení ze strany zkušenějších kolegů jsem se už nedočkal.

Přeji v pátém ročníku účastníkům soutěže mnoho zdaru a všem zúčastněným mladým kolegům hodně úspěchů v jejich vědecké práci, která je zjevně jejich koníčkem. Těm, kteří mají ještě větší kuráž, chci doporučit, aby se přihlásili i do soutěže o cenu Alfreda Badera či Josefa Koštíře, prestižní ceny udělované ČSCH a ČSBMB.

*Pavel Drašar,
místopředseda České společnosti chemické*

NOVÝ ELEKTROCHEMICKÝ BIOSENZOR VAZBY PLATINOVÝCH CYTOSTATIK DO STRUKTURY DNA

VOJTĚCH ADAM^{a,b}, JITKA PETRLOVÁ^a, DAVID POTĚŠIL^{a,b}, PŘEMYSL LUBAL^b, JOSEF ZEHNÁLEK^a, BERND SURES^d a RENÉ KIZEK^a

^aÚstav chemie a biochemie, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^bKatedra analytické chemie a ^cKatedra teoretické a fyzikální chemie, MU, PŘF, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^dUniv. Karlsruhe, Zool. Inst. Okol. Parasitol., Karlsruhe, D-76128, Německo

Ačkoliv je *cis*-platina (*cis*-diaminodichloroplatina(II)) úspěšně používána v chemoterapii rakovinových onemocnění více než-li 25 let, její biochemický mechanismus účinku je stále nejasný. Současným názorem popisujícím působení *cis*-platiny je, že léčivo cytotoxicky působí prostřednictvím vazby na jadernou DNA (vazba na guanin) a následně narušuje obvyklou transkripci anebo DNA replikační mechanismy. Nicméně před vstupem do buňky může být *cis*-platina vázána fosfolipidy a fosfatidylseriny, které se vyskytují v buněčné membráně. A navíc je v cytoplasmě buňky obsaženo mnoho potenciálních platinu vázajících látek zahrnujících RNA a síru obsahující biomolekuly jako je glutathion a metalothionein. Popsanými mechanismy se buňka brání před vstupem a účinky těžkých kovů, mezi něž patří i léčiva jako je platina. Terapeutická koncentrace léčiva je proto výrazně odlišná od aplikované dávky. V dnešní době je stále aktuálnější problémem uvolňování, akumulace a působení platiny, která se do životního prostředí dostává např. z katalyzátorů používaných v automobilech, na živé systémy. Z těchto důvodů se mnoho vědeckých pracovišť zabývá jak studiem vazby *cis*-platinových protirakovinových léčiv do DNA, tak studiem vlivu samotné platiny na organismy. Nedávno bylo publikováno několik prací popisujících stanovení těžkých kovů pomocí biosenzorů založených na interakci těžkého kovu s DNA, enzymem, bakterií a proteinem. Cílem této práce bylo navrhnout platinový biosenzor založený na interakci kovu s metalothioneinem (MT) modifikovanou rtuťovou kapkovou elektrodou. Navržený biosenzor byl aplikován pro detekci platiny v lidském krevní sérum a pro studium interakce DNA s cytostatiky založenými na bázi platiny. Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Holandsko) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Platina byla detekována pomocí adsorptivní přenosové rozpouštěcí techniky (AdTS) v kombinaci s diferenční pulzní voltametrií (DPV). Aplikovali jsme elektrodu modifikovanou MT pro stanovení *cis*-platiny v krevním séru. Do vzorků lidského krevního séra jsme přidali rozdílnou koncentraci *cis*-platiny (10, 20, 40, 80, 160, 350, 450, 530 a 650 μM). Signál odpovídající za vazbu platiny do struktury MT se s rostoucí koncentrací *cis*-platiny lineárně snižoval. Limit detekce *cis*-platiny navrženým biosenzorem se pohyboval kolem 2,5 μM . Námí navržený postup ukazuje možnou cestu pro snadnou, senzitivní a rychlou detekci léčiva v tělních tekutinách na pikomolové úrovni (10 pmolů v 5 μl kapce). Dále jsme využili námí navržený platinový biosenzor pro studium vazby *cis*-platiny do DNA. Detekční limit pro Pt-DNA komplex byl 312,5 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Navržený platinový biosenzor je využitelný pro

studium účinku platinových cytostatik na živé systémy. Sledování skutečné, terapeutické hladiny protirakovinového léčiva pomocí platinového biosenzoru může zvýšit účinnost léčby.

Příspěvek vznikl za podpory RASO 2005, GAČR 525/04/P132 a IGA MZLU 2005.

LITERATURA

1. Wu C.-M., Lin L.-Y.: *Biosen. Bioelectron.* 20, 864 (2004).
2. Palecek E.: *Anal. Biochem.* 170, 421 (1988).
3. Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).

ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE GENERATES THE COVALENT DNA-ADDUCTS IN RATS *IN VIVO*

DAGMAR AIMOVÁ^a, EVA FREI^b, and MARIE STIBOROVÁ^a

^aDepartment of Biochemistry, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague2; ^bDepartment of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, 69 120 Heidelberg, BRD

Ellipticine is a potent antineoplastic agent, whose mode of action is considered to be based mainly on DNA intercalation and/or inhibition of topoisomerase II. Recently, we found that ellipticine also forms covalent DNA adducts *in vitro* and *in vivo* and that the formation of the major adduct is dependent on the activation of ellipticine by cytochromes P450 (CYP)¹⁻⁴. Here, we investigated the details of formation of ellipticine-derived DNA adducts *in vivo*.

Male and female Wistar rats were treated with different doses of ellipticine (0.4, 4.0, 40.0, and 80.0 mg ellipticine per kg of body weight) and DNA from various organs was analyzed by ³²P-postlabeling. Ellipticine-specific DNA adduct patterns, similar to those found *in vitro*, were detected in most test organs (liver, kidney, lung, spleen, heart and brain), being concentration-dependent. Only DNA of testes was free of the ellipticine-DNA adducts. The highest level of DNA adducts was found in liver, followed by spleen, lung, kidney, heart and brain.

One major and one minor ellipticine-DNA adducts were found in DNA of all these organs of both genders of rats exposed to ellipticine. Besides these, two or three additional adducts were detected in DNA of liver, kidney, lung and heart. Two predominant adducts formed in rat tissues *in vivo* were identical to the deoxyguanosine adduct generated in DNA by two ellipticine metabolites formed by CYPs, 13-hydroxy-ellipticine and the *N*²-oxide of ellipticine, *in vitro* as shown by cochromatography in two independent systems. Correlation studies showed that the formation of the major DNA adduct *in vivo* (adduct generated by 13-hydroxyellipticine) is mediated by CYP3A1- and CYP1A-dependent reactions. The adducts generated by ellipticine in all rat tissues analyzed in the study are not persistent adducts. Bi-phase kinetics of their repairing was found in rat tissues tested in our work.

The results presented here are the first report showing the dose-dependent formation of CYP-mediated covalent DNA adducts by ellipticine *in vivo* and studying their persistence in the rat animal experimental model.

Supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (grant MSM0021620808).

REFERENCES

1. Stiborová M., Bieler C.A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1675 (2001).
2. Stiborová M., Stiborová-Rupertová M., Bořek-Dohalská L., Wiessler M., Frei E.: *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 38 (2003).
3. Stiborová M., Breuer A., Aimová D., Stiborová-Rupertová M., Wiessler M., Frei E.: *Int. J. Cancer* **107**, 885 (2003).
4. Stiborová M., Sejbál J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res.* **64**, 8374 (2004).

STUDIUM STEREOSELEKTIVNÍHO PRŮBĚHU [2+2+2] CYKLOIZOMERACE TRIYŇŮ A JEJÍ VYUŽITÍ V SYNTÉZE HELIKÁLNĚ CHIRÁLNÍCH ALKOHOLŮ V NERACEMICKÉ FORMĚ

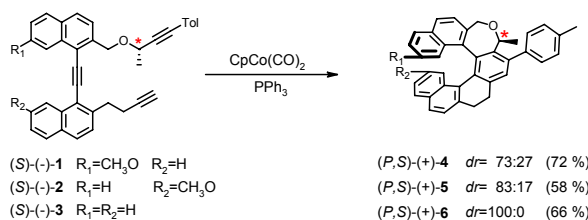
ZUZANA ALEXANDROVÁ, PETR SEHNAL, IRENA G. STARÁ, IVO STARÝ a DAVID ŠAMAN

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

V nedávné době jsme vyvinuli originální přístup k neracemickým derivátům helicenů¹, který je založen na stereoselektivní kobaltem(I) katalyzované [2+2+2] cykloisomerizaci aromatických triyňů obsahujících asymetrický atom uhlíku. Tento postup vedl k derivátům helicenů v diastereomerním poměru až 100:0 a helicity produktů byla předvídatelná ve všech studovaných případech².

Stereoselektivní [2+2+2] cykloisomerizaci triyňů jsme využili pro přípravu funkcionalizovaných derivátů [7]helicenu v neracemické formě. Soustředili jsme se na studium stereoselektivity cyklizace chirálních triyňů (S)-(-)-1 a (S)-(-)-2. Ukázalo se, že v obou případech vzniká očekávaný pravotočivý diastereomer (P,S)-(+)-4 resp. (P,S)-(+)-5, avšak poměr diastereomerů je horší než v případě cyklizace nefunkcionalizovaného triyňu (S)-(-)-3, kdy vzniká jediný diastereomer (P,S)-(+)-6 (cit.²).

V současné době jsou studovány strukturální modifikace s cílem zvýšit diastereoselektivitu cyklizace substituovaných triyňů. Ověřujeme také možnost získání opticky čistých produktů pomocí krystalizace. Otázka vlivu kinetických a termodynamických faktorů na sterický průběh reakce je předmětem dalšího výzkumu. Získané neracemické helikální alkoholy budou využity jako prekursory chirálních ligandů pro enantioselektivní katalýzu a pro konstrukci ethynyl-helicenových oligomerů.



Podporováno GAČR (reg. č. 203/02/0248) a ÚOCHB AV ČR (výzkumný projekt č. Z4 055 905).

LITERATURA

1. Urbano A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 3986 (2003).
2. Stará I. G., Alexandrová Z., Teplý F., Sehnal P., Starý I., Šaman D., Buděšinský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* **7**, v tisku (2005).

IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DEGRADUJÍCÍCH PCB PO PŘÍMÉ IZOLACI DNA Z KONTAMINOVANÉ PŮDY

KATARINA BERANOVÁ, MARTINA MACKOVÁ a EDITA RYŠLAVÁ

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 3, 166 28 Praha 6

Životní prostředí bylo v minulých letech zatíženo zplodinami intenzivní průmyslové výroby. Do prostředí se tak dostalo mnoho cizorodých, těžko odbouratelných látek, mezi které patří i polychlorované bifenylly (PCB). Pro rekontaminaci ploch se obecně používají především fyzikálně-chemické metody, ale bylo zjištěno, že řada biologických systémů přispívá svému metabolismem novým podmínkám a spolu s detoxifikací dochází k degradaci polutantů. V současné době je pozornost věnována především mikroorganismům a rostlinám. Mohou působit společně, přičemž se využívá jejich vzájemných interakcí a spolupráce. Biologické systémy a jejich konsorcia, vzájemné vztahy a podíl na detoxifikaci prostředí představují možnost využitelnou jako přirozené alternativní způsob dekontaminace prostředí.

Cílem této práce bylo studium vztahů mikroorganismus-rostlina v půdě kontaminované PCB a vliv přítomnosti biologických systémů na degradaci PCB. Byl proveden pokus se třemi rostlinnými druhy (tabák viržinský, lilek černý a vojtěška setá), kterými byla osázena půda kontaminovaná PCB po dobu pěti měsíců. Jednou ze součástí charakterizace systémů je izolace a identifikace přítomných bakterií. V našem případě byl klasický způsob izolace bakterií kultivační metodou doplněn i izolací celkové mikrobiální DNA. Pro její izolaci byly navrženy tři metody, a to izolace DNA pomocí komerční soupravy firmy Mo Bio Laboratories (UltraClean Soil DNA Kit), fenol-chloroformová extrakce DNA z půdy a alternativní metoda, která zahrnuje izolační krok společný s fenol-chloroformovou extrakcí a purifikační krok, který byl prováděn na kolonkách komerční soupravy UltraClean Soil DNA Kit. Alternativní metoda izolace DNA z půdy byla

navržená pro zajištění většího množství vstupní půdy pro izolaci a tím většího výtěžku mikrobiální DNA.

Pro porovnání účinnosti metod byla měřena koncentrace DNA v daných vzorcích a vzhledem k malým výtěžkům DNA z izolačních postupů byl prováděn postup nested PCR, kdy byl amplifikován úsek genu *16S rDNA*, který je obecně sledován jako ukazatel mikrobiální diversity a kóduje malou podjednotku malé ribosomální podjednotky. Pro amplifikaci jeho úseku byly použity dvě sady primerů převzaté z literatury (F27 a R1492, F338GC a R518). Nejlépe se osvědčila metoda alternativní extrakce DNA z půdy, kdy po první amplifikaci nested PCR delšího úseku genu *16S rDNA* a následně elektroforéze byly získány viditelné bandy. Po amplifikaci vnitřního úseku části genu *16S rDNA* byly získány produkty PCR u všech vzorků.

V dalším kroku byla metoda izolace DNA z půdy použita pro identifikaci bakterií schopných degradovat PCB. V laboratorních podmínkách byla navržena metoda detekce přítomnosti genu *bphA1*, jež kóduje podjednotku bifenyloxygenasy, která je zodpovědná za konečné vnesení dvou molekul kyslíku do molekuly PCB při jejich degradaci a vykazuje značnou homologii u bakteriálních kmenů s potvrzenou schopností degradace PCB. Pro jeho amplifikaci (tedy sledování přítomnosti kmenů s možnou degradační schopností) byly navrženy dvě sady primerů (F350 a R1165, F463 a R674) pro postup nested PCR. Tímto postupem se podařilo potvrdit přítomnost bakterií degradujících PCB.

Tato práce byla sponzorována grantem FRVŠ č. 1938/2005/G4.

IDENTIFICATION OF CYTOKININ-RESPONSIVE PROTEINS IN *Arabidopsis thaliana* SEEDLINGS USING A PROTEOMIC APPROACH

GABRIELA BŮHMOVÁ, HANA KONEČNÁ, ZBYNĚK ZDRÁHAL, ŠÁRKA KOUKALOVÁ, and BŘETISLAV BRZOBOHATÝ

Department of Functional Genomics and Proteomics, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Cytokinins are plant hormones that influence a large variety of developmental and physiological processes in plants. Transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing bacterial isopentenyl transferase gene (*ipt*) coupled with a dexamethasone inducible system were used to investigate their function. IPT is a key enzyme in the biosynthetic pathway of cytokinins and its overexpression results in an increase in endogenous cytokinin levels.

Activation with dexamethasone resulted in an increased expression of *ipt* and a subsequent increase in endogenous cytokinin levels. Comparative proteomic analysis between *ipt*-activated and non-activated seedlings to characterize cytokinin-associated proteins was performed. Total protein extracts were separated at high resolution using 2D-PAGE technique on a broad pH gradient 3-10NL. Sensitive SYPRO Ruby fluorescent staining was used for protein visualization. Consequent image analysis could detect approximately 900

spots in each gel. Student T-test was applied on these datasets to select statistically valid spots for quantitative comparison.

Differential expression studies revealed the presence of several proteins showing significant qualitative and quantitative changes. After in-gel trypsin digestion, the proteins of interest were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

Obtained data support the concept that cluster analysis might be used as a valuable descriptive and predictive tool in proteomic research to identify classes of polypeptides potentially implicated in specific cellular functions. The relevance of our protein candidates in cytokinin signalling pathways will be determined in subsequent experiments.

O STABILIZOVANEJ NESTABILITE ANEB *IN VITRO* EVOLÚCIA TELOMERÁZOVO-DEFICIENTNÝCH KULTÚR ARABIDOPSIS

PETRA BULÁNKOVÁ, JIŘÍ ŠIROKÝ a BORIS VYSKOT

*Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav, Akademie věd ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
63868@mail.muni.cz*

Zachovanie integrity a stability genómu má pro všetky organizmy životne dôležitý význam. Teloméry sú fyzické konce eukaryotických chromozómov. Sú to nukleoproteínové komplexy, ktoré odlišujú konce chromozómov od neopravených dvojlákových zlomov a slúžia ako matrica pre ich kompletnú replikáciu. Čím sú tiež jednou z nevyhnutných podmienok stability genómu. U väčšiny druhov predlžuje telomerické sekvencie enzým telomeráza s aktivitou reverznej transkriptázy.

Mutácie telomerázy spôsobujú skracovanie telomér, ktoré napomoh obmedzuje rozmnožovaciu kapacitu bunky. U živočíchov najčastejšie nasleduje zastavenie bunkového cyklu, starnutie a apoptóza buniek. Deficiencia telomerázy u modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana* mala za následok postupnú stratu telomerických sekvencií, rozsiahle genómové prestavby od piatej generácie (G5) a po desiatich generáciach stratu fertility spôsobenú vývojovými defektami¹. Rozsah siestach generácií medzi prvým objavením defektov mitóze v G5 a úplným zastavením vývoja v generácii G10 naznačuje, že rastliny na rozdiel od živočíchov nezastavujú bunkový cyklus napriek značným cytogenetickým aberáciám².

Z ôsmej generácie telomerázovo deficientných rastlín (G8 *tert*-/-) boli postupne odvodené dve línie kalusových kultúr. Obe *in vitro* kultúry sú schopné prežívať a proliferať dlho potom, čo pôvodné rastliny stratili svoju proliferačnú kapacitu. Cytogenetická analýza s využitím merania obsahu DNA na určenie ploidie a viacfarebnej *in situ* hybridizácie s centromerickými, rDNA a telomerickými sondami naznačuje, že každá z kultúr si vytvorila vlastnú stratégiu na prežitie s nechránenými koncami chromozómov. Je možné zhrnúť, že nefunkčnosť telomér vedie k rozsiahlym prestavbám genómu, ktoré sú však u rastlín, na rozdiel od živočíchov, tolerované.

Práce bola podporená grantom: GAČR 522/03/0354.

LITERATURA

1. Říha K., McKnight T.D., Griffing L.R., Shippen D.E.: *Science* 291, 1797 (2001).
2. Široký J., Zluvova J., Říha K., Shippen D.E., Vyskot B.: *Chromosoma* 112, 116 (2003).

DLOUHODOBÝ VÝVOJ KOLONIÍ KVASINKY *Saccharomyces cerevisiae*

MICHAL ČÁP a ZDENA PALKOVÁ

*Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká Fakulta
Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2*

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, které při růstu na pevném médiu tvoří mnohobuněčné útvary – kolonie. Existuje mnoho pozorování, které poukazují na to, že kolonie nejsou pouhým náhodným shlukem buněk, ale že v rámci kolonie dochází k různým regulacím a signalizacím, které mají za následek například rozdílnou expresi některých genů v různých částech kolonie nebo prostorovou strukturovanost kolonií některých kvasinkových kmenů. V kolonii se nachází mnoho mikroprostředí lišících se svými podmínkami a jsou obývány různými subpopulacemi buněk. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je klasickým molekulárně biologickým modelovým organismem, její studium však probíhá převážně v tekutých kulturách v médiích s dostatkem živin. S takovými podmínkami se však kvasinka v přirozeném prostředí setká jen málokdy. Studium dlouhodobého vývoje kvasinkových kolonií je bližší stavu, ve kterém se kvasinky nacházejí v přírodě a pomohou nám pochopit principy strukturalizace kolonií, buněčné diferenciaci, hladovění a dlouhodobého přežívání mikroorganismů v přirozených podmínkách.

V naší laboratoři bylo objeveno, že kvasinkové kolonie mezi sebou dokáží komunikovat na velkou vzdálenost pomocí plynného amoniaku. Amoniak je produkován buňkami kolonie v určité fázi vývoje a okolní kolonie dokáží tento signál detekovat a odpovědět na něj vlastní produkcí amoniaku. Tak je signál amplifikován a předáván dál. Produkce amoniaku probíhá v pulzech a je doprovázena alkalisací média. V důsledku přijetí amoniakového signálu dojde v buňkách kolonie k mnoha změnám. Tyto změny byly studovány sledováním transkriptomových změn metodou DNA čipů. V průběhu vývoje kolonie a amoniakové signalizace dochází ke změně exprese mnoha genů, v důsledku čehož dojde mimo jiné k přeprogramování metabolismu a k snížení exprese genů stresové odpovědi. Proto byla navržena hypotéza, že amoniakový signál je produkován hladovějícími a stresovanými buňkami, pomáhá koloniím adaptovat se na podmínky hladovění, přizpůsobit metabolismus snížit buněčný stres a je důležitý pro synchronizaci těchto procesů mezi celou populací kolonií. Ve své práci jsem se zaměřil na souvislost mezi amoniakovou signalizací a oxidativním stresem a na změny mitochondriální aktivity během vývoje kvasinkové kolonie.

Tato práce je podporována grantem GAČR 525-05-0297 a doktorským projektem GAČR 204/03/H066.

EXPRESSION AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF BCRP (ABCG2) IN HUMAN CHORIOCARCINOMA BeWo CELL LINE

**MARTINA ČEČKOVÁ^a, ANTONÍN LIBRA^a,
KATEŘINA POSPÉCHOVÁ^a, MARIANNE BRABEC^b,
PETR PÁVEK^a, RENATE FUCHS^b,
and FRANTIŠEK ŠTAUD^a**

^a*Charles University Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec
Králové, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové,*

^b*Department of Pathophysiology, Medical University of
Vienna, Währinger Gürtel 18-20, Wien, Austria
ceckova@faf.cuni.cz*

The breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) is the latest member of ABC drug efflux membrane transporters. Similarly to P-glycoprotein (P-gp, MDR1), BCRP is distributed in epithelia involved in drug disposition, especially in the placenta, small intestine and liver. Since the trophoblast layer represents the key structure in transplacental drug transfer, in this study we evaluated BCRP expression and functional activity in human choriocarcinoma trophoblast-like BeWo cell line to assess its possible role in transplacental pharmacokinetics.

To detect BCRP in placenta and in BeWo cells on protein level, we employed Western Blotting using BXP-21 monoclonal antibody. Expression of BCRP on the mRNA level was evaluated and compared to the MDR1 expression by quantitative RT-PCR method using TaqMan Probes. For absolute quantification, cloned BCRP sequence and MDR1 sequence were used as a standard. Functional activity of BCRP in BeWo cells was studied by the uptake assay with 20 μM mitoxantrone as a BCRP and Pgp substrate. For inhibition studies, the following inhibitors were used: 5 μM GF120918, a common inhibitor of BCRP and P-gp, 1 μM Ko143, a specific inhibitor of BCRP and 1 μM PSC833, a specific inhibitor of P-gp. Mitoxantrone uptake by BeWo cells was detected by FACS analysis. The BCRP membrane expression in BeWo cells was further evaluated by immunofluorescence microscopy using BXP-21 antibody and cells cultured on coverslips. To evaluate localization of BCRP in human term placenta immunohistochemical method with BXP-21 antibody was employed.

Immunoblot analysis revealed BCRP as a 70kD protein expressed in BeWo cells as well as in human term placenta. On the level of mRNA, quantitative RT-PCR method revealed expression of 6.3×10^6 transcripts of BCRP per μg RNA in BeWo cells, whereas there was no detectable expression of MDR1. In human term placenta we found $10.4 \pm 1.6 \times 10^5$ transcripts of BCRP per μg RNA and $1.2 \pm 0.4 \times 10^5$ transcripts of MDR per μg RNA. The functional study showed 2.3 fold increase in accumulation of mitoxantrone in the presence of GF120918 and 2.6 fold increase in the presence of Ko143 when compared to the non-inhibited control ($p < 0.01$). These results confirm the role of BCRP in extruding its substrates out of the trophoblast cell line. Furthermore, statistically significant 1.6 higher accumulation of mitoxantrone in the presence of P-gp inhibitor PSC833 ($p < 0.05$), confirms certain

activity of the P-gp transporter in BeWo cells. Employing immunofluorescence microscopy, BCRP transporter was found to be predominantly localized on the microvillous membrane of BeWo cell line. Immunohistochemical localization of BCRP in human term placenta revealed its exclusive expression in trophoblast cells, the layer believed to represent a barrier to transplacental drug transfer.

To conclude, here we present the expression and functional activity of membrane expressed BCRP transporter in BeWo cells was considerably higher than that of MDR1. Furthermore, concerning the expression of BCRP in human term placenta being notably higher compared to MDR1, we suggest that the role of BCRP in transplacental pharmacokinetics could be even more important, than that so far reported for MDR1.

Supported by the Project AKTION 38p17.

INTERAKCE ANTIEPILEPTIK S BCRP TRANSPORTÉREM *IN VITRO*

**LUKÁŠ ČERVENÝ^a, PETR PÁVEK^a,
JANA MALÁKOVÁ^b a FRANTIŠEK ŠTAUD^a**

^aKatedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta UK, ^bÚstav klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice UK, Heyrovského 1203, Hradec Králové 500 05 cerveny@faf.cuni.cz

Farmakorezistentní epilepsie je závažným klinickým problémem, který se vyskytuje u 30 % pacientů postižených epilepsií. Za jednu z příčin jejího vzniku je považována imunohistochemickými a molekulárně-genetickými metodami pozorovaná up-regulace ABC transportérů lokalizovaných v hematoencefalické bariéře (HEB). Up-regulované transportéry snižují účinnou koncentraci antiepileptika v mozku tím, že „pumpují“ své substráty zpět do krevního oběhu ve větší míře, než je tomu u zdravého mozku. Důležitými zástupci této rodiny transportérů v HEB jsou P-gp (P-glycoprotein), MRP2 (Multidrug Resistance-associated Protein 2) a BCRP (Breast Cancer Resistance Protein). Další problematikou řešenou v kontextu s těmito transportéry je modulace jejich transportní aktivity léčiv.

V naší studii jsme se zaměřili na méně známý BCRP, který nebyl ve vztahu k farmakorezistentní epilepsii doposud zkoumán. Dále pak jsem studovali modulaci transportu BCRP antiepileptiky a to konkrétně inhibici. Práce byla rozdělena do dvou částí:

a) Transportní studie *in vitro*. Touto metodou jsme ověřovali, zda-li některé z vybraných antiepileptik (fenobarbital, fenytoin, ethosuximid, primidon, klonazepam, karbamazepin, kyselina valproová, lamotrigin) je substrátem BCRP. Tyto studie byly provedeny na zavedené buněčné linii MDCKII transfekované cDNA humánního BCRP. Pro pozorování transportní aktivity BCRP proteinu jsme využili metodu, která využívá mikroporozní membránové filtry. Koncentrace antiepileptika byla stanovována pomocí HPLC analýzy.

b) Akumulační studie *in vitro*. Tyto studie byly prováděny na buněčné linii MEF3.8 transfekované cDNA humánního BCRP pomocí známého fluorescenčním substrátu BCRP, BODIPY prazosinu FL.

Jak pro transportní tak i pro inhibiční studie byla použita koncentrace antiepileptik 25 μ M. Tato koncentrace je relativně blízká plazmatickým koncentracím antiepileptik. Výsledkem bylo zjištění, že žádné ze zkoumaných antiepileptik není substrátem BCRP a zároveň, že žádné z těchto antiepileptik, kromě klonazepamu, neinhibuje funkci BCRP proteinu. Klonazepam opakovaně mírně zvyšoval akumulaci BODIPY prazosinu FL v buňkách, což nasvědčuje jeho inhibičnímu vlivu na BCRP. Z těchto výsledků získaných *in vitro* metodami usuzujeme, že se BCRP pravděpodobně nepodílí na vzniku rezistence vůči antiepileptikům a také můžeme vyjádřit domněnku, že na úrovni hematoencefalické bariéry zřejmě nedochází k interakci testovaných antiepileptik s BCRP.

IZOLACE A CHARAKTERIZACE LÁTEK S ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITOU Z LAREV MASÁRKY *Neobellieria bullata*

**ALICE CIENCIALOVÁ^{a,b}, JIŘÍ JIRÁČEK^a, MARTINA
MACKOVÁ^c a BOHUMÍR KOUTEK^a**

^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^bKatedra biochemie PŘF UK, Hlavořova 8, 128 40 Praha 2, ^cKatedra biochemie a mikrobiologie, FPBT, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6 ciencial@uochb.cas.cz

Světová zdravotnická organizace uvádí, že rezistence k antimikrobiálním látkám je závažný zdravotní problém¹. Stále dochází k nárůstu rezistence bakterií vůči současným antibiotikům (rezistence *Salmonella typhimurium* k tetracyklínům vzrostla z 0 % v roce 1948 k 98 % v roce 1998 cit.²). Každou hodinu zabijí bakteriální infekce na naší planetě 1500 lidí a z toho polovina jsou děti mladší pěti let. Tato zjištění vedou ke snaze najít nové účinné antimikrobiální látky, které by ničily mikroorganismy a přitom by se vůči nim obtížně vytvářela rezistence³.

Třída hmyzu se zdá být novým, slibným zdrojem přírodních látek s antimikrobiální aktivitou. V posledních letech byly právě z rozličných druhů hmyzu izolovány peptidy, které vykazovaly zajímavou *in vitro* aktivitu proti mikroorganismům rezistentním ke konvenčním antibiotikům. Právě tyto peptidy by se mohly stát vzorem pro tvorbu nových terapeutických zbraní v boji s mikroorganismy⁴.

Jako modelový organismus používáme larvy masařky *Neobellieria bullata*, zástupce řádu diptera s dokonalou proměnou. Výhodou této masařky je možnost jejího kontinuálního chovu v laboratorních standardních podmínkách na rozkládajících se jácích. Larvy a také mouchy jsou vystaveny a odolávají širokému spektru mikroorganismů z prostředí ve kterém žijí a přežívají. Naším cílem je izolace a charakterizace nových antimikrobiálně aktivních látek, např. peptidů nebo proteinů, účastnících se imunitní odpovědi proti bakteriálním infekcím.

Výchozím materiálem pro izolaci je hemolymfa larev *Neobellieria bullata*, které ukončily období žíru a začaly období tzv. toulavého chování. V tomto období je první skupina larev injektována 1 μ l bakteriální suspenze a druhá skupina larev slouží jako negativní kontrola. Za 24 hod je z indukovaných a kontrolních larev izolována hemolymfa.

Z hemolymfy jsou v několika krocích izolovány jednotlivé frakce. Izolované frakce jsou dále podrobeny charakterizaci fyzikálně chemickými metodami: UV-VIS spektroskopii, aminokyselinovou analýzou, hmotnostní spektroskopii (MALDI), SDS elektroforézou, MS analýzou tryptického digestu a sekvenací. U všech izolovaných frakcí jsme testovali a porovnávali antimikrobiální aktivitu proti bakteriím *Escherichia coli* (zástupce G-negativních bakterií) a *Staphylococcus aureus* (zástupce G-pozitivních bakterií). Identifikovali jsme několik látek s významnou antibakteriální aktivitou.

Tato práce je podporována grantem GAČR 203/05/0832 a výzkumným záměrem Z 4055 0506.

LITERATURA

1. Hancock R. E. W.: *Lancet* 349, 418 (1997).
2. Teuber M.: *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 755 (1999).
3. Tan Y. T., Tillett D. J., McKay I. A.: *Mol. Med. Today* 6, 309 (2000).
4. Dimarcq J. L., Hunneyball I.: *Drug Discov. Today* 8, 107 (2003).

POROVNÁNÍ VLIVU POLYMERNÍ PŘÍSADE NA VLASTNOSTI RŮZNÝCH DRUHŮ MALT

KATEŘINA DOUBRAVOVÁ

*Ústav chemické technologie restaurování památek, FCHT, VŠCHT, Technická 5, Praha 6
katerina.doubravova@vscht.cz*

V oblasti památkové péče se v poslední době prosazuje pravidlo, že na rekonstrukce historických památek je nutné používat tzv. původní materiály. Tímto materiálem je ve velké většině malta na bázi vápenného hydrátu, příp. s hydraulickými přísadami. V praxi jsou však k rekonstrukcím často používány směsi připravené přímo na stavbě s přísadkou cementu, případně polymerních disperzí. Směsi takto připravené nemají většinou vyzkoušené a předem známé vlastnosti. Vliv polymerních přísad na malty a betony z cementu je poměrně dobře znám. Vliv na vlastnosti vápenných malt není naopak téměř prostudován. Práce se proto zabývá porovnáním vlivu komerčně vyráběného polymerního redispersovatelného prášku na tři druhy malt (vápenná, vápenná s hydraulickou přísadou a cementová). Sleduje změny fyzikálně-mechanických vlastností zatvrdlé malty (pevnost v tlaku, pevnost v ohybu, nasákavost vodou za různého tlaku, odolnost mrazu a odolnost krystalizaci solí) v závislosti na obsahu polymerního redispersovatelného prášku a na druhu pojiva malty. Z výsledků vyplývá, že vliv polymerní přísady na pevnost v tlaku a pevnost v ohybu je výraznější u malt z vápenného hydrátu – částečně zřejmě

proto, že vápenné malty v tak krátké době (3 měsíce) nedosahují takových pevností jako malta cementová. Z tohoto pohledu je možné tento redispersovatelný prášek doporučit tam, kde je potřeba z technologických důvodů použít čisté vápennou maltu bez hydraulických přísad, ale s vyšší pevností (po krátké době) v porovnání s nemodifikovanou vápennou maltou. Ze stanovení odolnosti krystalizaci solí a mrazovému poškození vyplynulo, že tento druh polymerního redispersovatelného prášku oproti očekávání nezlepšuje odolnost vápenné malty. V takovém případě je pak na místě doporučení, aby se k modifikaci vápenné malty nepoužíval. Z uvedeného je navíc zřejmá důležitost dokonalé znalosti vlivu přísad na vlastnosti zatvrdlé malty ještě před tím, než je projekt realizován.

STUDIUM INTERAKCÍ MEZI DNA A INTERKALÁTORY POMOCÍ NMR TECHNIK

MARTIN DRAČÍNSKÝ a JAN SEJBAL

*Katedra organické chemie PČF UK, Albertov 6, 12843 Praha 2
martindraca@yahoo.com*

Jednou z možností, jak studovat interakce biomakromolekul, například DNA a proteinů, s malými molekulami (ligandy) je NMR spektroskopie¹. Použití technik NOESY umožňuje zjištění třidimenzionální struktury molekuly v roztoku za fyziologických podmínek (pH, iontová síla)^{2,3}.

Většina protinádorových léčiv se vyznačuje vysokou afinitou k DNA, mnohá z nich (například elipticin^{4,5}) se vmezeují mezi páry bazí DNA. Tyto látky se označují jako interkalátory.

V této práci byly studovány interakce derivátů elipticinu s krátkými duplexy oligonukleotidů. Duplexy obsahovaly osm párů deoxyribonukleotidů. Konkrétně byly studovány oligonukleotidy d(CGCTAGCG)₂ a d(ATAGCTAT)₂. Prvním úkolem bylo přiřazení všech ¹H NMR signálů oligonukleotidů. K tomuto účelu byla použita dvoudimenzionální spektra NOESY, TOCSY a DQF COSY. Spektra byla měřena jak v H₂O tak v D₂O. Měření v H₂O umožňuje sledovat i signály vodíků, které se rychle vyměňují s rozpouštědlem (amino a imino vodíky). Poté byly roztoky oligonukleotidů titrovány elipticinem a byly sledovány změny ¹H NMR spekter způsobené přidávkou interkalátoru. Přídavek elipticinu způsobuje změnu chemických posunů oligonukleotidů, změnu tvaru signálů a ve spektrech se objevují nové signály. Interpretací těchto změn bylo zjištěno, že elipticin tvoří s oligonukleotidy komplexy, jejichž střední doba života se pohybuje v řádu milisekund, geometrie komplexů odpovídá interkalaci. Dále byla zjištěna částečná selektivita elipticinu ke GC pářům a pravděpodobná orientace interkalovaného elipticinu.

LITERATURA

1. Feigon J., Denny W. A., Leupin W., Kearns D. R.: *J. Med. Chem.* 27, 450 (1984).
2. Fede A., Labhardt A., Bannwarth W., Leupin W.: *Biochemistry* 30, 11377 (1991).
3. Gao X., Patel D. J.: *Biochemistry* 28, 751 (1989).

4. Fosse P., Rene B., Charra M., Paoletti C., Saucier J.M.: *Mol. Pharm.* 42, 590 (1992).
5. Dračínský M., Castaño O.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 1799 (2004).

INHIBITION OF HER-2/PI3-K/AKT KINASE SIGNALING PROTECTS BREAST CANCER CELLS FROM TRAIL-INDUCED APOPTOSIS

LENKA DUBSKÁ^{a,b}, LADISLAV ANDĚRA^c, and MICHAEL SHEARD^d

^a*Department of Laboratory Medicine, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno*, ^b*Department of Genetics and Molecular Biology, Masaryk University, Brno*, ^c*Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Science, Prague*, ^d*Division of Hematology-Oncology, Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, USA*
dubska@mou.cz

Overexpression of the Her-2/neu receptor correlates with cancer cell proliferation, resistance to apoptosis, and poor survival of breast cancer patients. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in cancer cells and is involved in anti-tumor immune defense.

We investigated whether downregulation of Her-2 by the anti-Her-2 antibody trastuzumab could cooperate with TRAIL effector pathway in breast cancer cells. Her-2-overexpressing cells responded to trastuzumab with modest apoptosis, but unexpectedly, with decreased susceptibility to TRAIL. Moreover we found that main pathways downstream Her-2, MEK/MAPK and PI3-K/Akt kinase signaling, differ in regulation of TRAIL-induced apoptosis; as reported previously, inhibition of MEK/MAPK pathway promoted TRAIL-induced apoptosis.

On the other hand, specific inhibition of the PI3-K/Akt kinase pathway by LY-294002, resulted in a decrease in susceptibility to TRAIL that was associated with a reduction in caspase-8 activation, Bid processing, as well as a reduction in drop of mitochondrial membrane potential and PARP cleavage, analogous to treatment with trastuzumab. Investigating the effect of trastuzumab and PI3-K/Akt kinase inhibition on the expression of apoptosis-related proteins revealed reduced expression of TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5, consistent with reduced susceptibility to TRAIL. Her-2/PI3-K/Akt-suppressed cells also exhibited decreased level of anti-apoptotic protein Bcl-xL expression which likely contributes to the observed increase of mitomycin C-induced apoptosis in cells treated with trastuzumab and LY-294002. These data indicate that oncogene activation, in our case Her-2 overexpression and constitutive PI3-K/Akt kinase activity, might regulate the expression of TRAIL-receptors and consequently responsiveness to TRAIL, thereby playing proapoptotic role in certain cellular context. Likewise, downregulation of oncogenic Her-2/PI3-K/Akt signaling by trastuzumab leads to drop in TRAIL susceptibility.

PŘÍPRAVA TENKÝCH VRSTEV VELKÝCH ORGANICKÝCH MOLEKUL

RUDOLF FRYČEK

Ústav inženýrství pevných látek, VŠCHT v Praze, Technická 6, 166 28 Praha
frycekr@vscht.cz

Nová technologie přípravy tenkých organických vrstev byla vyvinuta z technologie využívající ablace materiálu po interakci s energetickým laserovým pulsem a následně depozici na blízký substrát. Tímto způsobem je možno nanášet mnoho anorganických materiálů, zatím co u organických sloučenin může být použito pouze stabilních výchozích látek.

Problém přípravy tenkých organických vrstev z molekul jako jsou aminokyseliny, proteiny, polysacharidy, enzymy, protilátky je možno vyřešit depozicí z matrice (MAPLE – Matrix Assisted Pulse Laser Deposition). Matrici tvoří rozpouštědlo s velkým absorpčním koeficientem na vlnové délce použitého laseru. Laser excituje přednostně matrici a vibračními přechody dojde k vybuzení přenášené látky a její „měkké“ desorpci a depozici na substrát. Výhoda proti jiným tenkovrstvým technologiím nanášení je snadná možnost regulace tloušťky od nanometrů až po několik mikrometrů a možnost tvorby vícevrstevých struktur bez ohrožení již nanášené vrstvy. Předpokládá se využití při přípravě potahovaných léčiv nebo léčiv s postupným uvolňováním, přípravě tenkých vrstev biologických látek pro usnadnění analýzy, depozici biokompatibilních materiálů nebo příprava aktivních vrstev pro chemické nebo biologické senzory.

První experimenty byly provedeny s komplexními sloučeninami acetylacetonátů, ftalocyaninů a porfyrinů kovů. Byly testovány vlastnosti vybraných matic a vhodnost jejich použití v systému s deponovanou látkou. Jako test úspěšného přenosu původní látky byla použita infračervená a Ramanova spektroskopie. Připravené vrstvy byly použity jako aktivní vrstvy senzorů pro vodivostní a optickou metodu detekce plynných složek atmosféry.

MONOLITICKÉ STACIONÁRNÍ FÁZE NA BÁZI AKRYLAMIDU PRO KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRAPHII OLIGOSACHARIDŮ

VILÉM GURYČA^{a,b,c}, JIŘÍ MICHÁLEK^b, MILOŠ V. NOVOTNÝ^c a VĚRA PACÁKOVÁ^a

^a*Přírodovědecká fakulta UK, 128 40 Praha*, ^b*Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha*, ^c*Indiana University Bloomington, USA*

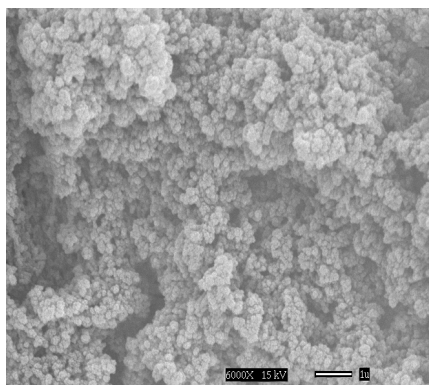
Snahy analytické glykobiologie určit cukerné struktury uvolněné enzymatickým štěpením z buněčných glykoproteinů vyžadují chromatografickou kolonu umožňující separace oligosacharidů z komplexních biologických materiálů s vysokou účinností, selektivitou a reprodukovatelností, zaručující kompatibilitu s MALDI/ESI-MSn detekčním systémem¹.

Pracovní skupina okolo Novotného vyvinula potenciální stacionární fázi pro kapilární elektrochromatografii (CEC),

kteřá dovoluje docílit retence polárních analytů na hydrofilním ligandu ukotveném v polymerní monolitické matici. Analýzy se prováděly v mobilních fázích acetonitril/mravenčan amonný, které jsou vhodné i pro spojení s MS aparaturou a zaručují vysoké účinnosti separací².

Předkládaný příspěvek dokumentuje další zdokonalení polymeračních technik kapilárních kolon, zvyšování reprodukovatelnosti jejich přípravy a definuje retenční mechanismy pro stanovené polární analyty. Jsou presentovány separační charakteristiky kopolymeru pro lineární i větvené oligosacharidy/glykany a posléze srovnávány s předcházejícími procedurami³. Porosita hustě síťovaného polymerního materiálu je velmi závislá na obsahu složek polymerační násady. Proto byla struktura monolitu detailně studována pomocí rtuťové intrusní porosimetrie a rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) – viz obr. 1.

Upravený akrylamidový kopolymer byl po optimalizaci porogenní směsi schopen rutinně separovat derivatizované isoformy *N*-glykanů s účinnostmi nad 100 000 pater.m⁻¹.



Obr 1. SEM snímek monolitické stacionární fáze pro CEC separace isoforem glykanů, Složení: akrylamid/ piperazin-bis-akrylamid/ vinylsulfonová kyselina (13:19:1)

Poděkování patří National Institute of Health - USA; Indiana Genomic Initiative, Indiana University - USA; Nadace Josefa Hlávky ČR.; Fond mobility UK, ČR a Akademie věd ČR, projekt AVOZ 40500505 za finanční pomoc.

LITERATURA

1. Mechref Y., Novotny M.V.: Chem.Rev. 102, 321 (2002).
2. Que A.H., Novotny M.V.: Anal.Bioanal.Chem. 375, 599 (2003).
3. Que A.H., Novotny M.V.: Anal.Chem. 74, 5184 (2002).

APLIKACE TECHNOLOGIE CIPHERGEN V KLINICKÉ ONKOLOGII

ŠÁRKA HELÁNOVÁ, PAVLA ČEŠKOVÁ, ROSTISLAV VYZŮLA a BOŘIVOJ VOJTĚŠEK

Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

Nové a účinné metody z oblasti genomiky a proteomiky směřují aplikovaný výzkum k vývoji personalisované

medicíny, v níž farmakologická léčba bude cílena s ohledem na fyziologické a genetické pozadí u konkrétního pacienta. Technologie analýzy založené na proteinech představují důležitý doplněk DNA mikročipů u mnoha klinických i výzkumných aplikací, neboť hladiny proteinů často jen málo korelují s hladinami mRNA. Přitom hladiny proteinů jasněji vypovídají o jejich skutečné expresi v buňce. Technologie Ciphergen je založená na SELDI TOF-MS a její uspořádání by mělo umožnit rychlou a efektivní analýzu proteinových směsí. Proteiny selektivně interagují se specifickými chromatografickými sorbenty ukotvenými na povrchu čipu a následně jsou detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Selektce je založena na hydrofobní či hydrofilní interakci, iontové interakci (katex, anex) nebo interakci proteinů s ionty kovů imobilizovanými na chelatační sorbent. Dále je možno s využitím pre-aktivovaných povrchů čipů kovalentně navázat různé protilátky, receptory, proteiny, DNA, RNA a další molekuly a vytvořit tak vlastní specifické afinní povrchy.

Důležitým cílem klinické proteomiky je identifikovat proteiny, které by mohly být užitečné jako biomarkery a najít vztah mezi těmito markery a stádiem onemocnění. Diagnostický marker, nebo marker odpovědi na léčbu musí mít velkou prediktivní váhu a přednostně by měl být detekován v materiálu získaném neinvazivně (sérum, moč atd.). Technologie Ciphergen má všechny předpoklady pro účinné vyhledávání nových biomarkerů.

V naší práci využíváme tuto technologii pro hledání nových sérových biomarkerů u definovaných souborů pacientů a ke korelaci klinicky využívaných biomarkerů se stádií nemoci. Daná technologie nám rovněž umožňuje sledování proteinových spekter u nádorových lyzátů, analýzu vazby proteinu na DNA a interakci protilátek s cílovými antigeny.

Tato práce byla podpořena 301/05/0416 GAČR a NR/8338-3 IGA MZ ČR.

MODULÁRNÍ SYNTÉZA STEROIDŮ S AROMATICKÝM A-KRUHEM

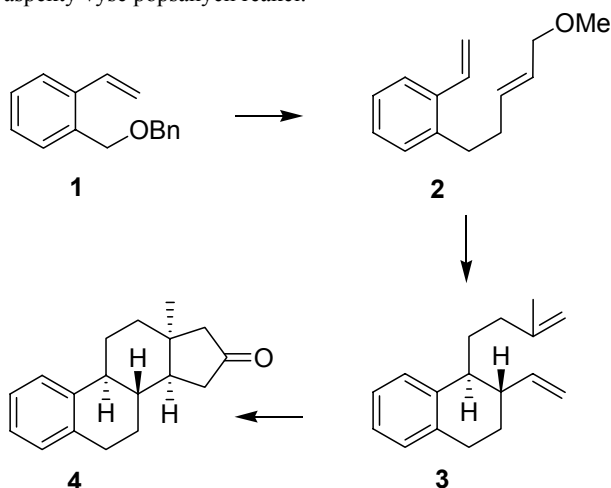
PAVEL HERRMANN^{a,b} a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aÚstav organické chemie a biochemie AVČR, Flemingovo nám. 2, 16610 Praha 6; ^bPřírodovědecká fakulta UK, Albertov 230, 128 43 Praha 2
pherrmann@uochb.cas.cz

Estron a od něj odvozené steroidy s aromatickým A-kruhem patří díky svým biologickým účinkům k častým cílům totální syntézy. Vzhledem ke své složité struktuře jeho syntéza slouží jako prubířský kámen pro testování nových syntetických metod.

Náš přístup je založen na následujících 3 postupných reakcích, které využívají pro tvorbu různých vazeb v každém kroku jedno činidlo - dibutylzirkonocen (Negishiho činidlo)¹. Jednotlivé kroky jsou založené na: *i*) oxidativní adici následované allylací, *ii*) cyklizaci 1-alkoxy-2,8-dienu následované opět allylací, a nakonec *iii*) karbonylativní cyklizací α,ω -dienu. Volba vhodného substrátu pro první reakci a použití různých allylhalogenidů (modulů) pro allylaci umožňuje cílenou funkcionalizaci skeletu.

Jako modelový substrát byl vybrán *o*-alkoxymethylstyren **1**, jež lze snadno připravit ve 2 krocích. Jeho reakcí za výše uvedených podmínek byl získán methoxyderivát **2**. Jeho cyklizace a allylace v přítomnosti CuCl poskytla α,ω -dien **3**, který po karbonylativní cyklizaci³ poskytl estra-1,3,5(10)-trien-16-on **4**. Budou diskutovány syntetické a stereochemické aspekty výše popsaných reakcí.



LITERATURA

1. Ikeuchi Y., Taguchi T., Hanzawa Y.: *Tetrahedron Lett.* 45, 3717 (2004).
2. Kotora M., Umeda C., Ishida T., Takahashi T.: *Tetrahedron Lett.* 38, 8355 (1997).
3. Negishi E., in: *Comprehensive Organic Synthesis* (Trost, B. M.; Paquette L. A. ed.) Pergamon, 1991, Vol. 5, p. 1163.

HIGH EFFECTIVENESS OF PLATINUM(IV) COMPLEX WITH ADAMANTYLAMINE IN OVERCOMING RESISTANCE TO CISPLATIN AND SUPPRESSING PROLIFERATION OF OVARIAN CANCER CELLS *IN VITRO*

VIKTOR HORVÁTH^a, LENKA ŠVIHÁLKOVÁ ŠINDLEROVÁ^a, KAREL SOUČEK^a, OLGA BLANÁŘOVÁ^a, PETR SOVA^b, ALEŠ KROUTIL^b, FRANTIŠEK ŽÁK^b, ADOLF MISTR^b, JAROSLAV TURÁNEK^c, JIŘINA HOFMANOVÁ^a and ALOIS KOZUBÍK^a

^aLaboratory of Cytokinetics, Institute of Biophysics, AS CR, Královopolská 135, 612 65 Brno, ^bPLIVA – Lachema a.s., Karásek 1, 621 33 Brno, ^cDepartment of Immunology, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 32 Brno horvath@ibp.cz

[(OC-6-43)-bis(acetato)(1-adamantylamine)amminedichloroplatinum(IV)], coded as LA-12, is a novel octahedral platinum(IV) complex containing a bulky hydrophobic ligand - adamantylamine. The use of bulky hydrophobic amines as a non-leaving ligands, may increase penetrability of the

compound to the cancer cells. Therefore, the effects of LA-12 on sensitive(A2780), with acquired resistance(A2780cis) and with intrinsic cisplatin resistance(SK-OV-3), ovarian cancer cell lines were investigated and compared to those of cisplatin. IC₅₀ and IC₉₀ concentrations of LA-12 were 6-(A2780) or 18-fold(A2780cis) lower than those for cisplatin(MTT assay). Equitoxic concentrations(IC₅₀ or IC₉₀) of both compounds caused a significant and similar time- and dose-dependent inhibition of cell proliferation and an increase in the number of floating cells which corresponded to the decrease of total cell viability. A different type and dynamics of cell cycle perturbation after cisplatin and LA-12 treatment were detected. Exposure to LA-12 resulted in transient accumulation of A2780 and A2780cis cells in S phase, while cisplatin caused G2/M arrest in sensitive and S phase arrest in resistant cells. A relatively low rate of apoptosis after exposure to IC50 or IC90 of both complexes was observed, markedly higher in resistant A2780cis cells. Western blot analysis indicated a concentration-dependent p53 level increase in both lines (higher after cisplatin treatment). PARP cleavage was observed only in A2780cis cells. In conclusion, LA-12 was found to be significantly more efficient than cisplatin, and it was able to overcome the acquired cisplatin resistance (showing resistance factor 2.84). In spite of the low rate of apoptosis, LA-12 caused increase of p53 level and cell cycle perturbations in the ovarian cancer cell lines studied.

Supported by the Grant Ministry of Education of the Czech Republic (FRVS grant no. 2528/2005) and Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic, Contract No. PZ-Z2/29, "New Medicines for Cancer Therapy".

REFERENCES

1. Kozubík A., Horváth V., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Hofmanová J., Sova P., Kroutil A., Žák F., Mistr A., Turánek J.: *Biochem. Pharmacol.* 69, 373 (2005).

USING THE REAL TIME RT-PCR METHOD FOR THE CHARACTERIZATION OF THE AHP GENE FAMILY EXPRESSION PATTERN

JANA HRADILOVÁ^a a B. BRZOBOHATÝ^b

^aLaboratory of Plant Molecular Physiology, Masaryk University Brno, Faculty of Science, Kotlářská 2, 611 37, Brno, ^bInstitute of Biophysics, AS CR, Královopolská 135, 61265 Brno

In this study we focus on the expression pattern of a family of AHP (*Arabidopsis* Histidine-phosphotransfer factors) genes in *Arabidopsis thaliana*. We also examined the influence of the plant-grow regulators cytokinins on AHP expression. AHPs are phosphotransfer shuttles in the multistep two-component system of signal transduction. AHPs transfer the phosphoryl group between membrane localised receptors (histidine kinases) and response regulators (transcription factors) localized in the nucleus. This system is thought to be involved in stress, cytokinin and ethylene signalling in

Arabidopsis. Cytokinins have been implicated in developmental and growth processes in plants including cell division, shoot meristem initiation, senescence and germination. They also have positive or negative influence on the expression of many groups of genes. Five AHPs have been identified until now in *Arabidopsis*. AHPs are small proteins (14.5–18 kDa), with a predicted acidic isoelectric point (5.5–3.9) and a typical phosphotransfer domain, including the conserved sequence XHQXKGSSXS with the histidine residue binding the phosphoryl group. Using real time RT-PCR we characterized the expression pattern of AHP genes in adult wild type *Arabidopsis thaliana* plants (ecotype Columbia 0). Different plant organs were tested – leaves, stems, roots, flowers and siliques. The influence of cytokinins on the level of AHPs expression was tested on 8 day-old seedlings tested with the cytokinin benzyladenine and also on 8 day-old seedlings overproducing endogenous cytokinins after dexamethasone treatment. We show that the highest mRNA level of AHP1 is in roots and highest level of AHP2 is in flowers, on the other hand there were no significant differences among tissues in expression patterns of AHP3 and AHP5 genes. AHP4 was expressed at very low levels in all tissues tested but the highest level was found in leaves. Also all of tested AHP genes have low expression in seedlings and siliques. A response to cytokinin was detected mainly for the genes AHP1 and AHP4, their steady-state mRNA levels going up. The expression of the genes AHP2 and AHP3 was also induced by cytokinins. Expression level of AHP5 remained unaffected by cytokinins. So, the AHP gene family can be divided into 3 subclasses. Subclass A - AHP1 and AHP4 (the gene expression is highly organ specific and highly induced by cytokinins), subclass B - AHP2 and AHP3 (no significant differences in gene expression among organs and moderately induced by cytokinins), subclass C - AHP5 (no significant differences in the gene expression among organs and no influence of cytokinins, alternative splicing was noted). Sequence homology also predicts similar pattern of subclasses.

Supported by grants LN00A081 and MSM143100008 (Ministry of Education of the Czech Republic).

PŘÍPRAVA CHIRÁLNÍCH SLOUČENIN ARYL-TETRAHYDROISOCHINOLINOVÉHO TYPU

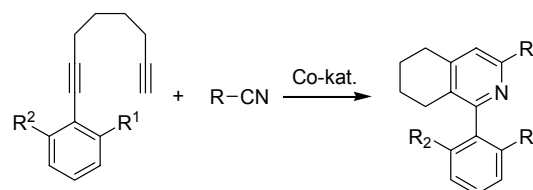
RADIM HRDINA a MARTIN KOTORA^{a,b}

^aKatedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 6, 128 43 Praha 2, ^bÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
katora@natur.cuni.cz, radimhrdina@email.cz

Chirální biarylové sloučeniny hrají klíčovou roli v enantioselektivní syntéze, především jako ligandy u reakcí katalyzovaných přechodnými kovy. V poslední době jsme svědky rozvoje tzv. „organické“ katalýzy, tj. katalýzy bez účasti kovu. Atropoizomerní biarylové sloučeniny s pyridinovým kruhem se zdají být vhodnými kandidáty pro

enantioselektivní syntézu¹. Jejich příprava je založena převážně na kaplinkových reakcích.

Naším cílem bylo vypracovat alternativní metodu vedoucí k různě substituovaným chirálním sloučeninám aryl-tetrahydroisochinolinového typu. Syntetická strategie byla založena na [2+2+2] cyklotrimerizaci 1-aryl-1,7-oktadiynů s nitrily. Reakce byly katalyzovány cyklopentadienovými komplexy kobaltu (CpCo(CO)₂, CpCo(cod), CpCo(=)₂) za standardních podmínek². Byla provedena celá řada cyklotrimerizačních reakcí diynů s různými substituenty R¹ a R² vedoucí k příslušně substituovaným tetrahydroisochinolinům v obstojných výtěžcích (schema 1). Ukázalo se, že průběh reakce závisí jak na sterických, tak na elektronických vlastnostech funkčních skupin R¹ a R².



R¹ = Me, OMe, COOMe, NHCOCH₃, atd.; R² = H, Me, aryl; R = Ph

Schéma 1

Práce byla podpořena grantem GA ČR 203/05/0102.

LITERATURA

- Malkov A.V., Dufková L., Farrugia L., Kočovský P.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3674 (2003).
- Bönnemann H., Brijoux W.: *Adv. Het. Chem.* 48, 177 (1990).

VYUŽITÍ CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU KE STUDIU SEKUNDÁRNÍ STRUKTURY A KONFORMAČNÍHO CHOVÁNÍ PROTEINŮ

RADKA CHALOUPKOVÁ, ZBYNĚK PROKOP a JIŘÍ DAMBORSKÝ

Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
jiri@chemi.muni.cz

Jedním z fyzikálních projevů chiralidy je optická aktivita, tj. schopnost chirálního objektu interagovat rozdílně s vlevo a vpravo kruhově polarizovaným elektromagnetickým zářením. Rozdílnost této interakce se projevuje v řadě chiroptických jevů, mezi které patří i cirkulární dichroismus. Cirkulární dichroismus je speciálním typem elektronové absorpční spektroskopie, která kvantifikuje schopnost opticky aktivního chromoforu rozdílně absorbovat vlevo a vpravo kruhově polarizované záření v závislosti na vlnové délce a v dnešní době se stále častěji využívá ke strukturálnímu studiu chirálních biomolekul.

Tato práce se zaměřuje na využití cirkulárního dichroismu (CD) ke studiu konformačního chování proteinů. Významnou aplikací této optické metody bylo stanovení sekundární struktury

enzymů, konkrétně halogenalkandehalogenas¹. Na základě naměřených CD spekter těchto enzymů bylo určeno procentuální zastoupení jednotlivých sekundárních elementů v jejich struktuře. Získané výsledky CD analýzy ukázaly velmi dobrou shodu ve srovnání s rentgenovou strukturální analýzou krystalů hodnocených proteinů.

CD spektroskopie byla dále využita pro porovnání struktury mutantních enzymů s původním divokým typem. Studovány byly sady mutantních enzymů halogenalkandehalogenasy LinB ze *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (cit.²), elicitinu β -kryptogeinu z *Phytophthora cryptogea*³ a β -glukosidasy Zm-P60.1 ze *Zea mays*. Ověřením správného foldingu připravených mutantních enzymů bylo prokázáno, že případné změny v kinetickém chování enzymů nebyly způsobeny změnou jejich sekundární struktury. Podobným způsobem byla CD spektroskopie využita k strukturálnímu srovnání enzymu LinB produkovaného ve dvou různých expresních systémech (prokaryotický systém *E. coli* a eukaryotický systém *P. pastoris*)⁴. Z naměřených CD spekter bylo zjištěno, že sekundární struktura LinB je po získání z obou expresních systémů totožná.

Pro svou vysokou citlivost ke konformačním změnám byla CD spektroskopie dále využita ke studiu teplotní stability enzymů a jejich konformačního chování při různém pH. Vzájemně byla porovnávána teplotní stabilita enzymu LinB se dvěma nově izolovanými mykobakteriálními dehalogenasami DmbA a DmbB5. Teplotní stabilita těchto tří příbuzných enzymů je rozdílná, přičemž nejvyšší T_m teplota byla zjištěna pro enzym DmbB. Vliv pH na konformaci halogenalkandehalogenas byl studován pro tři enzymy: LinB, DhaA z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 a Dh1A z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. Při relativně velmi kyselých podmínkách (pH < 4) se všechny studované enzymy nacházely v konformaci odlišné od jejich nativní struktury, při pH blízkému pI těchto enzymů (pH ~ 5) byly nejméně rozpustné a při neutrálních a alkalických podmínkách (pH > 6,5) zaujímaly tyto enzymy konformaci, která odpovídá jejich nativní struktuře.

CD spektroskopie se ukázala být velmi vhodnou a užitečnou technikou ke studiu sekundární struktury a konformačních vlastností enzymů. V porovnání s NMR a RTG spektroskopii má výhodu rychlého získání dat s nízkými nároky na přípravu vzorků.

LITERATURA

1. Sato Y., Monincová M., Chaloupková R., Prokop Z., Ohtsubo Y., Minamisawa K., Tsuda M., Damborský J., Nagata Y.: Appl. Environ. Microbiol., přijato.
2. Chaloupková R., Sýkorová J., Prokop Z., Jesenská A., Monincová M., Pavlová M., Nagata Y., Damborský J.: J. Biol. Chem. 278, 52622 (2003).
3. Lochman J., Kasparovský T., Damborský J., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J.-P., Mikeš V.: Biochemistry, odesláno.
4. Nakamura T., Zámocký M., Zdráhal Z., Chaloupková R., Monincová M., Nagata Y., Damborský J.: Prot. Expr. Purif., odesláno.
5. Jesenská A., Pavlová M., Strouhal M., Chaloupková R., Těšínská I., Monincová M., Prokop Z., Bartoš M., Pavlík I., Rychlík I., Möbius P., Nagata Y., Damborský J.: Appl. Environ. Microbiol., odesláno.

COMPARISON OF TWO KINETIC METHODS OF DETERMINATION OF THE ANTIRADICAL ACTIVITY USING 2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL

KATEŘINA CHVÁTALOVÁ and JIŘÍ SLANINA

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Komenského nám. 2, 662 43 Brno
kchvatal@med.muni.cz

Considerable work has been directed towards developing relevant assay method for the evaluation of activity of free radical scavengers. A large number of methods using different approaches has been reported in the literature, but the simple spectrophotometric test based on scavenging of a stable coloured 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical belongs to the most commonly used. In the DPPH test, the scavenging ability of antioxidants is usually expressed as EC₅₀, the antioxidant concentration at which half of DPPH radicals is quenched in a predetermined time. This parameter (EC₅₀) does not reflect the reaction rate of antioxidants with DPPH.

The aim of this work was developing a kinetic method for the assessment of antiradical activity by virtue of determination of rate constants of DPPH scavenging. The rate constants and the order of reaction between DPPH and the antioxidant in methanol were estimated by the order degeneration method. If the concentrations of antioxidants were much higher than the concentration of DPPH, the rate constant of the reaction could not be determined due to nonlinear relationship between the rate constant of pseudo-first order and the concentration of antioxidants. However, the measurement at the excess of DPPH enables the assessment of the rate constants. Surprisingly, the decay of DPPH corresponds always to first-order reaction. For the majority of antioxidants, the rate of the decrease of DPPH depends only on the antioxidant concentration. However, for a small number of antioxidants, the rate of the reaction depends only on the DPPH concentration. We determined the rate constants of 25 antioxidants. Ascorbic acid was the most efficient scavenger of DPPH, which reacts with DPPH approximately million times faster than *para*-hydroxybenzoic acid, the weakest antioxidant. The relationship between the structure and the antiradical activity is reported. The antiradical activity of antioxidants depends not so much on the number of phenolic hydroxyl, as is reported in literature¹, as on the reactivity of the most activated hydroxyl. The first order rate constants can be used for the simple and correct statement of the antiradical activity.

REFERENCES

1. Bors W., Michel C., Stettmaier K.: Meth. Enzymol. 335, 166 (2001).

NEW MODIFICATION OF CURRENT TB DRUGS

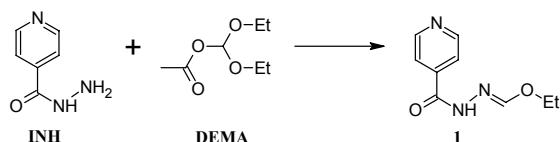
ALEŠ IMRAMOVSKÝ^a and SLOVENKO POLANČ^b

^aFaculty of Pharmacy Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, ^bFaculty of

*Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Aškerčeva 5, SI 1000 Ljubljana, Slovenia
imramovsky@faf.cuni.cz*

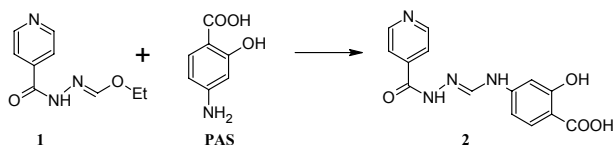
Isonicotinic acid hydrazide (Isoniazid, INH) is widely applied as a first-line drug for the treatment of tuberculosis (TB) and is usually employed in combination with other drugs (Rifampicine, Pyrazinamide, Ethambutol) for the treatment of an active disease. Isoniazid is also used for prevention of TB in people who have been exposed to the active disease but have no symptoms¹. In a simple molecule, such is isoniazid, it is difficult to efficiently modify the molecule in order to increase its biological activity. The same is true for most of other TB drugs. Herein, we propose a new approach to overcome this problem.

A simple method to modify various TB drugs was designed starting from the hydrazone **1** that is easily available from INH and diethoxymethyl acetate (DEMA)².



The ethoxy group of the compound **1** can be substituted with a number of nitrogen nucleophiles. If one of the TB drugs serves as a nucleophile, the product can be considered as a prodrug that contains two conventional drugs, connected by a CH fragment. Such products are expected to be stable in the solid state but they probably hydrolyze in aqueous solutions, in the presence of an acid or enzymatically, leading to both TB drugs or to one drug and the formylamino derivative of the other one.

To test the idea mentioned above, we performed the reaction of **1** and *p*-aminosalicylic acid (PAS). It is our pleasure to report that the reaction took place under mild reaction conditions to give the product **2** in 53% yield.



Two TB drugs can also be connected by a CH fragment if one of them is activated as the corresponding dimethylamino-methylene derivative. Several transformations to reach this goal are currently under active investigation.

Biological activity and hydrolytic stability of such modified drugs will also be discussed.

This work was supported by grant IGA MZ 1A/8238-3 and FRVŠ 297/2005/G6.

REFERENCES

1. <http://www.aegis.com/factshts/network/access/drugs/ison.html> - downloaded Jan 2005.
2. Košmrlj B., Koklič B., Polanc S.: *Acta Chim. Slov.* 43, 153 (1996).

MOLEKULÁRNÍ INTERAKCE KOLICINU U SE SVÝM IMUNITNÍM PROTEINEM

MAGDA JANALÍKOVÁ a DAVID ŠMAJS

*Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Tomešova 12, 602 00 Brno
dsmajs@med.muni.cz*

Koliciny jsou antibakteriální exoproteiny, jejichž geny jsou obvykle lokalizovány na plazmidech a které jsou produkovány bakteriálními kmeny z čeledi *Enterobacteriaceae* (zejména druhem *Escherichia coli*). Toxický účinek, zajišťovaný C-koncovou doménou, je omezen na citlivé kmeny této čeledi a nejčastěji je nasměrován proti druhům příbuzným druhu produkčnímu. Proti letálnímu efektu syntetizovaného kolicinu se produkční kmen brání tvorbou tzv. imunitního proteinu, jehož gen je součástí kolicinogenního plazmidu. Interakce mezi volně rozpustným kolicinem a membránově vázaným imunitním proteinem je vhodným modelem pro studium protein-proteinových interakcí. Vybrali jsme si dvojici kolicinů U a Y, mezi nimiž je 87 % totožnost na úrovni aminokyselinové sekvence a přesto jejich producenti nejsou navzájem zkříženě imunní. Podstatou této studie bylo mutovat aminokyseliny kolicinu U (Y) ve smyslu sekvence kolicinu Y (U), sledovat změny v interakci mutovaných kolicinů s imunitním proteinem a určit interakční aminokyseliny kolicinu U a Y. V letální doméně je mezi kolicinem U a Y rozdílných 34 aminokyselinových zbytků, z nichž 21 leží v hydrofobní oblasti, která je nejpravděpodobnějším místem interakce s imunitním proteinem. Cílenou mutagenézou jsme mutovali všechny rozdílné aminokyseliny v hydrofobní a přilehlé oblasti a připravili tak více než 30 mutantních kolicinů. Zkoumali jsme jejich letální účinek na buňky transformované plazmidem nesoucí gen pro imunitní protein kolicinu U a kolicinu Y. Koliciny s většinou bodových mutací byly rozpoznávány imunitními proteiny stejně jako původní koliciny. Koliciny s bodovými mutacemi G580V a F576Y byly významně méně rozpoznávány a prokázaly jednoznačný význam aminokyselinových zbytků G580 a F576 pro interakci kolicinu U s imunitním proteinem kolicinu U. Slabé interakční místo, aminokyselinový zbytek N605, leží mimo hydrofobní oblast. Podobně je tomu i u kolicinu Y, kde všechny interakční aminokyseliny leží v hydrofobní oblasti a jejich poloha se částečně překrývá s polohou významných aminokyselin kolicinu U. Na základě porovnání identifikovaných aminokyselinových zbytků v polohách odpovídajících interakčním místům u kolicinu U a Y se sekvencemi dalších blízkých příbuzných kolicinů A, S4, L, N a B bylo zjištěno, že k efektivní interakci mezi kolicinem a imunitním proteinem dochází pouze pokud jsou přítomny více než dvě interakční aminokyseliny. Výsledky ukazují, že interakční místa příbuzných kolicinů s jejich imunitními proteiny nejsou totožná, ale navzájem se překrývají. Překryv interakčních míst pomáhá vysvětlit postupnou evoluci nových typů kolicinů depolarizujících plazmatickou membránu.

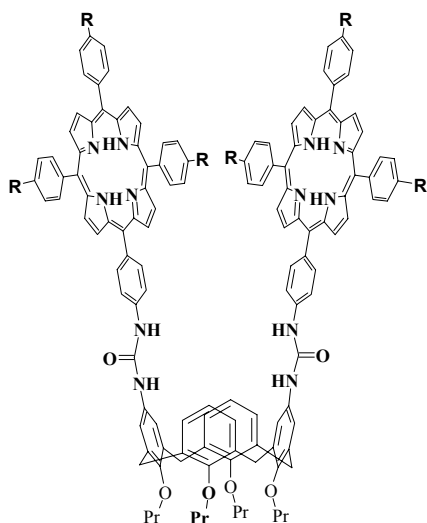
Tato práce byla sponzorována grantem: GAČR 310/03/1091.

Vliv substituce calixarenoporfyrintů na komplexaci fullerenu

MARTIN KÁŠ, PAVEL LHOTÁK a IVAN STIBOR

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

Vzhledem k předpokládané průmyslové výrobě fullerenu a narůstajícímu množství jejich možných aplikací v různých oblastech – biofarmaceutika, kosmetika, speciální polymery, elektronika – je věnován značný zájem studiu jejich interakcí, důležitých například pro dělení jejich směsí. Poměrně dlouhou dobu je známa schopnost fullerenu interagovat s různými π -systémy, mezi které patří i porfyryny. V minulosti proto byly navrženy a syntetizovány receptory využívající porfyrintové jednotky k vázání fullerenu. Již dříve byl zkoumán vliv kovu komplexovaného porfyrintem a prostorového uspořádání receptoru na komplexaci fullerenu, proto jsme se rozhodli sledovat vliv substituce *meso*-arylporfyrintů v calixarenoporfyrintovém receptoru (Pr = propyl, R je buď vodík, propyl-, nebo trifluormethylová skupina). Vliv substituce na interakci byl sledován pomocí ^1H NMR.



GENETICKÁ DETERMINACE DEGRADACE FENOLU V *Rhodococcus erythropolis*

MARTIN VESELÝ, MONIKA KNOPPOVÁ,
JAN NEŠVERA a MIROSLAV PÁTEK

Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky,
Videňská 1083, 142 20 Praha 4
knoppova@biomed.cas.cz

Bakterie rodu *Rhodococcus* degradují řadu látek znečišťujících životní prostředí jako jsou fenoly a jejich deriváty, chlorované alifatické i cyklické uhlovodíky, nitrily a různé pesticidy. Hlavním faktorem omezujícím praktické

využití těchto degradačních schopností je dosud nedostatek vhodných genetických nástrojů pro jejich modifikaci. K vývoji základních nástrojů a metod genových manipulací jsme zvolili kmen *Rhodococcus erythropolis* CCM2595, který se vyznačuje schopností degradovat fenol a některé jeho deriváty (resorcinol, hydrochinon, chlorofenol). Tento kmen jsme zároveň zvolili pro izolaci genů degradace fenolu.

Pro studovaný kmen jsme vyvinuli základní metody umožňující transformaci kmene plasmidovou DNA, izolaci plasmidové a genomové DNA a integraci fragmentů do chromosomu. Na základě přirozeného plasmidu pSR1 z *Corynebacterium glutamicum* jsme zkonstruovali klonovací vektor pSRK21 replikující se v *E. coli*, *C. glutamicum* a *R. erythropolis*. Pro konstrukci promoter-probe vektoru jsme testovali potenciální reportérové geny: cat (chloramfenikol-acetyltransferasa), gfpuv (GFP, green fluorescent protein s emisí posunutou do UV oblasti) a rsgfp (red-shifted GFP). Na základě plasmidu pSRK21 byly zkonstruovány promoter-probe vektory pPRE11 (rsgfp) a pEPR (gfpuv) pro analýzu promotorů z *R. erythropolis*. Funkce vektoru pPRE11 byla ověřena klonováním několika promotorů z *C. glutamicum* u nichž byla změněna jejich aktivita v buňkách *R. erythropolis* a *C. glutamicum*.

Klíčovými geny pro degradaci fenolu jsou geny kódující fenolhydroxylasu a katecholdioxygenasu. Vyhledání těchto genů a ovlivnění jejich exprese, umožní konstrukci kmenů rozkládajících intenzivněji sledované polutanty. Všechny geny dráhy degradující fenol až na intermediáty centrálního metabolismu se nám podařilo izolovat: catA, catB, catC kódující katecholdioxygenasu, mukonatcykloisomerasu a mukonolaktonisomerasu, pheA1 a pheA2 kódující velkou a malou podjednotku fenolhydroxylasy a regulační geny catR a pheR.

Mezigenovou oblast catA-catR obsahující promotory těchto divergentně orientovaných genů jsme klonovali v obou orientacích do promoter-probe vektoru. Oba promotory (P-catR a P-catA) byly v *E. coli* aktivní. Na základě sekvence DNA jsme našli předpokládané transkripční počátky genů catR a catA. Palindromická sekvence přítomná v oblasti obou počátků transkripce může sloužit jako cílové místo pro vazbu regulačního proteinu. Transkripční počátek genu catR zjištěný experimentálně metodou primer extension v *E. coli* byl identický s předpokládaným transkripčním počátkem.

Delecí genu catR v chromosomu jsme získali kmen, který nebyl schopen růstu na fenolu. Tento výsledek naznačuje, že gen catR je nezbytný pro expresi některého genu nebo genů determinujících degradaci fenolu. Předpokládáme, že catR kóduje transkripční aktivátor operonu pro degradaci katecholu.

NEZNAMÝ PŮVOD ISOFLAVONOIDŮ V *Arabidopsis thaliana*

RADKA KOBLOVSKÁ^a, ZUZANA MACKOVÁ^a,
BOŘIVOJ KLEJDUS^b, DAVID HONYS^{c,d} a
OLDŘICH LAPČÍK^a

^aÚstav chemie přírodních látek, FPBT, VŠCHT v Praze,
Technická 5, 166 28 Praha, ^bÚstav chemie a biochemie,
MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^cÚstav rostlinné

fyzologie, PřF UK, Viničná 5, 128 44 Praha 2, ^dInstitut experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha Radka.Koblovska@vscht.cz

Isoflavonoidy (3-fenylchromony) dlouhodobě přitahují pozornost humánní i veterinární medicíny díky svým četným biologickým aktivitám. Narozdíl od flavonoidů (2-fenylchromonů), rozšířených ve všech cévnatých rostlinách, isoflavonoidy byly dosud zaznamenány v omezeném počtu čeledí. To se obvykle vysvětluje omezeným výskytem isoflavonové synthasy (IFS). Tento enzym byl nedávno v několika zástupcích čeledí *Fabaceae* a *Chenopodiaceae* sekvenován a zařazen do podrodiny cytochromů P450 CYP93B2.

Naše pracovní skupina se zabývá screeningem čeledí, v nichž isoflavonoidy dosud nebyly popsány; využíváme přitom kombinace HPLC-MS a imunochemických metod. Celé spektrum metabolitů jsme jako první prokázali v ekonomicky významných čeledích *Rutaceae* a *Myrtaceae*. Z diskuse kolem těchto nálezů vyplynul zájem o zasazení výskytu isoflavonoidů mimo čeleď *Fabaceae* do genetického kontextu. Obrátili jsme proto pozornost na modelové organismy *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae* – brukvovitě) a *Nicotiana tabacum* (*Solanaceae* – lilkovitě). Tyto rostliny byly dosud považovány za neprodukcující isoflavonoidy – v případě *A. thaliana* byl tento předpoklad podpořen znalostí kompletního genomu, v němž chybí jakýkoli homolog známých isoflavonových synthas.

V *A. thaliana* jsme oběma metodickými postupy prokázali řadu 5-hydroxyisoflavonů i řadu 5-deoxyisoflavonů, ovšem v koncentracích řádu desetin až jednotek mg kg⁻¹ sušiny, které při použití běžných analytických postupů mohou být přehlédnuty. Ve veřejně přístupné genové databázi se nám podařilo identifikovat homology známých enzymů z rostlin čeledi *Fabaceae*, jež by mohly zodpovídat za metylace a glykosylace isoflavonů v *A. thaliana*, gen zodpovědný za syntézu isoflavonového jádra (v souladu s předchozími publikacemi) však nikoli. Vzhledem k tomu, že genom *A. thaliana* postrádá celou podrodinu P450 CYP93B2, jsme dospěli k názoru, že musí existovat jiný gen zodpovědný za biosyntézu isoflavonů.

Poděkování: Studie vznikla s podporou grantu GAČR 525/03/0352.

APOPTOSIS INDUCED BY IRON DEPRIVATION IN TUMOR CELLS

MICHAL KOC, JAROSLAV TRUKSA, ZUZANA NAĐOVÁ, and JAN KOVÁŘ

Cell Growth Control Laboratory, Institute of Molecular Genetics, AS CR, Videňská 1083, 1420 20 Prague 4 xkocm@seznam.cz

Iron deprivation specifically induces apoptosis in some cultured tumor cells while other cells are resistant. In order to elucidate the mechanisms involved in apoptosis induction by iron deprivation, we studied the cellular events specifically coupled with the apoptosis induction. To discriminate between changes coupled only with iron deprivation and changes

involved in the induction of apoptosis by iron deprivation, we compared sensitive 38C13 cells and resistant EL4 cells. Iron deprivation was achieved by incubation in a defined iron-free medium. We detected caspase-3 activation as well as caspase-9 activation in sensitive cells under iron deprivation. Iron deprivation led to the release of cytochrome c from mitochondria in sensitive cells but it did not affect the cytosolic localization of Apaf-1. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was dissipated in sensitive cells due to iron deprivation, however, reactive oxygen species (ROS) production was not significantly affected. The antiapoptotic Bcl-2 protein was associated with mitochondria and the association did not change under iron deprivation. On the other hand, under iron deprivation we detected translocation of the proapoptotic Bax protein from the cytosol to mitochondria in sensitive cells. Taken together, we suggest that iron deprivation induces apoptosis in tested cells via mitochondrial changes concerning proapoptotic Bax translocation to mitochondria, collapse of the mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c from mitochondria, and activation of caspase-9 and caspase-3. Events upstream of Bax translocation during apoptosis induction by iron deprivation remain to be elucidated. However, the p53 pathway is not involved here as we demonstrated previously.

This study was supported by grants 301/01/0041 from the Grant Agency of the Czech Republic and B5052401 from the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

SYNTÉZA A VLASTNOSTI INHIBITORŮ THYMINDFOSFORYLASY

PETR KOČÁLKA, RADEK POHL, DOMINIK REJMAN, a IVAN ROSENBERG

ÚOCHB AV ČR, Flemingovo nám. 2, Praha 6; ivan@uochb.cas.cz

Angiogeneze je termín používaný k popisu tvorby nového cévního systému. Jde o důležitý proces během vývoje, při zánětu, ale i při růstu nádoru. Mezi důležité angiogenní faktory patří i thymidinofosforylasy (TP), která je právě ve vysokých hladinách exprimována v mnoha lidských solidních nádorech a míra její exprese je dávana do souvislosti s neovaskularizací, invazivností a metastází nádoru. TP podporuje migraci a angiogenezi endoteliálních buněk reverzibilním štěpením thymidinu na thymin (Schéma 1).

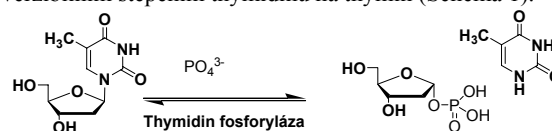
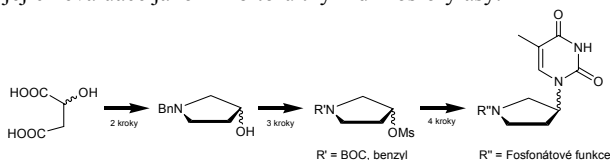


Schéma 1

Lze předpokládat, že by účinné inhibitory TP měly velký terapeutický význam. Předložená práce se zabývá syntézou, vlastnostmi a testováním nových typů thymidinových analog nesoucích pyrrolidinový kruh místo furanosového. S racemic-kou kyselinou jablečnou (Schéma 2) jako výchozí látkou byla

vypracována syntéza racemického *N*-chráněného 3-pyrrolidinolu, jenž slouží jako výchozí látka pro přípravu pyrrolidinových nukleosidů. Thymin byl alkylován *N*-chráněným 3-mesyloxy-pyrrolidinem za běžně používaných podmínek (DMF/Cs₂CO₃) v nízkém výtěžku na směs *N*- a *O*-derivátu, přičemž *O*-derivát převažoval. Změnou typu rozpouštědla a báze byly nalezeny podmínky poskytující přijatelný poměr *N*- a *O*-regioizomerů v uspokojivém výtěžku. Výsledkem práce je příprava analogů 2',3'-dideoxythymidin 5'-fosfátu s pyrrolidinovým kruhem a různými fosfonátovými funkcemi a jejich evaluace jako inhibitorů thymidinofosforylasy.



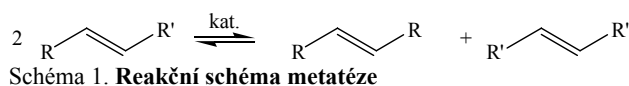
Práce je podporována granty GA ČR 203/02/D150 a GA ČR A4055101 v rámci výzkumného záměru Z40550506.

CHARAKTERIZACE A AKTIVITA KATALYZÁTORU Re₂O₇/γ-Al₂O₃ PRO METATÉZI

JIRÍ KOPEČNÝ

Ústav organické technologie, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6
kopecnyj@vscht.cz

V moderní organické syntéze jsou široce užívány katalytické reakce, které umožňují a zjednodušují přípravu organických látek. Jednou z nich je metatéze, reakce nenasycených organických molekul, nazývaná dříve disproportionace olefinů. Při reakci dochází k rozpadu a opětovnému vzniku dvojné vazby, schéma 1.



Při metatézi dochází k výměně atomů nebo skupin atomů mezi dvěma molekulami, bez změny charakteru vazeb. Pro urychlování metatéze jsou užívány jak homogenní, tak heterogenní katalyzátory. Z technologického hlediska je používání heterogenních katalyzátorů upřednostňováno. Studovaný katalyzátor Re₂O₇/γ-Al₂O₃ se vyznačuje vysokou aktivitou a selektivitou.

Katalytický systém Re₂O₇/γ-Al₂O₃ byl studován metodami NH₃-TPD a TPR. Jako katalyzátor byl připraven metodou nerovnovážné impregnace boehmitu roztokem NH₄ReO₄. Výsledky aktivitních testů metatéz lineárních olefinů a olefinů s funkčními skupinami byly konfrontovány s acido-bázickými vlastnostmi a s redukovatelností aktivní složky. Taktéž byl zkoumán vliv typu reaktantu na rychlost deaktivace katalyzátoru. Z výsledků vyplývá, že Lewisova kyselost katalyzátoru má významný vliv na jeho aktivitu.

Práce je finančně podporována grantem č. 203/03/H140.

STRUKTURNĚ-FUNKČNÍ ANALÝZA LEKTINŮ PATOGENNÍ BAKTERIE *Ralstonia solanacearum*

NIKOLA KOSTLÁNOVÁ^a, EDWARD MITCHELL^b,
JEAN GAGNON^c, NECHAMA GILBOA-GARBER^d,
ANNE IMBERTY^e a MICHAELA WIMMEROVÁ^{a,f}

^aNárodní centrum pro výzkum biomolekul & ^fKatedra biochemie PřF, MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^bE.S.R.F Experiment Division, BP220, F-38043 Grenoble cedex, France, ^cCNRS FRE 2685-Université J. Fourier, Faculté de Médecine & Pharmacie, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, France ^dCERMAV-CNRS, BP 53, F-38041 Grenoble cedex 09, France, ^eBar-Ilan University, Faculty of Life Science, Ramat Gan 52900, Israel

Lektiny jsou proteiny neimunitní a neenzymatické povahy, které specificky a reverzibilně váží cukry a jiné glykokonjugáty, přičemž tato interakce je základem mnoha fyziologických i patologických procesů včetně fertilizace, imunitních odpovědí, buněčné adheze, rakovinného množení buněk a jiných. Lektinový systém rozpoznávání cukerných složek je také často využíván patogenními mikroorganismy k identifikaci a napadení hostitelského organismu. Detailní popis a pochopení molekulárních mechanismů využívaných patogenními bakteriemi k prvotnímu rozpoznání a napadení hostitele přináší nové, a často jediné, strategie boje proti těmto patogenním agens.

Mezi problematické mikroorganismy, proti nimž nebyla doposud objevena účinná terapie stejně jako se ještě nepodařilo vyšlechtit proti nim odolné odrůdy, patří i fytopatogenní bakterie *Ralstonia solanacearum*, která způsobuje uvadání mnoha ekonomicky významných plodin jakými jsou rajčata, brambory, banány a dalších přibližně 200 rostlin z 50 různých botanických rodin. *R. solanacearum*, která je schopna přežít dlouhodobě v půdě, začíná napadat hostitelský organismus přes jeho kořenový systém a poté s využitím systému rozvodu vody v rostlině ji celou systematicky infikuje¹. *R. solanacearum* je fylogeneticky příbuzná s bakterií *Pseudomonas aeruginosa* – podmíněným humánním patogenem, který je silně agresivní k pacientům s cystickou fibrosou – u níž byla potvrzena souvislost mezi bakterií produkovanými lektiny a její patogenitou.

Tento příspěvek se zabývá souvislostmi mezi strukturou a funkcí tří doposud objevených lektinů z *R. solanacearum* (RSL, RS-IIL and RS20L), zjištěných na základě kombinace širokého spektra moderních metod, zahrnujících např. rentgenovou strukturní analýzu, mikrokolorimetrii či metodu surface plasmon resonance. RSL (9,9 kDa) lektin vykazuje vysokou substrátovou specifitu k L-fukose a D-manose a je částečně sekvenčně homologní k lektinu AAL z houby *Aleuria aurantia*². RS-IIL (11,6 kDa) je D-manosu vázající lektin, který je sekvenčně i strukturně velice podobný lektinu PA-IIL z *P. aeruginosa*, přičemž velmi zajímavou se jeví jejich odlišná substrátová specifita³. Lektin RS20L (20 kDa) taktéž váže D-manosu a přestože není sekvenčně podobný žádné známé aminokyselinové sekvenci, vyřešení jeho krystalové struktury ukázalo, že je částečně strukturně homologní s živočišnými lektiny, galektiny.

LITERATURA

1. Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., Gouzy J., Mangelot S., Arlat M., Billault A., Brottier P., Camus J.C., Cattolico L., Chandler M., Choise N., Claudel-Renard C., Cunnac S., Demange N., Gaspin C., Lavie M., Moisan A., Robert C., Saurin W., Schiex T., Siguier P., Thebault P., Whalen M., Wincker P., Levy M., Weissenbach J., Boucher C.A.: *Nature* 415, 497 (2002).
2. Wimmerová M., Mitchell E., Sanchez J.F., Gautier C., Imberty A.: *J. Biol. Chem.* 278, 27059 (2003).
3. Sudakevitz D., Kostlánová N., Blatman-Jan G., Mitchell E., Lerrer B., Wimmerová M., Katcoff D.J., Imberty A., Gilboa-Garber N.: *Mol. Microbiol.* 52, 691 (2004).

PŘÍPRAVA NOVÝCH IMAC SORBENTŮ A JEJICH REVERSIBILNÍ INTERAKCE S IMUNOGLOBULINY

KATEŘINA KRÁČALÍKOVÁ^{a,b} a MIROSLAV BLEHA^a

^aÚstav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, ^bFakulta Přírodovědecká, Universita Karlova, Albertov 6, 120 00 Praha 2

Chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (immobilized metal affinity chromatography - IMAC) je separační metoda používaná pro izolaci nebo studium buď přírodních nebo rekombinantních proteinů. Tato pseudo-biospecifická technika je založena na afinitě kationtů přechodných kovů (Mn^+), nejčastěji Ni^{2+} , Cu^{2+} nebo Zn^{2+} , imobilizovaných na pevné matici, k určitému seskupení aminokyselin na povrchu bílkoviny¹. Největší příspěvek vazby proteinu na imobilizovaný kovový kation se připisuje histidinům. Ionty Mn^+ jsou na pevnou matici imobilizovány prostřednictvím koordinace s chelatující skupinou, která je k matici připevněna kovalentní vazbou.

IMAC byla mimo jiné použita k separaci imunoglobulinů². V porovnání s jinými typy bílkovin, například albuminy, umožňuje přítomnost oligohistidinového jádra na C-konci molekuly imunoglobulinu relativně silnou interakci s imobilizovaným kationtem Mn^+ .

V současné době je nejpoužívanější pevnou matici (nosičem kovového iontu) v IMAC zesíťovaný agarosový gel Sepharose CL, ale existují též komerční sorbenty založené na syntetických polymerních maticích, např. Fractogel EMD Chelát. Vývoj nových syntetických maticí pro IMAC i jiné bioseparace je však stále ve stádiu rozvoje³.

Část našeho výzkumného programu je věnována studiu nových sorbentů připravených z kopolymerních nebo terpolymerních maticí kovalentním navázáním chelatující skupiny-kyseliny iminodioxové (IDA).

K přípravě maticí jsou používány tyto monomery: oxiranylmethylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (GMA), 2-(2-hydroxyethoxy)-ethylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (DEGMA) a síťovadlo 1,2-ethandiylester 2-methyl-2-propenové kyseliny (EDMA). Vysoce hydrofilní, komerčně nedostupný monomer DEGMA byl využit ke zvýšení hydrofility matrice a tím i ke zlepšení efektivity IMAC procesu potlačením nežádoucích hydrofobních interakcí.

Porozita a morfologie připravených maticí byla studována rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM), rtuťovou porozimetrií, měřením specifického povrchu BET experimentem a stanovením botnavosti v různých rozpouštědlech.

Po navázání chelatující skupiny (IDA) na matici a vytvoření komplexů Ni^{2+} -IDA byla studována afinita přírodních imunoglobulinů k připraveným sorbentům. Byl vyhodnocen vliv struktury matrice na množství navázaných proteinů. Jsou diskutovány možnosti eluce specificky navázaných imunoglobulinů z různých maticí a ovlivnění pevnosti vazby proteinu na sorbent variací koncentrace imobilizovaného nikelnatého komplexu.

Výzkum je podporován granty GA AV ČR (A 4050910), AV ČR (K 4055109), AVOZ 40500505.

LITERATURA

1. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: *Nature* 258, 598 (1975).
2. Hale J. E., Beidler D. E.: *Anal. Biochem.* 222, 29 (1994).
3. Garipcan B., Andac M., Uzun L., Denizli A.: *React. Funct. Polym.* 59, 119 (2004).

IMOBILIZACE CELÝCH BUNĚK *Rhodococcus equi* A4 V HYDROGELU A POZOROVÁNÍ JEJICH NITRILHYDRATASOVÉ A AMIDASOVÉ AKTIVITY

DAVID KUBÁČ a LUDMILA MARTÍNKOVÁ

Mikrobiologický ústav, Akademie věd ČR, Videňská 1083, 14220 Praha
kubacd@vscht.cz

Biokatalýza je v současné době velice populární metoda. Přináší ve srovnání s běžnými chemickými postupy celou řadu výhod. Reakce katalyzované enzymy nebo celobuněčnými katalyzátory zpravidla probíhají za mírných podmínek, stereo- a regiospecificky. Mikrobiální hydrolyza nitrilů jak už přírodních tak i některých syntetických je využívána v řadě průmyslových aplikací. U bakteriálních buněk *Rhodococcus equi* A4 byla již dříve pozorována hydrolytická aktivita k široké škále nitrilů.

Imobilizace biokatalyzátoru přináší oproti suspenznímu způsobu celou řadu výhod. Především opakované použití imobilizovaných buněk nebo možnost použití průtočného bioreaktoru.

Tato práce je zaměřena na nalezení optimálních reakčních podmínek a vhodného množství biokatalyzátoru pro imobilizované buňky *Rhodococcus equi* A4 a srovnání jejich aktivity s tradiční suspenzí buněk. Dále byly za zjištěných optimálních podmínek provedeny série opakovaných biotransformací a zjišťován postupný pokles aktivity. Na základě těchto měření byl nalezen vhodný počet opakování biotransformační reakce s jednou vsádkou biokatalyzátoru.

REGULÁCIA EXPRESIE ANTIONKOGÉNU p53 POMOCOU RNA INTERFERENCIE

**BRANISLAV KUSENDA, ROMANA BORSKÁ, BORIS
TICHÝ, JANA KOTAŠKOVÁ, SOŇA ŠTRUNCOVÁ a
ŠÁRKA POSPÍŠILOVÁ**

*Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní
hematoonkologická klinika, FN Brno, Černopolní 9, 625 00
Brno*

Antionkogén p53 je silný transkripčný faktor, ktorý hrá významnú rolu v regulácii bunkového cyklu. Mutácie tumorsupresorového génu p53, vyskytujúce sa vo viac ako 50 % ľudských nádorových buniek, vedú k neschopnosti p53 zúčastňovať sa na regulácii bunkového cyklu a spustiť apoptotické dráhy. Tieto zmeny nemusia nutne viesť ku kompletnej strate funkcie p53 ako sekvenčne špecifického regulátora transkripcie, ale môžu viesť aj onkogenéze v závislosti od typu mutácie. RNA interferencia (RNAi) bolo popísaná ako proces posttranskripčného utlmovania génovej expresie (PSTGS), sprostredkovaný dvojreťazcovými molekulami RNA, slúžiaci nielen ako regulačný, ale aj ako obranný mechanizmus bunky proti vírusom a transpozónom. Tento prístup sme použili na utlmenie expresie p53 u nádorových bunkových línií s rozličnými mutáciami, za účelom určiť a porovnať efekty prítomnosti wt a mutantnej formy p53 na transkriptóm nádorových buniek.

Skonstruovali sme vektor pPRO.sh.RNA, konštitutívne exprimujúci krátke vlásenkové RNA (shRNA) cieleňé proti p53 a zelený fluorescenčný proteín (EGFP), ktorý umožňuje stanovenie účinnosti transfekcie a sortovanie buniek (FACS). Z shRNA pôsobením enzýmu DICER vznikajú siRNA (small interfering RNA) s dĺžkou 21 bp a stávajú sa súčasťou komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), ktorý sa s vysokou špecifitou viaže na komplementárne p53-mRNA a spôsobuje ich deštrukciu a posttranskripčné utlmenie génovej expresie. Vysokú špecifitu interakcie siRNA a mRNA, umožňuje rozpoznanie a odlišenie mutantných RNA a ich špecifickú inaktiváciu. Túto špecifitu sme využili na navrhnutie sekvencií pre shRNA cieleňých proti WT a proti mutantnej alele p53, ktoré sme tiež úspešne klonovali do pPRO.sh.RNA.

Úspešne sa nám podarilo utlmiť expresiu wt aj mutaného génu p53 a efektívnosťou do 90 %, čo bolo detekované na úrovni RNA pomocou qRT-PCR a na úrovni proteínov pomocou western-blotting. Následná čipová analýza génovej expresie nádorových buniek u ktorých bola expresia p53 utlmená pomocou RNAi, priniesla jedinečné informácie o zmenách v p53 signálnej dráhe spôsobených mutáciami v géne p53. Utlmenie expresie nefunkčného génu pre proteín p53 prostredníctvom siRNA sa javí ako progresívny prístup pre selektívnu a personalizovanú protinádorovú génovú terapiu.

Práca bola podporovaná grantom MŠMT IK04017C a grantom Elpida – Nukleus.

EXPRESIE HODINOVÉHO GENU PERIOD1 VE VYVÍJEJÍCÍM SE CIRKADIÁNNÍM SYSTÉMU POTKANA A JEJÍ OVLIVNĚNÍ DÉLKOU DNE

**K. LAURINOVÁ, Z. KOVÁČIKOVÁ, M. SLÁDEK,
Z. BENDOVI, H. ILLNEROVÁ a A. SUMOVÁ**

*Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, Videňská
1083, 140 00, Praha 4*

Za vznik cirkadiánních rytmů je zodpovědný systém transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček tvořený tzv. hodinovými geny a jejich proteinovými produkty. Hodinový gen Period1 (Per1) i jeho proteinový produkt PERIOD1 (PER1) jsou důležitou součástí tohoto systému. V suprachiasmatických jádrech (SCN) hypothalamu dospělých potkanů vykazuje exprese Per1 cirkadiánní rytmus a denní profil Per1 mRNA i produkce PER1 proteinu jsou ovlivněny délkou světelné části dne, tzv. fotoperiodou. Cirkadiánní rytmus v tvorbě Per1 mRNA v SCN byl u mláďat prokázán 3. den po narození a vliv fotoperiody na SCN se projevil již 10. den po narození.

Cílem této práce bylo zjistit jak se vyvíjí rytmus v tvorbě PER1 proteinu v SCN potkaních mláďat a zda je denní profil Per1 mRNA, resp. produkce PER1 proteinu již ovlivněn fotoperiodou. Samice s mláďaty byly chovány na světelném režimu s 12 hodinami světla a 12 hodinami tmy (LD 12:12) nebo na umělé dlouhé (LD 16:8) či krátké fotoperiodě (LD 8:16). Mláďata byla 3. (P3) nebo 10. den (P10) po narození převedena do konstantní tmy a odebrána každé 2 hodiny. Na mozkových řezech byly stanoveny 24-hodinové profily Per1 mRNA v SCN pomocí *in situ* hybridizace s 35S- značenou RNA sondou. Denní profily PER1 proteinu v SCN byly stanoveny imunohistochemicky.

Bylo zjištěno že produkce PER1 proteinu v SCN vykazuje v P3 i v P10 při LD 12:12 cirkadiánní rytmus. V P3 fotoperioda neměla na profil Per1 mRNA v SCN vliv. V P10 byl denní profil Per1 mRNA i PER1 proteinu mírně ovlivněn fotoperiodou.

Z našich výsledků je patrné že již u 3-denních mláďat je produkce PER1 proteinu v SCN rytmická a rytmus se mezi P3 a P10 postupně vyvíjí. Expresie Per1 stejně jako produkce PER1 v SCN potkaního mláďete začíná reagovat na fotoperiodu mezi P3 a P10. V P10 vliv fotoperiody zatím nedosahuje stejné úrovně jako u dospělých zvířat.

Vzniklo za podpory GA ČR, granty č. 309050350 a 30902D093.

STUDY OF TRANSPORT MECHANISMS OF DIAGNOSTIC AGENT B22956 IN LIVER DERIVED CELL LINES

ANTONÍN LIBRA^a, CRISTINA FERNETTI^b, MASSIMO VISIGALLI^c, VITO LORUSSO^c, PIER LUCIO ANELLI^c, FRANTIŠEK ŠTAUD^a, CLAUDIO TIRIBELLI^b and LORELLA PASCOLO^b

^aDepartment of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, ^bDepartment BBCM, University of Trieste and Centro Studi Fegato, AREA Science Park, Basovizza SS 14 Km 163,5 34012 Trieste, Italy, ^cCentro Ricerche Milano, Bracco Imaging SpA, Via Folli 50, 20134 Milano, Italy

B22956 is a new low molecular weight gadolinium chelate which belongs to the class of intravascular (blood pool) contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI). It is excreted predominantly by biliary excretion and could be therefore potentially advantageous in hepatobiliary imaging.

To investigate the molecular mechanisms of hepatic transport of B22956 in models of human liver-derived cells and to compare the expression of selected passive transporters on transcriptional level.

Methods: B22956 uptake was measured in hepatic HepG2 and Chang liver cell lines. Absolute quantitative real-time RT-PCR analyses, using cloned PCR products as standards, were performed on total RNA of human normal liver, HepG2 and Chang liver cells to evaluate the transcription of twelve transport genes possibly involved in hepatic uptake: OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E, OATP 8, OAT2, OAT3, OCT1, NTCP, PEPT-1, PEPT-2.

Kinetic constants in the two cell lines showed a 3 times more efficient transport (V_{max}/K_m) of B22956 in Chang liver than in HepG2 cells (6.5 vs. 1.9 pmol/ μ M.mg prot.sec, respectively). The B22956 transport was inhibited by CCK8 which is a specific substrate of OATP-8. Real-time RT-PCR analyses revealed that all the genes, except OAT3, were expressed in normal liver.

Different transcription profiles of transporters were observed in both cell lines. In HepG2 cells the expression of OATP C, OATP-D and OATP-8 was greatly repressed (up to 104 times lower values than normal liver) while OATP-B and OATs expression was either maintained or increased. On the contrary, in Chang liver cells OAT genes were undetectable, while the expression of OATP-D, OATP-E and OATP-8 was similar to normal liver (from 104 to 106 copies per μ g of transcribed RNA).

Transport studies and gene expression analyses indicate that B22956 is a good substrate to the liver specific OATP-8, which has been reported to be poorly expressed or absent in liver tumors. The higher transport of B22956 in Chang liver cells points to the additional involvement of OATP-D and OATP-E. It could be speculated that B22956 will be helpful in detecting hepatic tumoral lesions by contrast enhanced MRI.

TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF *Arabidopsis thaliana* CELL CULTURE TO AN ALKYLATING AGENT

JIŘÍ LIBUS and HELENA ŠTORCHOVÁ

Institute of Experimental Botany ASCR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6
libus@ueb.cas.cz

Alkylating agents modify biologically active molecules including DNA and proteins, whereby interfere with vital functions. Methyl methanesulfonate (MMS) has been established as one of the model methylation agents¹, mainly in the DNA repair studies. According to Angelis², MMS causes DNA damage clearly detectable by single cell gel electrophoresis of *Arabidopsis* nuclei at 10 mM concentration, while no significant increase of DNA fragmentation occurs at 1 mM concentration (both after two hours of treatment).

We have used the 10 mM and 0.5 mM concentrations of MMS to treat *Arabidopsis thaliana* cell culture, and assayed for expression levels of chosen genes in time series to find transcripts whose abundance changes in response to alkylation stress.

The cell culture was placed in media containing respective concentration of MMS and harvested at different time points. Total RNA was isolated and reverse transcribed using 32P dATP. The probes were hybridized to nylon membrane-based cDNA arrays containing ESTs from the collection of Max Planck Institut fuer Zuechtungsforschung, Cologne, and cDNA fragments cloned by RT-PCR. The images were quantified by QuantityOne software (BIORAD). Results and Conclusions: We have analyzed expression profiles of approximately 350 genes at several time points (related to the onset of MMS treatment) to choose some of them for further analysis by Real Time PCR (currently under process). The preliminary semi-quantitative array experiments enabled us to concentrate on better candidate genes from the wide selection undertaken when designing the array.

REFERENCES

1. Jelinsky S.A., Samson L.D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 1486.
2. Menke M., Chen I., Angelis K.J., Schubert I.: Mutat. Res. 2001, 87.

NESOUČINNÝ PRŮBĚH CYKLOADIČNÍCH REAKCÍ DERIVÁTŮ 2-VINYLTIOFENU S DIMETHYL-ACETYLENDIKARBOXYLÁTEM

ALEŠ MACHARA, MILAN KURFÜRST, VÁCLAV KOZMÍK a JIŘÍ SVOBODA

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, PŠČ 166 28, Praha 6
ales.machara@seznam.cz

Nedávno bylo zjištěno, že topologie kondenzovaných derivátů vinylthiofenu podstatně ovlivňuje jejich stabilitu a reaktivitu¹⁻³.

V návaznosti na tyto poznatky budou prezentovány výsledky studia cykloadičních reakcí různých 2-vinylthiofenových derivátů s dimethyl-acetylendikarboxylátem. Kromě produktů 1:1 reakce byly získány i produkty následných cykloadičních a enových reakcí. K nejzávažnějším zjištěním však patří, že pravděpodobně nesoučinný mechanismus reakce vede při spoluúčasti atomu síry k rozšíření thiofenového kruhu na thiopyranový a následně až k derivátům thialenů (pseudoazulenů). Dále bude diskutován vliv rozpouštědla a účinných katalyzátorů Dielsových-Alderových reakcí na průběh reakce. Na základě struktur izolovaných látek (Schéma 1) a jejich distribuci byly navrženy mechanismy vzniku produktů.

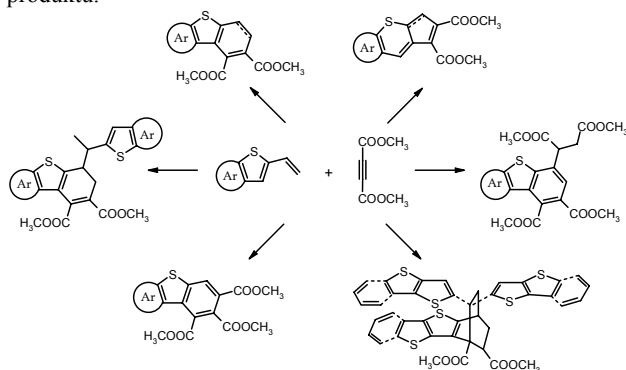


Schéma 1

Práce byla podporována grantem MŠMT ČR (projekt č. MSM 22310000) a GA ČR (projekt č. 202/02/0840).

LITERATURA

1. Svoboda J., Pihera P., Sedmera P., Paleček J.: Collect. Czech. Chem. Commun. *61*, 888 (1999).
2. Váchal P., Pihera P., Svoboda J.: Collect. Czech. Chem. Commun. *62*, 1468 (1997).
3. Pihera P., Dvořáková H., Svoboda J.: Collect. Czech. Chem. Commun. *64*, 389 (1999).
4. Machara A., Kurfürst M., Kozmík V., Petříčková H., Dvořáková H., Svoboda J.: Tetrahedron Lett. *45*, 2189 (2004).

Thermal Stability of the Human Acid α 1-Glycoprotein in Systems Water-Low Aliphatic Alcohol

LINDA MARŠÁLKOVÁ and VLADIMÍR KARPENKO

Department of Physical and Macromolecular Chemistry,
Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2

Acid α 1-glycoprotein (AGP) is a protein from the α 1-globuline fraction of human blood serum¹ classified among the superfamily of lipocalins. Its molecule contains 183 amino acids with 21 possible substitutions in one polypeptide chain linked by two disulfide bonds. The content of carbohydrate moiety is slightly

over 40 % of the total molecular weight¹ (41 kDa) of AGP, and five branched carbohydrate units are linked by the *N*-glycoside bond to asparagine residues of the peptide chain². All carbohydrate units are terminated by sialic acid residues, their total number being 15. The isoelectric point of AGP has been found to vary between pH 1.8 and 2.7, depending on the buffer chosen. The native structure of AGP is characterized by a low α -helix content and a high of β -sheet³ content. Although AGP has been studied for over fifty years, all attempts at its X-ray analysis have failed; there is only a 3D computer model⁴ of the peptide part of the AGP molecule. The physiological role of this protein is also not entirely clear.

The thermal stability of the acid α 1-glycoprotein has been studied in water-methanol and water-ethanol systems in the acid region between pH 2 and 6 by the temperature perturbation difference spectroscopy (TPDS), fluorescence spectroscopy, and circular dichroism (CD). In all experiments the sample was heated, cooled, and heated again within the temperature range of 25 °C to 80 °C, with 5 °C steps. At each temperature the corresponding spectrum was recorded. The concentration of alcohols, expressed as volume fraction, was 24 % for methanol and 24.1 % for ethanol. The following wavelength regions were used: TPD spectra 240–320 nm, fluorescence spectra 290 - 500 nm with an excitation wavelength of 286 nm, and circular dichroic spectra 200–260 nm. This study included both native and desialyzed AGP. TPD and fluorescence spectra were examined using principal component analysis.

The results allow the following conclusions: (i) In the acid region, the behavior of AGP in the presence of small aliphatic alcohols is less reversible than in comparison to aqueous solutions of the same pH. (ii) The typical cooperative behavior of small globular molecules is apparent at the pH values higher than 4, in the region where AGP molecules have a negative net charge. (iii) Extremely low AGP solubility of AGP was observed in the presence of both methanol and ethanol at pH 3; because of this effect, which occurs in a very narrow range of pH values, it was necessary to decrease the volume fraction of alcohols in the system at this pH to 1.26 % for methanol and 12.34 % for ethanol. (iv) Desialyzed AGP retains its high solubility at pH 3 over the whole temperature range in the presence of 24 % of both methanol and ethanol in the system; this observation supports the probable role of dissociated sialic acid residues in the process of AGP aggregation at this pH. (v) CD spectra indicate the influence of small aliphatic alcohols on the secondary structure of AGP: higher concentrations of alcohols increase the α -helix content and stabilize this structure at the expense of β -sheet. CD spectra deserve to be studied more deeply toward a better understanding of the influence of pH, alcohol, and temperature change on the content of secondary structure motives in AGP molecules. Improving the AGP4 computer model and its comparison with experimental data would be essential the contributions toward characterizing the behavior of AGP molecules under various conditions, including those involving mixed solvents.

REFERENCES

1. Schmid K., in: *Alpha1-Acid Glycoprotein: Genetics, Biochemistry, Physiological Functions, and Pharmacology* (P. Baumann et al., ed.), p.7. Alan R. Liss Inc. 1989.

- Schmid K., Kaufmann H., Isemura S., Bauer F., Emura J., Motoyama T., Ishiguro M., Nanno S.: *Biochemistry* 12, 2711 (1973).
- Kodíček M., Infanzón A., Karpenko V.: *Biochim. Biophys. Acta* 1246, 10 (1995).
- Kopecký V. jr., Ettrich R., Hofbauerová K., Baumruk V.: *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 300, 41 (2002).

VÝVOJ POTENCIÁLNÍCH ANTITUBERKULOTIK O NOVÉM MECHANISMU ÚČINKU

**JOSEF MATYK, HANA DIVIŠOVÁ a
PETRA HUSÁKOVÁ**

*Katedra anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
matyk@faf.cuni.cz*

Počátek 21. století lze nazvat obdobím návratu tuberkulózy do průmyslově vyspělých zemí. Při vývoji nových antituberkulotik mají největší význam preparáty o novém mechanismu účinku. V devadesátých letech minulého století se objevily práce, ukazující na nový mechanismus účinku salicylanilidů¹.

Sdělení iniciovalo široký výzkum nových antituberkulotik z této skupiny. Na našem pracovišti bylo nedávno prokázáno, že stejný mechanismus účinku mají také benzoxazindiony². Na základě předchozích prací provedených na našem pracovišti^{3,4} jsem se soustředil na hledání nových vysoce účinných izosterních sloučenin. Úspěšnými byly halogenované v acylové části 4-alkylsalicylanilidy a jim odpovídající 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony. Širokým spektrem účinku (hodnoceném *in vitro*) překonávají soudobá léčiva.

Práce je součástí výzkumného záměru MSM 111600001.

LITERATURA

- Hlasta D.J., Demers J.P., Folenó B.D., Fraga-Spano S.A., Guan J.H., Hilliard J.J., Macielag M.J., Ohemeng K.A., Sheppard C.M., Sui Z.H., Webb G.C., Weidner-Wells M.A., Werblood H., Barrett J.F.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 1923 (1998).
- Waisser K., Dražková K., Holý P., Palát jr. K., Kaustová J.: *Folia Pharm. Univ. Carol.* 29, 17 (2003).
- Waisser K., Pesina M., Holy P., Pour M., Bures O., Kunes J., Klimesova V., Buchta V., Kubanova P., Kaustova J.: *Arch. Pharm.* 336, 322 (2003).
- Waisser K., Bureš O., Holý P., Kunes J., Oswald R., Jiraskova L., Pour M., Klimesova V., Palat K., Kaustova J., Danse H.M., Mollmann U.: *Pharmazie* 58, 83 (2003).

siRNA INHIBICE OVER-EXPRIMOVANÝCH GENŮ U CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

**MICHAELA MERKEROVÁ, HANA BRUCHOVÁ a
RADIM BRDIČKA**

Ústav hematologie a krevní transfúze, U nemocnice 1, 128 20 Praha 2

V posledních letech se při analýzách genové exprese začíná uplatňovat technologie RNAi (RNA interference). Jedná se o specifické post-transkripční tlumení genů způsobené vnesením cizorodé dsRNA do buňky. Ta je endonukleázou Dicer štěpena na 21–23 nt krátké siRNA (short interfering RNAs), které po inkorporaci do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex) způsobí rozštěpení komplementárních molekul mRNA a tím inhibici exprese daného genu.

Chronická myeloidní leukemie (CML) je charakterizována fúzním genem BCR/ABL, který má pravděpodobně rozhodující úlohu při vzniku a rozvoji onemocnění. Abychom více porozuměli mechanismu transformace, zaměřila se naše laboratoř na hledání dalších odlišností v genové expresi hemopoetických buněk pacientů s CML. Analýzy expresního profilu provedené pomocí cDNA biočipů vedly k identifikaci několika genů se signifikantně zvýšenou expresí¹⁻³, jejichž význam v leukemogenezi chceme objasnit siRNA-inhibicí. Následný dopad tlumení genů na dynamiku exprese budeme sledovat pomocí expresních čipů. Jedním z genů, který by se potenciálně mohl podílet na vzniku či progresi onemocnění, je PCNA (proliferating cyclic nuclear antigen). Pomocí siRNA proti tomuto genu byly optimalizovány podmínky pro transfekci primárních leukemických buněk a buněčných linií K562 a MOLM-7 odvozených od CML. Jedním z nejproblematictějších kroků je vnesení siRNA do buněk. Bylo vyzkoušeno několik druhů transfekčních činidel: Metafectene (Biontex), Oligofectamine (Qiagen), siPORT Amine (Ambion) a ExGene 500 (Fermentas), a dále elektroporace a nukleofekce. Účinnost transfekce byla ověřována pomocí siRNA značené fluoresceinem, míra inhibice byla sledována na úrovni mRNA pomocí RT-PCR v reálném čase a na proteinové úrovni pomocí western blotů. U buněčných linií bylo pomocí Oligofectaminu dosaženo poklesu hladiny mRNA o 70 %. U primárních buněk se jako jediná vhodná z testovaných metod ukázala nukleofekce, pomocí níž byla snížena genová exprese o 60 %. Z dalších testovaných podmínek transfekce byly vybrány následující: 50nM koncentrace siRNA a 1×10⁶ buněk/ml, nejvhodnější doba kultivace buněk po transfekci je 48h.

Na základě výsledků této práce byly navrženy metody pro transfekci siRNA do buněčných linií a primárních buněk získaných od CML pacientů. Tuto techniku chceme přenést i na další over-exprimované geny a sledovat dopad siRNA-inhibice genů na expresní profil ovlivněných buněk. siRNA proti některým z up-regulovaných genů by navíc mohly být v budoucnu využity pro genovou terapii hematologických malignit.

Podpořeno IGA MZ ČR: NR 7989-3.

LITERATURA

- Bruchová H., Klamová H., Brdička R.: *Čas. Lék. Čes.* 139, 655 (2000).

2. Bruchova H., Borovanova T., Brdicka R.: *BIOforum Int.* 5, 259 (2001).
3. Bruchova H., Borovanova T., Klamova H., Brdicka R.: *Leukemia Lymphoma* 43, 1289 (2002).

INHIBITORY CDK ROSCOVITIN A OLOMOUCIN II AKTIVUJÍ NÁDOROVÝ SUPRESOR p53 PROSTŘEDNICTVÍM TRANKRIPČNÍHO STRESU

**PETR MÜLLER^a, VLADIMÍR KRYŠTOF^b,
STJEPAN ULDRIJAN^a, MIROSLAV STRNAD^b a
BOŘIVOJ VOJTĚŠEK^a**

^a*Oddělení experimentální onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 65653 Brno,* ^b*Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc*

Jedním z nejvýznamnějších kroků v procesu maligní nádorové transformace je omezení funkce nádorového supresoru p53, které je nejčastěji způsobeno mutací jeho genu a nebo zvýšením degradace tohoto proteinu. Úspěšná léčba nádorového onemocnění chemo- nebo radioterapií je mnohdy závislá na úspěšné aktivaci proteinu p53 genotoxickým stresem. Tato práce se zabývá novými možnostmi aktivace proteinu p53 cestou inhibice cyklin dependentních kinas (CDK).

Roscovitin i olomoucín II jsou nové syntetické deriváty purinu s potenciálními protinádorovými účinky, které zastavují buněčný cyklus a aktivují protein p53 bez nežádoucího poškození DNA. Inhibice aktivity CDK těmito látkami vede k transkripčnímu stresu a snížení syntézy RNA. I nízké koncentrace těchto látek (5 μ M olomoucín II a 20 μ M roscovitin) vedly k rozpadu jádérka a aktivaci proteinu p53 u buněk nádorových linií MCF-7 a ARN8. Zvýšení transkripční aktivity proteinu p53 bylo měřeno jednak pomocí reportérového genu idukujícího β -galaktosidázou a jednak detekcí zvýšené exprese proteinu p21^{WAF1} a proteinu MDM2. Abychom ověřili předpoklad, že protein p53 je aktivován v důsledku transkripčního stresu a rozpadu jádérka, analyzovali jsme lokalizaci a interakce proteinu L11. Tento ribosomální protein se specificky uvolňuje z jádérka při snížení syntézy rRNA a aktivuje protein p53 tím, že interaguje s proteinem MDM2 a inhibuje tak degradaci proteinu p53. Po působení olomoucínu II i roscovitinu jsme imunocytochemicky detekovali rozpad nukleolu u buněk MCF-7 a uvolnění proteinu L11 do nukleoplazmy. Uvolnění proteinu L11 bylo následováno indukci proteinu p53 a aktivací exprese jeho cílových genů MDM2 a p21^{WAF1}. Pomocí imunoprecipitace jsme ověřili specifickou interakci mezi proteinem MDM2 a L11 po působení roscovitinu i olomoucínu II.

Aktivace proteinu p53 cestou inhibice CDK ukazuje jistou alternativu ke klasické genotoxické terapii. Inhibice CDK purinovými analogy a následné uvolnění jadérových proteinů se zdá být využitelné u nádorů u nichž je protein p53 zvýšeně degradován prostřednictvím vysoké aktivity onkogenu MDM2. Naše výsledky rovněž ukazují významnou potenciální účinku těchto inhibitorů s terapeuticky užívanými látkami (Etoposid, Doxorubicin, Camptothecin).

Tato práce byla podporována granty IGA NR/8338-3 a GA ČR 204/03/D231.

NIKLEM KATALYZOVANÁ AKTIVACE: TVORBA VS. ŠTĚPENÍ C-C VAZEB

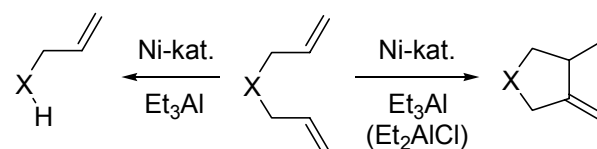
**DAVID NEČAS^a, MATYÁŠ TURSKÝ^a a
MARTIN KOTORA^{a,b}**

^a*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 43 Praha 2*

^b*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6
katora@natur.cuni.cz, david.necas@seznam.cz*

Tvorba a štěpení C-C vazeb pomocí katalytických systémů na bázi komplexů přechodných kovů je dnes intenzivně studovanou oblastí v oboru organických syntéz. Jednou z možných reakcí alkenů s komplexy přechodných kovů je tvorba organokovových sloučenin za vzniku vazby C-kov a tyto látky většinou reagují dále za vzniku jedné či více nových vazeb C-C. Typickým zástupcem těchto reakcí jsou polymerace¹ či cyklizace² dienů. Dosažení opačného procesu, tj. degradace alkenů na menší celky není příliš známé. Katalytické štěpení vazeb C-C pomocí komplexů přechodných kovů je sice známá reakce, ale probíhá většinou pouze s látkami se silným sterickým pnutím, kde hnací silou je snížení tohoto pnutí³.

Tento projekt vychází z předešlého studia železem katalyzovaných cyklizací 2-chlor- α,ω -dienů⁴, při kterém jsme našli nový a snadno použitelný katalytický systém na bázi Ni. Vhodnou volbou výchozího dienu, reakčních podmínek a změnou molárních poměrů jednotlivých komponent katalytického systému je možné dosáhnout buď tvorby vazeb C-C (cyklizace), či změnit směr reakce a dosáhnout štěpení C-C vazeb (deallylace)⁵. Tento jev byl podroben zkoumání z hlediska reakčního mechanismu a vlivu struktury výchozí sloučeniny na přednostní průběh reakce.



Práce byla podpořena grantem GA ČR 203/03/H140.

LITERATURA

1. Chen E. Y. X., Marks T. J.: *Chem. Rev.* 100, 1391 (2000).
2. (a) Knight K. S., Waymouth R. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 113, 6268 (1991).
(b) Yamamoto Y., Ohkoshi N., Kameda M., Itoh K.: *J. Org. Chem.* 64, 2178 (1999).
3. Bishop K.C. III.: *Chem. Rev.* 76, 461 (1976).
4. Nečas D., Kotora M., Císařová I.: *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 1280.
5. Nečas D., Turský M., Kotora M.: *J. Am. Chem. Soc.* 126, 10222 (2004).

PŘÍPRAVA 6-ARYLPURINYL-NUKLEOSIDŮ KATALYTICKOU CYKLOTRIMERIZACÍ

PETR NOVÁK, PAVEL TUREK a MARTIN KOTORA

*Katedra organické a jaderné chemie, Přírodovědecká fakulta
UK v Praze, Hlavova 8, 128 43, Praha 2
katora@natur.cuni.cz*

Sloučeniny, které obsahují 6-arylpurinové báze (např. nukleosidy), vykazují biologickou aktivitu (cytostatická, antibakteriální, antimykobakteriální atd.). Jednou z možností jejich přípravy je vedle cross-couplingových reakcí cyklotrimerizace. Je možné využít [2+2+2] cyklotrimerizaci 6-alkynylpurinů s diyny katalyzovanou komplexy přechodných kovů (zejména Ni a Co). Za těchto podmínek byly zkoušeny pouze cyklotrimerizace s 9-allyl a 9-THP ochráněnými 6-alkynylpuriny.

Tématem této práce bylo připravit 6-alkynylpuryl-nukleosidy pomocí [2+2+2]-cyklotrimerizace 6-alkynylpuryl-nukleosidů s diyny. Tyto reakce byly katalyzovány Ni(II) komplexem (NiBr₂(dpppe)), který byl *in situ* redukován pomocí Zn(0). Pro reakce byla využita celá řada různých substituovaných diynů (R = H, alkyl, fenylyl, SiMe₃; X = C(COOEt)₂, C(OMe)₂, C(COOEt)CN, C(COOEt)COMe, NTs, NPh). Reakce proběhly dle očekávání a poskytly odpovídající produkty v dobrých výtěžcích.

LITERATURA

- (a) Turek P., Kotora M., Hocek M., Císařová I.: *Tetrahedron Lett.* 44, 785 (2003).
- (b) Turek P., Kotora M., Tišlerová I., Hocek M., Votruba I., Císařová I.: *J. Org. Chem.* 69, 9224 (2004).

CHEMICKÉ METODY HODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY STRUKTURNĚ ODLIŠNÝCH LÁTEK

RADKA OPATŘILOVÁ

*Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta VFU,
Palackého 1-3, 612 42 Brno
opatrilovar@vfu.cz*

Jedním z faktorů, kterému je v současnosti připisována stále větší role v rozvoji patologických procesů v jakémkoliv organismu, jsou volné radikály. Jedná se o vysoce reaktivní formy kyslíku a dusíku, které mohou reagovat s celou řadou látek a narušovat tak jejich funkci. Látky mající schopnost zamezit jejich působení se nazývají antioxidanty, zhášeči nebo scavengery radikálů. V posledních desetiletích je studováno antioxidační a antiradikálové působení řady známých, ale i nově syntetizovaných látek, vhodných pro komplexní léčbu nemocí, na jejichž patogenezi se spolupodílejí volné radikály. K testování antioxidační a antiradikálové aktivity byla vyvinuta celá řada analytických metod. Jimi se stanovuje celková antioxidační kapacita i schopnost zhášet jednotlivé typy volných radikálů. Mnohé z nich jsou však velmi náročné na laboratorní vybavení nebo postup. Z tohoto důvodu se stále

optimalizují nové metody nenáročné na vybavení a dostupné v běžných laboratorních podmínkách.

V práci se zaměřuji na srovnání metod zhášení:

- stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazilu, spektrofotometricky při 517 nm,
- oxidu dusnatého tzv. Griessovou reakcí, spektrofotometricky při 540 nm,
- „radikálu“ bromu ve stavu zrodu, modelová metoda, kde je radikál generován chemickou reakcí KBrO₃ a KBr, titračně a spektrofotometricky při 360 nm,
- peroxidu vodíku H₂O₂, který sice není volným radikálem, ale prochází však snadno buněčnými membránami, a proto může oxidovat látky daleko od místa svého vzniku, titračně,
- chloraminu, používaného pro jeho silný oxidační efekt, titračně a spektrofotometricky (reakcí s metolem a kyselinou sulfanilovou) při 520 nm.

Těmito metodami byla otestována řada látek různých chemických struktur, u nichž je antioxidační účinek předpokládán nebo žádán. A to aminofenazon, fenazon, kyselina salicylová; látky působící protizánětlivě. Methionin, N-acetylcystein, glutathion patří mezi thioly. Flavonoid rutin a kvercetin. Kyselina askorbová (vitamin C) se oxiduje přijetím dvou elektronů na kyselinu dehydroaskorbovou. Metody byly použity i pro hodnocení nově připravených látek, série derivátů aryloxyaminopropanolu, popř. heteroarylaminoethanolu. Tyto látky byly připraveny na Ústavu chemických léčiv jako potenciální antagonisté beta-adrenergních receptorů a antidysrytmika, vhodná i pro terapii vysokého tlaku. Na vzniku hypertenze se podílí aterosklerotický plak vzniklý usazováním oxidovaného cholesterolu na stěny cév, proto by antioxidační účinek látek byl pro tuto skupinu velice žádoucí. Jako porovnávací byl zvolen již v praxi používaný hydrochlorid propranololu.

Práce byla realizována v rámci řešení post-dok grantu GA ČR 203/03/D182

REZISTENCE PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ K LÉČBĚ GLIVECEM

**EVA OTÁHALOVÁ, JANA MORAVCOVÁ, HANA
KLAMOVIČOVÁ a CEDRIK HAŠKOVEC**

*Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1,12820
Praha 2
eva.otahalova@uhkt.cz*

Chronická myeloidní leukemie (CML) je charakterizována přítomností hybridního genu BCR/ABL. Tento gen se nachází u více než 95 % případů onemocnění CML a monitorování hladiny jeho exprese na úrovni mRNA slouží ke sledování průběhu onemocnění. Při úspěšné léčbě dochází ke snížení hladiny, naopak vzrůstající množství transkriptu BCR/ABL upozorňuje na progresi choroby. Produkt genu BCR/ABL, onkoprotein BCR/ABL, je nositelem tyrosin-kinasové aktivity, která je v porovnání s proteinem c-ABL konstitutivně zvýšena. Zapojení proteinu BCR/ABL do signálních drah ovlivňujících proliferaci, diferenciaci a apoptosu buněk vede k nekontrolovatelné transformaci buňky.

Léčbou první volby u pacientů s CML se stává Glivec (imatinib mesylate, STI571). Molekula Glivecu specificky kompetuje v proteinu BCR/ABL o vazebné místo s ATP a tím inhibuje jeho tyrosinkinázovou aktivitu. Problémem je existence primární a také sekundární rezistence, která vzniká v průběhu léčby především u pacientů s pokročilejším stadiem onemocnění. Bylo prokázáno, že rezistence je způsobena mutacemi ve vazebné smyčce pro ATP, amplifikací genu BCR-ABL, případně zapojením kinas rodiny Src¹, které mohou přebírat roli BCR/ABL v patogenezi buňky.

Potencionálním markerem primární rezistence CML pacientů ke Glivecu se zdá být gen WT1 (Wilms' tumor suppressor gene)². Tento gen je mimo jiné silně exprimován v řadě hematologických malignit. V případě CML je možným prognostickým markerem – hladina transkriptů koreluje s průběhem nemoci.

V naší studii byly k určení primární rezistence prováděny krátkodobé *in vitro* kultivace primárních buněk s Glivecem. Vlastnosti buněk byly dále charakterizovány určením jejich vitality, proliferační schopnosti – exprese proliferačního faktoru Ki67, apoptosy – aktivita caspasy-3 a také stanovením hladiny exprese genů BCR/ABL a WT1. Byly použity leukocyty izolované z periferní krve BCR/ABL pozitivních CML pacientů před i během léčby Glivecem a BCR/ABL pozitivní buněčná linie K562. Jako negativní kontrola byly užity buňky BCR/ABL negativní – leukocyty zdravých dárců a buněčná linie ML2. K určení exprese jednotlivých genů bylo použito metod kvantitativní RT-PCR.

V případě BCR/ABL pozitivních buněk (linií K562 a leukocytů většiny CML pacientů) vedla inkubace s Glivecem k inhibici růstu, snížení proliferační schopnosti, zvýšené indukci apoptosy a snížení exprese genů BCR/ABL a WT1. U kontrolních buněk tento jev pozorován nebyl. Leukocyty pacientů, u kterých nebyl *in vitro* zjištěn inhibiční vliv Glivecu nebo kteří se stali rezistentní k léčbě Glivecem, byly následně inkubovány s inhibitory kinas rodiny Src, jak a dalších.

Získané výsledky naznačují možnost využití exprese genu WT1 k určení primární rezistence CML pacientů k léčbě Glivecem. Výsledky dále naznačují, že u rezistentních pacientů mohou alespoň částečně roli BCR-ABL přebírat jiné proteinkinasy.

Podporováno grantem IGA NC/3721 MZČR

LITERATURA

1. Donato N. J., Wu J.Y., Albitar M.: *Blood* 98, 770a (2001).
2. Cilloni D., Saglio G.: *Semin Hematol* 40, 37 (2003).

TECHNIKY EPITOPOVÉHO MAPOVÁNÍ PRO VYHLEDÁVÁNÍ ALERGENNÍCH EPITOPŮ POTRAVINOVÝCH ALERGENŮ

ŠÁRKA OUZKÁ^a, JANA KŘENKOVÁ^{a,b}, LUCIE ŠTĚPÁNOVÁ^c, ZUZANA BÍLKOVÁ^c a JOSEF KRÁLOVSKÝ^a

^aKatedra analytické chemie a ^cKatedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice.

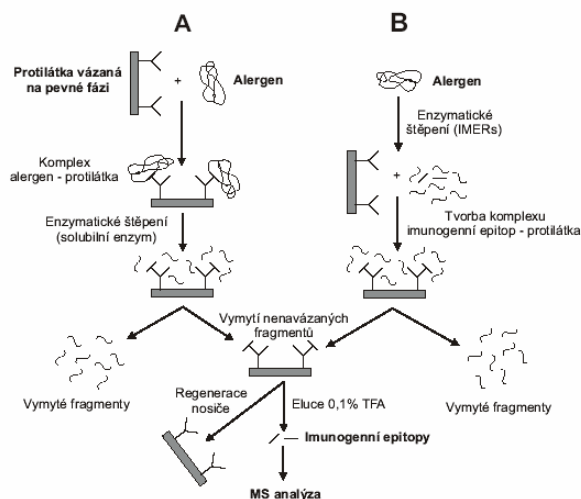
^bÚstav Analytické Chemie AV ČR, Veverí 97, 611 42 Brno.
Sarka.Ouzka@upce.cz

Alergie se dnes stává skutečně závažným medicínským problémem s rostoucím trendem, v současné době postihuje 15–25 % populace. Do popředí se dostává vývoj tzv. bezpečných vakcín pro léčbu alergií s použitím krátkých lineárních peptidů, odpovídajících imunogenním epitopům daného alergenu. K identifikaci těchto imunogenních epitopů slouží techniky epitopového mapování.

Naším cílem je zavést metodu pro rychlé vyhledávání a izolaci alergenních epitopů potravinových alergenů s použitím nově vyvinutých magnetických enzymových (IMERs) a imunoafinitních (IMARs) reaktorů v kombinaci s technikami epitopového mapování „Epitope extraction“ a „Epitope excision“ spolu s MS analýzou eluovaných imunogenních epitopů.

Samotná technika epitopového mapování „Epitope excision“ pro potravinové alergeny (obr. 1A) spočívá v limitované enzymatické proteolýze daného alergenu v komplexu se svou specifickou IgE protilátkou, vázanou na pevné fázi (tj. na magnetickém nosiči). Navázané zůstávají pouze fragmenty chráněné vazebným místem protilátky (tzv. imunogenní epitopy alergenu). Při technice „Epitope extraction“ (obr. 1B) se po proteolýze vybraného alergenu v roztoku (za použití IMERs specificky vychytají IgE protilátkou, vázanou na pevné fázi, imunogenní epitopy alergenu. Po důkladném promytí nenavázaných fragmentů je imunogenní epitop eluován pomocí 0,1% TFA a analyzován pomocí ESI, MALDI-TOF nebo FT-ICR-MS. Pro tuto techniku byl vybrán modelový systém: potravinový alergen ovalbumin (OVA) a poly- i monoklonální anti-ovalbuminové protilátky. Jednotlivé kroky této techniky bylo třeba optimalizovat.

V první fázi byla provedena optimalizace limitované i celkové proteolýzy modelového alergenu OVA pomocí IMERs s imobilizovaným nativním i TPCK-trypsinem. U tohoto enzymového reaktoru byla sledována operační i skladovací stabilita enzymu. Vzorky po proteolýze byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, TSDS-PAGE, CZE a ESI-TOF-MS.



Obr. 1. Schéma technik epitopového mapování – „Epitope excision“ (A) a „Epitope extraction“ (B)

Ve druhé fázi byla provedena optimalizace imobilizace protilátek na různé nosiče s cílem vybrat nejvhodnější nosič i způsob imobilizace protilátek, aby byla zajištěna co nejnižší nespecifická sorpce proteinů (peptidů) a maximální rezistence IMAR vůči proteolýze vybranými enzymy.

Nyní budou techniky „Epitope excision“ a „Epitope extraction“ v daném uspořádání použity pro vybraný modelový systém s identifikací imunogenních epitopů OVA a poté je zamýšlíme použít pro studium konkrétních reálných alergenů, např. zkrřížené reagujících alergenů jablka Mal d 1 a břízy Bet v 1 apod.

KONFORMAČNÍ STUDIUM PIGMENT- PROTEINOVÉHO KOMPLEXU REAKČNÍHO CENTRA FOTOSYSTÉMU II (PSII RC).

PETR PALEŇČÁR^a, F. VÁCHA^{a,c} a M. KUTÝ^{a,b}

^aÚstav Fyzikální Biologie, Jihočeská Univerzita, České Budějovice a ^bÚstav ekologie krajiny, AV ČR, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky, ^cÚstav Molekulární Biologie Rostlin, AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Fotosystém II (PSII) je pigment-proteinový komplex lokalizovaný v tylakoidové membráně cyanobakterií, řas a vyšších rostlin. Nedávno byly analyzovány změny v excitonických interakcích v reakčních centrech (RC) PSII RC pigmentů vlivem světlem indukované oxidace primárního donoru (P680) nebo vlivem redukce primárního akceptoru feofitinu a (Phe a) použitím absorpčních spekter a spekter cirkulárního dichroismu (CD)¹. V kontrastu s oxidací primárního donoru, byla světlem indukovaná změna CD spektra vlivem redukce primárního akceptoru teplotně závislá. Z toho vyplývá hypotéza, že při pokojové teplotě redukovaný Phe a indukuje konformační změny v RC proteinech. Tyto změny ovlivňují excitonické interakce RC chlorofylů. Pro lepší pochopení a interpretace nameřených optických spekter² bylo využito molekulární dynamiky (MD) pro studium konformačních změn a *ab initio* výpočtu pro PSII RC pigmenty.

Zřezaný PSII RC byl zkonstruován použitím současné krystalové struktury z *Thermosynechococcus elongatus* (PDB code: 1S5L)³ pro použití v MD simulacích. Parametry silového pole (FF) PSII RC pigmentů vyšších rostlin byly spočteny *ab initio* a částečně získané z různých studií bakteriálních pigmentů typu a^{4,5} a hemových prostetických skupin⁶. Byly provedeny výpočty nábojové distribuce na molekule redukovaného Phe a na okolních aminokyselinách. Relativní změny vypočtených spekter jsou diskutovány a porovnávány s experimentálními daty.

This research was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the CR (MSM6007665808, GACR206/02/D177) and by the Academy of Sciences of the CR (Institutional research concept AVOZ60870520).

LITERATURA

1. Vacha F., Durchan M., Siffel P.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1554, 147 (2002).

2. Vacha F., Psencik J., Kutý M., Durchan M., Siffel P.: *Photosynth. Res.* In press, (2005).
3. Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S.: *Science* 303, 1831 (2004).
4. Foloppe N., Ferrand M., Breton J., Smith J.C.: *Proteins.* 22, 226 (1995).
5. Ceccarelli M., Procacci P., Marchi M.: *J. Comput. Chem.* 24, 129 (2003).
6. Autenrieth F., Tajkhorshid E., Baudry J., Luthey-Schulten Z.: *J. Comput. Chem.* 25, 1613 (2004).

ANTIMITOTICKÝ EFEKT MYOSEVERINU A JEHO 8-AZAANALOGU

**MARTINA PAPRSKÁŘOVÁ^a, VLADIMÍR KRYŠTOF^a,
LIBOR HAVLÍČEK^b a MIROSLAV STRNAD^{a,*}**

^aLaboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta University Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ^bIzotopová laboratoř, Ústav exp. botaniky AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha *strnad@prfholt.upol.cz*

Mikrotubuly tvoří jednu z částí cytoskeletárního systému eukaryotických buněk. Jedná se o dynamická polární vlákna sestávající z tubulinových heterodimerů. Mikrotubuly plní celou řadu funkcí – jsou stavební součástí membrán a buněčných struktur, odpovídají za intracelulární transport a buněčnou signalizaci, a v neposlední řadě řídí segregaci chromozómů v metafázi a cytokinezi buňky¹. Mikrotubulární systém se tak stal slibným cílem pro vývoj nových, specificky zaměřených látek, které by otevřely cestu k účinnější léčbě nádorových onemocnění.

Jedním z nových inhibitorů polymerizace tubulinu je také 9-isopropyl-2,6-bis[(4-methoxybenzyl)amino]-9H-purin známý pod názvem myoseverin^{2,3}. V *in vitro* podmínkách myoseverin indukuje reversibilní štěpení polyjaderných myotubů na jednojaderné úseky fragmentací mikrotubulárního cytoskeletu. Na rozdíl od ostatních mitotických jedů zatím nebyl popsán jeho cytotoxický efekt na nádorovou buňku. Studovali jsme a srovnávali účinky myoseverinu a nově syntetizovaného analogu 8-azamyoseverinu na lidské buněčné nádorové linie. Obě látky způsobovaly inhibici polymerizace tubulinu, prokázanou imunodetekcí mikrotubulárního cytoskeletu v buňkách. Účinnost obou látek byla závislá na typu buněčné linie a na jejich koncentraci. Analýza buněčného cyklu ošetřených buněk průtokovou cytometrií potvrdila výrazný blok buněk v mitotické fázi, který byl po delším časovém působení inhibitoru následován apoptosou. Přítomnost apoptotických buněk byla ověřena i imunodetekcí (western blot) peptidového fragmentu poly(ADP-ribosyl)polymerasy, který vzniká specificky v apoptotických buňkách.

Práce vznikla za přispění Grantové agentury ČR (projekty 303/02/0875 a 204/03/D231).

LITERATURA

1. Mollinedo F., Gajate C.: *Apoptosis* 8, 413 (2003).

- Rosania G.R., Chang Y.T., Perez O., Sutherlin D., Dong H., Lockhart D.J., Schultz P.G.: *Nature Biotechnol.* 18, 304 (2000).
- Franěk F., Siglerová V., Havlíček L., Strnad M., Eckschlager T., Weigl E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67, 257 (2002).

THE ROLE OF PHOSPHOLIPID SIGNALLING IN ALUMINUM TOXICITY IN PLANTS

**PŘEMYSL PEJCHAR^{a,b}, ZUZANA NOVOTNA^a,
OLGA VALENTOVA^a a JAN MARTINEC^b**

^aDepartment of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology Prague, ^bInstitute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague
premysl.pejchar@vscht.cz

Cessation of root growth and changes in root morphology as the most important physiological consequence of aluminum toxicity in plants suggesting a role of the root cytoskeleton as a target structure¹. Plant cytoskeleton research is now focused on the regulation of cytoskeletal dynamics².

In animal organisms is cytoskeleton remodelling regulated by phospholipid degrading enzymes, phospholipase C (PLC) and phospholipase D (PLD)³. The aim of presented work is to find whether plant phospholipid-cytoskeleton signalling is part of molecular mechanism of aluminum toxicity that is still far from being understood.

Fluorescently labelled substrate (BODIPY-phosphatidylcholine) was incorporated into the tobacco cell line BY-2. Labelled cells were then treated with AlCl₃ and butanol (inhibitor of PLD). Products of phospholipases action were analysed in different time intervals in methanol/chloroform cell extracts by HP-TLC and/or HPLC.

Changes of the amount of lysophosphatidylcholine (product of PLA2 action), diacylglycerol (product of PLC) as well as phosphatidic acid (product of PLD) within 30 min of aluminum (0.1 mM AlCl₃) treatment were observed. Al³⁺ affects level of phospholipase products in dose-dependent manner. Butanol decreased the amount of unknown product (probably regulated by PLD) belonging to phospholipid signalling pathway as well. Its identification is currently in progress.

This work was supported by grant of Czech Science Foundation no. 522/05/0340.

REFERENCES

- Jones D.L., Kochian L.V.: *FEBS Lett.* 400, 51 (1997).
- Schwarzerova K., Zelenkova S., Nick P., Opatrný Z.: *Plant Cell Physiol.* 43, 207, (2002).
- Liscovitch M., Czarny M., Fiucci G., Lavie Y., Tang X.: *BBA – Mol. Cell Biol. Lipids* 1439, 245 (1999).

ORGANIZACE EMBRYÍ VE SHLUCÍCH RANÝCH SOMATICKÝCH EMBRYÍ SMRKU ZTEPILÉHO (*Picea abies* /L./ KARST.)

**JIŘÍ PETŘEK^a, LADISLAV HAVEL^a, JAN VÍTEČEK^a,
HELENA VLAŠÍNOVÁ^a, VOJTĚCH ADAM^b, PETR
BABULA^c, KAREL BARTUŠEK^d, DAVID POTĚŠIL^a a
RENÉ KIZEK^a**

^aÚstav biologie rostlin, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^bÚstav chemie a biochemie, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^cÚstav přírodních léčiv, FaF VFU Brno, Palackého 1/3, 612 46 Brno, ^dÚstav přístrojové techniky, AVČR, Kotlářská 2, 611 37 Brno
j.petrek@email.cz

Studium vlivu cizorodých látek (např. ke sledování vlivu těžkých kovů na růst, životnost a tvorbu specifických proteinů) na smrk ztepilý (*Picea abies* /L./ Karst.) je v přirozených podmínkách velmi náročné, proto se hledají možnosti, jak tento výzkum co nejvíce zjednodušit. Jednou z možností, které se v poslední době stále častěji využívá, je studium explantátových kultur raných somatických embryí smrku ztepilého. V naší práci byl růst těchto kultur sledován pomocí vážení čerstvé hmotnosti nebo analýzou obrazu (IA – image analysis) shluků RSE (SRSE). Pro studium životnosti jednotlivých SRSE byla využita aktivita intracelulárních esteraz jako marker aktivního metabolismu a dvojitě barvení, které je založeno na selektivní permeabilitě cytoplazmatické membrány. Dále bylo využito barvení SRSE 1% roztokem 2,3,5-trifenylnitroimidazolium chloridem (TTC) pro studium aktivity buněčného dýchání.

Předpokládali jsme, že růst shluků raných somatických embryí (SRSE) bude ovlivněn procesem subkultivace (nutné přemístění explantátu na čerstvé médium s dostatkem živin). Pomocí metody analýzy obrazu bylo zjištěno, že je přírůstek SRSE po pasážování závislý na jeho počáteční velikosti a také na prostorové orientaci embryí. Při nedodržení původní orientace byl přírůstek SRSE výrazně menší, asi o 20–40 %. Se stářím kultury se zvyšoval vliv orientace SRSE (rozlišení nahore a dole) na její růst. Na základě tohoto zjištění byla stanovena životnost embryí v jednotlivých částech SRSE fluorescenčními barvivy fluoresceindiacetátem a propidium jodidem (dvojitě barvení). Životnost embryí byla nejvyšší ve vnějších částech shluku (90–96 %), zatímco vnitřní části vykazovaly životnost do 10 %. Embrya z jednotlivých částí shluku byla dále kultivována a byl sledován jejich další růst. Explantáty získané ze všech částí SRSE obsahovaly RSE schopná růstu. Přírůstek SRSE pocházejících z vnějších částí byl větší než přírůstek SRSE z vnitřních částí, ale rozdíl se s délkou kultivace a počtem subkultivací snižoval. Pro další studium struktury SRSE byla využita nukleární magnetická rezonance (NMR), která jasně ukázala zvýšenou metabolickou aktivitu ve vnějších částech SRSE. Z našich výsledků jasně vyplývá, že je embryogenní kultura SRSE smrku ztepilého diferenciována.

Příspěvek vznikl za podpory RASO 2005, GA ČR 525/04/P132, IGA FaF VFU IG342012 a IGA MZLU 2005.

LITERATURA

1. Arnold S.: *J. Plant Physiol.* 128, 233 (1987).
2. Havel L., Durzan D.J.: *Int. J. Plant Sci.* 157, 8 (1996).
3. Petřek J., Vacek J., Viteček J., Vlašínová H., Kizek R., Havel L.: *Anal. Bioanal. Chem.*, v tisku.

ULTRASENZITIVNÍ DETEKCE METALOTHIONEINU POMOCÍ CHRONOPOTENCIOMETRICKÉ ROZPOUŠTĚCÍ ANALÝZY

JITKA PETRLOVÁ^a, VOJTĚCH ADAM^{a,b}, DAVID POTĚŠIL^{a,b}, ONDŘEJ BLAŠTÍK^a a RENÉ KIZEK^a

^aÚstav chemie a biochemie, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^bKatedra analytické chemie MU, PřF Kotlářská 2, 611 37 Brno

Metalothionein (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních (6–10 kDa)^{1,2} na cystein velmi bohatých proteinů (až 30 %). MT obsahuje tyto základní strukturální motivy: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X představuje jinou aminokyselinu než cys³. MT se skládají ze dvou domén α , β , které jsou složeny z cysteinových klastrů. β -Doména má tři vazebná místa pro dvojmočné ionty a α -doména čtyři. Hlavní biologickou funkcí MT je homeostatická kontrola a detoxikace těžkých kovů (Zn, Cu a Cd). Často diskutovanou otázkou je schopnost MT transportovat atomy kovů a udržovat tak homeostázu některých esenciálních prvků. Díky těmto významným vlastnostem se hledají nové metody pro snadnou a rychlou detekci MT, které by bylo možné využít i mimo specializované laboratoře.

Analýza byla provedena na AUTOLAB analyzátoru napojeném na VA-Stand 663 v tříelektrodovém zapojení. Vzorky tělních tekutin (lidské krevní sérum a moč) byly před vlastní analýzou upraveny denaturací při 99 °C po dobu 10 min a 15 min centrifugovány 14 000 x g. V naší práci bylo využito katalytického vylučování vodíku ze základního elektrolytu prostřednictvím MT (pík H)^{4,5}, které jsme sledovali pomocí chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy (CPSA). Tato metodika umožnila ultrasenzitivní detekci MT. Limit detekce (3S/N) MT byl 11 zmol v 5 μ l vzorku. Dále byl studován vliv biologické matrice (lidské moči a krevního séra) na katalytický signál. Matrice snižovala signál MT, proto se limit detekce stanovení MT pohyboval kolem 350 fmol. V námi testovaných vzorcích lidského séra od zdravých jedinců byla zjištěna průměrná koncentrace MT 1,1 \pm 0,015 μ M (n=5).

Jak se ukazuje, katalytické signály vylučování vodíku umožňují velmi senzitivní analýzu MT v biologické matrici. Vysoce senzitivní techniky jsou naléhavou nutností, protože hladina MT není jen markerem vlivu těžkých kovů na organismus, ale také potenciálním markerem agresivních nádorových onemocnění.

Příspěvek vznikl za podpory RASO 2005, GA,ČR 525/04/P132 a IGA MZLU 2005.

LITERATURA

1. Kägi J. H. R., Schäffer A.: *Biochemistry* 27, 8509 (1988).

2. Kägi J. H. R.: *Methods Enzymol.* 205, 613 (1993).
3. Studničková M., Turánek J., Zábřavská H., Krejčí M., Kysel M.: *J. Electroanal. Chem.* 421, 25 (1997).
4. Kizek R., Trnková L., Paleček E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).
5. Strouhal M., Kizek R., Vacek J., Trnková L., Němec M.: *Bioelectrochem.* 60, 29 (2003).

PHOTODYNAMIC TREATMENT SUPPRESSES Bcr-Abl PROTEIN EXPRESSION IN CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIC – DERIVED CELL LINE K562 AND DISRUPTS THE CYTOSKELETON STRUCTURE

MICHAELA PLUSKALOVÁ, P. HALADA, I. MARINOV, and Z. HRKAL

Ústav hematologie a krevní transfúze, Oddělení buněčné biochemie, U nemocnice 1, 128 00 Praha 2

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a malignancy of the hematopoietic stem cell. The molecular cause of the disease is known as Philadelphia chromosome. The permanent expression and the abnormal enzymatic activation of an oncogenic Bcr-Abl tyrosine kinase is critical to the disease progression. CML – derived cell line K562 was employed for the research of the action of photodynamic therapy ALA-PDT.

We addressed the question, whether or not a programmed cell death, apoptosis was induced. We obtained some signs of apoptotic induction in response to ALA-PDT treatment, but rather necrosis than a terminal phase of apoptosis was achieved. Further we focused on a description of some molecular mechanisms of K562 cell resistance to the progression of apoptosis, which might be induced by ALA-PDT. We revealed some molecular chaperons that are involved in the K562 cell protection against the termination of the ALA-PDT induced apoptosis. Hsp27 was downregulated in response to the ALA-PDT treatment, nevertheless the remaining Hsp27 and a basal level of Hsp70 was significantly increased in comparison with HL60 cells, which we employed as a model of the ALA-PDT induced apoptosis. On the other hand Hsp60 bearing pro-apoptotic properties remained without any response to ALA-PDT.

Imatinib mesylate was uncovered as a potent inhibitor of the oncogenic tyrosine kinase Bcr-Abl activity and has been successfully used for treatment of CML patients. However, the response to imatinib treatment is poor in some cases due to mutations of bcr-abl gene in the imatinib target place. The alternative way of the CML treatment is an inhibition of molecular chaperon Hsp90. Phosphorylation of Hsp90 causes the dissociation of multiprotein complex Hsp90/p23/ p50/Bcr-Abl and leads to a proteasome degradation of Bcr-Abl. ALA-PDT induced the phosphorylation of Hsp90 and release of the co-chaperone p23 from Hsp90. This resulted in a dissociation of Hsp90 client proteins and the protein level of oncogene Bcr-Abl decreased in K562 cells by 70 % within three hours after treatment.

Downregulation of Bcr-Abl kinase affected proteins, which are responsible for the cytoskeleton organisation.

Cofilin was dephosphorylated and thus was unable to preserve actin in polymeric state. Also phosphorylation of a cytoskeletal protein Septin-2 was affected. Forty five percent of treated cells possess a damaged cytoskeleton within two hours after ALA-PDT treatment. Practically most of the treated cells (92 %) contained damaged polymeric actin filaments the day after the treatment.

The work was supported by grant NL 7681-3 of Internal Grant Agency, Ministry of Health Czech Republic.

KOORDINAČNÍ VLASTNOSTI DIFOSFINOAZINOVÝCH LIGANDŮ V RHODIOVÝCH KOMPLEXECH

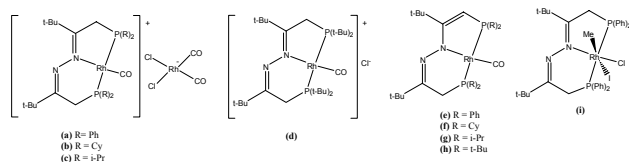
**MARTIN POŠTA^a, PAVEL VOJTÍŠEK^b, JAN SÝKORA^a
a JAN ČERMÁK^a**

^aÚstav chemických procesů, AV ČR, Rozvojová 135, 165 02
Praha 6, ^bKatedra anorganické chemie, Univerzita Karlova,
Hlavova 2030, 128 40 Praha 2

Je známo, že fosfinové bidentátní ligandy, popřípadě terdentátní P, N, P' ligandy velmi často tvoří s přechodnými kovy aktivní komplexy uplatňující se v celé řadě katalytických cyklů.

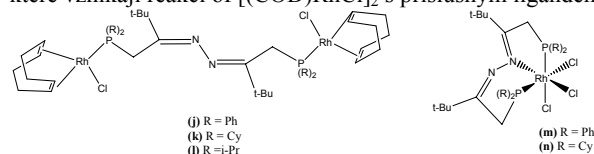
Difosfinoazinové komplexy se kromě celé škály koordinačních módů (P, P' můstkový, P, P' chelatující, P, N, P') vyznačují také zcela novým způsobem tvorby koordinační nenasycenosti popsané Shawem u komplexů iridia, které vznikající rychlou reverzibilní izomerací azinového na en-hydrazonový skelet.

Při studiu difosfinoazinových komplexů Rh(I) a Rh(III) jsme kromě koordinačních vlastností ligandů s odstupňovanou stericitou náročnosti studovali také možnosti tvorby koordinační nenasycenosti Shawova typu u komplexů rhodia. Čtvercově planární komplexy (**a**, **b**, **c**, **d**) byly připraveny reakcí $[\text{Rh}(\text{CO})_2\text{Cl}]_2$ s příslušným ligandem. Působením bazí je možné docílit abstrakce protonu z azinového skeletu za vzniku en-hydrazonového komplexu (**e**, **f**, **g**, **h**), přičemž objemnost fosfinových skupin a charakter protianiontu jsou klíčové pro výběr vhodné báze. Zatímco k deprotonaci terbutylového komplexu postačuje slabá báze, jako například triethylamin, k docílení stejného efektu u zbývajících komplexů je nutno použít MeONa.



Předběžně byly také studovány stechiometrické reakce s potenciálními substráty katalytických reakcí. V rámci tohoto výzkumu byla například pozorována tvorba oktaedrického komplexu trojmočného rhodia (**i**), jakožto produktu oxidativní adice MeI na komplex (**a**).

Druhou skupinou difosfinoazinových komplexů Rh(I) jsou komplexy „můstkové“ s konfigurací ligandu Z,Z (**j**, **k**, **l**), které vznikají reakcí of $[(\text{COD})\text{RhCl}]_2$ s příslušným ligandem.



Tyto můstkové komplexy (**j**, **l**) tvoří stáním v CHCl_3 oktaedrický faciální komplex Rh(III) (**m**), popřípadě zahříváním v témže rozpouštědle vzniká komplex (**n**). Tento typ reakce je velmi zajímavý z hlediska katalytických vlastností, neboť se s největší pravděpodobností generuje CHCl_2^{\cdot} radikál a komplexy (**j**, **l**) tak reagují ve smyslu Kharashovy adice.

Tento projekt byl podporován Grantovou agenturou ČR (grant č. 203/01/0554).

LITERATURA

- Perera S.D., Shaw B.L., Thornton-Pett M.: J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1996, 3111.

ZMĚNA ELEKTROCHEMICKÉHO SIGNÁLU „OCHRÁNCE GENOMU“ V ZÁVISLOSTI NA JEHO STRUKTURNÍ FORMĚ – RYCHLÉ A SENZITIVNÍ ROZLIŠENÍ NATIVNÍ, DENATUROVANÉ A AGREGOVANÉ FORMY p53

**DAVID POTĚŠIL^{a,b}, MICHAL MASAŘÍK^c, BOŘIVOJ
VOJTÍŠEK^d, JITKA PETRLOVÁ^a, VOJTĚCH ADAM^{a,b}
a RENÉ KIZEK^a**

^aÚstav chemie a biochemie, AF MZLU v Brně, Zemědělská 1,
613 00 Brno, ^bKatedra analytické chemie, PřF MU v Brně,
Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^cLaboratoř biofyzikální chemie a
molekulární onkologie, BFÚ AV ČR, Královopolská 135,
612 65 Brno, ^dZákladna experimentální onkologie, MOÚ Brno,
Žlutý kopec 7, Brno 656 53

Protein p53, nazývaný „ochránce genomu“, je transkripční faktor, který je v buňce běžně přítomen v nízkých koncentracích. Při buněčném stresu intracelulární koncentrace p53 vzroste a vznikají tetramerní jednotky p53, které mají vysokou afinitu k DNA. Po vazbě na DNA p53 reguluje transkripci mnoha cílových genů. Mezi nejvýznamnější projevy této interakce patří zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, reparace DNA a spuštění apoptózy. Vazba proteinu p53 na DNA je tedy klíčovým předpokladem funkce proteinu. Přítomnost mutantní formy proteinu p53, stejně tak i strukturně modifikované (např. denaturací nebo agregací) molekuly p53, je v některých případech prokazatelným důvodem vzniku rakovinného bujení. Statisticky uvádějí, že gen kódující protein p53 (TP53) je poškozen bodovou či deleční mutací u více než 50 % nádorových buněk (u rakoviny plic až 70 %). Se strukturální změnou proteinu p53 jsou spojovány například Alzheimerova a Parkinsonova nemoc, cystická fibróza, prionové nemoci a jiné. V této práci byla studována nativní,

denaturovaná a agregovaná forma proteinu p53 pomocí průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ED). V první části byla optimalizována metoda FIA-ED pro stanovení nativní formy proteinu p53. Jako optimální mobilní fáze byl zjištěn fosfátový pufr (1/15 M, pH 7,0) o rychlosti průtoku $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Při optimalizaci elektrochemického stanovení byla na základě hydrodynamického voltamperogramu vybrána jako nevhodnější hodnota potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu 900 mV. Optimalizovaná metoda poskytovala lineární ($R_2 = 0,9998$) elektrochemickou odpověď v závislosti na koncentraci proteinu p53. Vypočtený limit detekce ($3 \times S/N$) byl 45,8 amol proteinu p53 na nástřik 5 μl . Technika FIA-ED byla dále aplikována na studium a rozlišení strukturálních změn proteinu p53 (vznik denaturované a agregované formy). Bylo zjištěno, že denaturovaná forma poskytuje přibližně $3 \times$ vyšší proudovou odezvu oproti formě nativní (rozvolnění struktury proteinu, přístup větší části elektroaktivních center proteinu – aminokyselinových zbytků k povrchu elektrody). U agregované formy byl naopak zjištěn pokles proudového signálu (sterické bránění elektroaktivních skupin proteinu). Zjištěná fakta ukazují, že jsme schopni velmi senzitivně stanovit a rozlišit nativní, denaturovanou a agregovanou formu proteinu p53 v attomolárních hladinách pomocí optimalizované FIA-ED techniky.

Příspěvek vznikl za podpory RASO 2005, GAČR 525/04/P132 a IGA MZLU 2005.

LITERATURA

1. Fei P., El-Deiry W. S.: *Oncogene* 22, 5774 (2003).
2. Elledge R. M., Lee W. H.: *BioEssays* 17, 923 (1995).
3. Potěšil D., Petřlová J., Vacek J., Brázdová M., Zelená J., Lubal P., Kizek R.: VIII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů 2004, 65.
5. Brázda V., Paleček E.: *Biol. Listy* 64, 161 (1999).
6. Bullock A. N., Henckel J., DeDecker B. S., Johnson C. M., Nikolova P. V., Proctor M. R., Lane D. P., Fersht A. R.: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94.
7. Lane D. P.: *Nature* 385, 15 (1992).

REKURENTNÍ MUTACE V ADAMTS13 JE PŘÍČINOU VROZENÉ FORMY TROMBOTICKÉ TROMBOCYTOPENICKÉ PURPURY V ČESKÉ REPUBLICE

ŠIMON RITTIČH, PAVEL JINOCH, JIŘÍ SUTTNAR, PETER SALAJ a INGRID HRACHOVINOVÁ

*Ústav hematologie a krevní transfúze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2
rittich@uhkt.cz*

Trombotická trombocytopenická purpura (TTP) je letální onemocnění, které je charakterizováno získanou trombocytopenií, mikroangiopatickou hemolýzou, neurologickou poruchou, případně renální dysfunkcí¹. Nedávno bylo zjištěno², že TTP je pravděpodobně způsobeno hlubokým funkčním defektem metaloproteinázy ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin 1

like elements). Proteináza specificky štěpí velmi velké ($> 20 \times 10^3$ kDa) silně adhezivní multimery von Willebrandova faktoru (vWF) na menší. V případě, že je ADAMTS13 nefunkční, velmi velké multimery se uvolňují do krve a za smykového tření se aktivně vážou na krevní destičky. Vzniklé mikrotromby se zachytávají v mikrocirkulaci a mohou způsobit těžké multiorgánové selhání, které je typické pro TTP. Podobné projevy jako TTP mají i jiná onemocnění, proto je správná diagnóza nezbytná pro léčbu, která snižuje riziko úmrtí z 90 % na 10 %. Funkční defekt ADAMTS13 může být vrozený nebo získaný, způsobený protilátkami proti proteináze. Vrozená forma TTP je vzácná a je autosomálně recesivní.

Cílem naší studie bylo zavést metodiku na stanovení vrozené i získané formy TTP. V letech 2003-2004 jsme v naší laboratoři vyšetřili 50 pacientů s podezřením na TTP. Aktivitu ADAMTS13 jsme měřili modifikovanou metodou podle Furlana³. Těžký defekt ADAMTS13 jsme zjistily u 29 pacientů (58 %). U 16 z nich jsme detekovali protilátky proti ADAMTS13, které zapříčinily získanou formu TTP. U 9 pacientů z 10 s vrozenou formou TTP mohla být provedena analýza genu. Přímou sekvenací 29 exonů genu jsme našli u osmi z nich (89 %) inzertní mutaci 4143A (u čtyř pacientů v homozygotní formě) a u dalších tří pacientů mutaci Arg507Gln. Na základě expresních studií bylo prokázáno, že obě mutace jsou kauzální. Rekurence mutace 4143A u šesti nepříbuzných rodin je nezvykle vysoká. Toto zjištění představuje výhodu pro diferenciální diagnostiku dětí se suspektním vrozeným TTP, který má často netypický průběh. Rychlé nalezení kauzální mutace je potom důležitou součástí diagnózy. Možný „founder“ efekt této mutace je předmětem dalšího zkoumání.

LITERATURA

1. Moschowitz E.: *Proceedings of the New York Pathological Society* 24, 21 (1924).
2. Levy G.G., Nichols W.C., Lian E.C., Foroud T., McClintick J.N., McGee B.M., Yang A.Y., Siemieniak D.R., Stark K.R., Gruppo R., Sarode R., Shurin S.B., Chandrasekaran V., Stabler S.P., Sabio H., Bouhassira E.E., Upshaw J.D., Ginsburg D., Tsai H.M.: *Nature* 413, 488 (2001).
3. Furlan M., Robles R., Lammle B.: *Blood* 87, 4223 (1996).

DERIVÁTY TRIPTYCENU: KARBOXYLOVÉ KYSELINY A JEJICH AMIDY

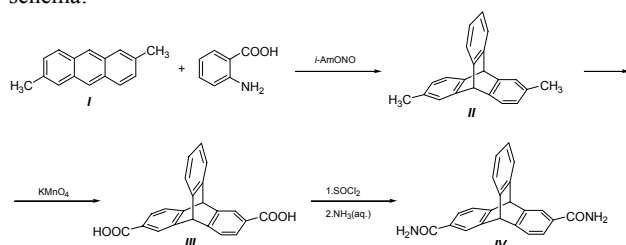
MARKÉTA RYBÁČKOVÁ^a, MARTIN BĚLOHRADSKÝ^a, PETR HOLÝ^a, JIŘÍ ZÁVADA^a a IVANA CÍSAŘOVÁ^b

*^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^bKatedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta UK, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
rybama@uochb.cas.cz*

Oligokarboxylové kyseliny s triptycenovým skeletem a z nich odvozené amidy jsou zajímavými stavebními prvky

při studiu vodíkovými vazbami řízené supramolekulární výstavby porézních struktur.

Syntéza triptycenyových karboxylových kyselin je založena na Dielsově-Alderově adici benzynu, generovaného z diazotované kyseliny antranilové¹, na methyl-substituované deriváty antracenu. Příklad této syntézy znázorňuje následující schéma:



Rentgenostrukturní analýza monokrystalu racemické dikarboxylové kyseliny **III** potvrdila předpokládanou asociaci molekul prostřednictvím dvojíhých vodíkových mostů mezi karboxylovými skupinami. Molekuly jsou tak v krystalu uspořádány do lineárních řetězců, ve kterých se pravidelně střídají oba enantiomery.

Výzkumný program dále pokračuje snahou o optické štěpení racemické kyseliny **III** a o získání monokrystalu racemické i enantiomerně homogenní formy diamidu **IV**.

Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (203/03/0087).

LITERATURA

1. Friedman L., Logullo F.M.: J. Org. Chem. 34, 3089 (1969).

IDENTIFICATION OF GENOTOXICITY OF *o*-ANISIDINE AND *o*-NITROANISOLE AND THEIR CARCINOGENIC POTENTIAL FOR HUMANS

HELENA RÝDLOVÁ, MARKÉTA MIKŠANOVÁ, and MARIE STIBOROVÁ

*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2
helili@centrum.cz*

2-Methoxyaniline (*o*-anisidine) and 2-methoxynitrobenzene (*o*-nitroanisole) are important pollutants and potent carcinogens for rodents. Using ³²P postlabeling and ¹⁴C- and ³H-labeled *o*-anisidine and *o*-nitroanisole, respectively, we show that both carcinogens bind covalently to DNA in vitro and in vivo. DNA samples from various organs of Wistar rats, i.p. treated with *o*-anisidine and *o*-nitroanisole, were analyzed by ³²P-postlabeling. Two DNA adducts, identical to those found in vitro, were detected in urinary bladder, the target organ. These adducts were identified to be deoxyguanosine adducts derived from *o*-anisidine oxidative and *o*-nitroanisole reduction metabolite *N*-(2-methoxyphenyl)hydroxylamine. Formation of DNA adducts, identical with those formed in rat in vivo, during the *o*-anisidine oxidation and *o*-nitroanisole reduction by human hepatic microsomal and cytosolic samples, respectively, indicates a potential of human hepatic

enzymes to activate these carcinogens in human. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and human xanthine oxidase are responsible for the reductive and oxidative activation of *o*-nitroanisole and *o*-anisidine, respectively. The role of specific cytochrome P450 enzymes in the human hepatic microsomal metabolism of *o*-anisidine was investigated. We attribute most of *o*-anisidine oxidation in human microsomes to CYP2E1. Nevertheless, the participation of CYP1A, 2B6 and 2A6 in its activation cannot be excluded. Utilizing Western blotting and consecutive immunoquantification employing chicken polyclonal antibodies raised against various CYPs, the expression of CYP1A1/2 was found to be strongly induced in rats treated with both compounds. Furthermore, 7-ethoxyresorufin *O*-deethylation activity, corresponding to both CYP1A1 and 1A2, was significantly increased in rats pre-treated with both carcinogens.

The results of our study, the report on the potential of the human microsomal and cytosolic enzymes to contribute to the activation of *o*-anisidine and *o*-nitroanisole, strongly suggest a carcinogenic potential of these rodent carcinogens for humans.

Supported by Grant Agency of the Czech Republic (grant 203/03/0283).

LASEROVÉ ABLAČNÍ SYNTÉZY S HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKOU DETEKCÍ: CESTA K TVORBĚ A IDENTIFIKACI NOVÝCH SLOUČENIN

ONDREJ ŠEDO

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta
Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno
sedo@post.cz*

Jedním ze současných trendů anorganické syntézy je kombinace klasických postupů s instrumentálními technikami, ovlivňujícími průběh chemických reakcí například působením ultrazvuku, mikrovln, plazmatu nebo laseru. V této práci byly vyvinuty postupy laserové ablační syntézy spojené se současnou desorpční a ionizací, díky nimž je možné vzniklé sloučeniny identifikovat hmotnostní spektrometrií (instrumentace MALDI-TOF MS). Jako výchozí látky byly využity prvky (S, Se, Te, P, C-grafit, diamant), jednoduché sloučeniny (P₄S₃, P₄S₁₀, SeS₂), či směsi prvků nebo prvků se sloučeninami. Na základě modelování izotopových vzorů bylo v hmotnostních spektrech identifikováno téměř 200 sloučenin doposud nepopsaných v literatuře, jako například 68 nových sulfidů fosforu. Vyššího počtu generovaných sloučenin bylo dosaženo spojením laserové ablace s ultrazvukem. Struktura generovaných sloučenin byla studována sledováním rozpadu za iontovým zdrojem (PSD Post-source Decay). Pro syntézy z prekurzorů ve formě agresivních látek byla vyvinuta technologie grafitových mikrokcelímků umístěných přímo v iontovém zdroji.

Metodologie se ukazuje být vysoce perspektivním postupem pro syntézu celé řady nových a neobvyklých sloučenin, závěry dosavadních studií přispívají i k pochopení některých technologických a analytických postupů.

DIASTEREOSELECTIVE SYNTHESIS OF [11]HELICENE-LIKE MOLECULES VIA MULTIPLE [2+2+2] CYCLOISOMERIZATION

PETR SEHNAL, IRENA G. STARÁ, ZUZANA ALEXANDROVÁ, IVO STARÝ, and DAVID ŠAMAN

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

Molecules possessing helical chirality are being extensively studied because of their proposed applications in catalysis, molecular electronics and material science¹. Very recently, we have developed a novel approach to higher and extended helical scaffolds utilizing multiple CoI-catalyzed [2+2+2] cycloisomerization of aromatic molecules containing six acetylene units. We have also devised a diastereoselective fashion² of the reaction using a centrally chiral hexayne.

The synthesis starts from the known diester **1** that is converted to the tetrayne building block **2** within 5 steps. The Sonogashira coupling of **2** with iodide **3** followed by desilylation gives the key hexayne **4**. The key double [2+2+2] cycloisomerization proceeds under CpCo(CO)₂ catalysis and provides the desired [11]helicene-like compound **5**. The proposed geometry of **5** is shown in Figure 1 (hydrogen atoms are omitted for clarity).

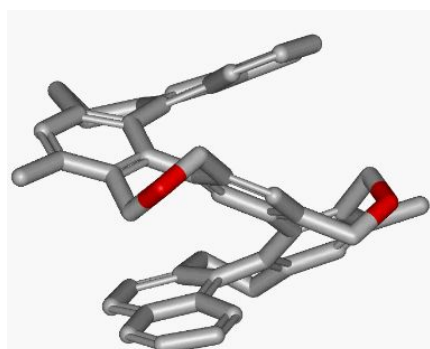
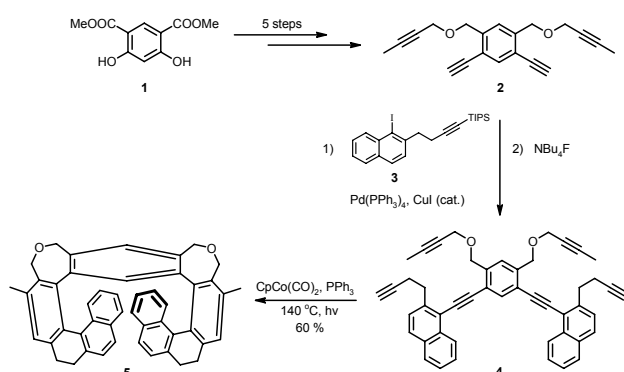


Fig. 1. Proposed geometry of **5**

Supported by the GACR (Reg. No. 203/02/0248) and the IOCB ASCR (Research Project No. Z4 055 905).

REFERENCES

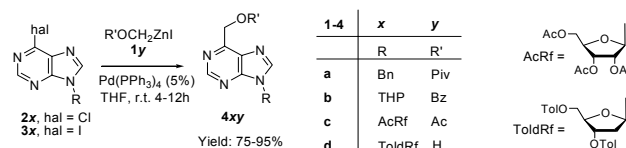
- Urbano A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3986 (2003).
- Stará I.G., Alexandrová Z., Teplý F., Sehnal P., Starý I., Šaman D., Buděšinský M., Cvačka J.: *Org. Lett.* 7, in press (2005).

SYNTÉZA 6-(HYDROXYMETYL)PURÍNŮV POMOCOUP Pd-KATALYZOVANÝCH CROSS-COUPLING REAKCÍ

PETER ŠILHÁR a MICHAL HOCEK

*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, Praha 6, 16610
silhar@uochb.cas.cz*

6-(Hydroxymetyl)purín možno vďaka jeho štruktúre považovať za homológ hypoxantínu a ako jeden z potenciálnych inhibítorov adenosín deaminázy¹. Je známe, že 6-hydroxymetyl-9-(β-D-ribofuranosyl)purín, izolovaný z peniazovky škvrnatej (*Collybia maculata*), má antifungálne, cytotoxické a antivirálné (vesicular stomatitis virus) vlastnosti².



Na základe týchto skutočností sme sa snažili vyvinúť novú, lepšiu metodiku na prípravu (hydroxymetyl)purínov. Je všeobecne známe, že prechodným kovom katalyzované cross-coupling reakcie predstavujú veľmi efektívnu techniku na prípravu rôzne substituovaných aromatických, resp. heteroaromatických zlúčenín. Uspeli sme použitím acyloxymetylzink iodidov (**1y**) v Negishiho Pd-katalyzovaných cross-coupling reakciách s príslušnými 6-halogenpurínmi (**2x**, **3x**). Spomenuté reakcie prebiehali hladko pri laboratórnej teplote za vzniku 6-(acyloxymetyl)purínov (**4xy**) vo veľmi dobrých výťažkoch. Acylové chrániace skupiny je možné odštiepiť katalytickým pôsobením metanolátu sodného v metanole za vzniku žiadaných 6-(hydroxymetyl)purínov. Voľnú modifikovanú purínovú bázu sme pripravili kyslo-katalyzovanou deprotekciovou THP chrániacej skupiny. Pripravený 6-(hydroxymetyl)-9-(β-D-ribofuranosyl)purín vykazuje vysokú cytostatickú aktivitu (IC₅₀=10 nM) a značný inhibičný efekt voči adenosín deamináze.

Touto novou technikou³ je možné pripraviť 6-(hydroxymetyl)purínové bázy, resp. nukleozidy v dvoch krokoch s celkovým výťažkom 75-87 %. Z doterajšieho výskumu regiosektivity týchto reakcií s 2,6-dichlorpurínmi je zrejme, že 6-(hydroxymetyl)-2-chlorpurín je možné pripraviť vo veľmi dobrom výťažku s regiosektivitou rádovo 95/5 – monosubstituovaný/disubstituovaný produkt, čím sa otvára cesta prípravy 2,6-disubstituovaných purínov s rozdielnymi substituentami. Ďalšie funkčné transformácie hydroxylovej

skupiny, ako napríklad halogenácie, oxidácie a na ne nadväzujúce reakcie sú predmetom nášho súčasného výskumu, ktorého výsledky budú tiež prezentované.

Táto práca je časťou výskumného projektu Z4 055 0506, ktorý bol podporovaný GA ČR (čís. grantu 203/03/0035) a firmou Sumitomo Chemical, Co. (Osaka, Japan). Autori ďakujú Dr. Votrubovi za testovanie zlučenin na cytostatickú aktivitu a inhibíciu adenosín deaminázy a Dr. Pohlovi za NMR spektra.

LITERATURA

1. Erion M.D., Reddy M.R.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 3295 (1998).
2. Leonhardt K., Anke T., Hillen-Maske E., Steglich W.Z.: *Naturforsch.* 42c, 420 (1987).
3. Šilhár P., Pohl R., Votruba I., Hocek M.: *Org. Lett.* 6, 3225 (2004).

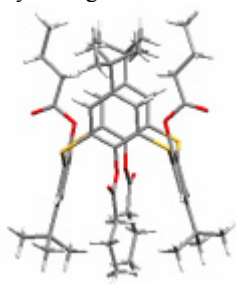
STUDIUM ACYLACE SPODNÍHO OKRAJE THIALIX[4]ARENŮ

MARKÉTA ŠIMÁNOVÁ, PAVEL LHOTÁK, IVAN STIBOR, HANA DVOŘÁKOVÁ a MICHAELA POJAROVÁ

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

Tato práce je součástí systematického studia reaktivity thiacalix[4]arenů a zabývá se studiem acylací spodního okraje thiacalix[4]arenů.

Acylační reakce byly prováděny s anhydridy nebo chloridy jednoduchých alifatických nebo aromatických organických kyselin v přítomnosti AlCl_3 nebo triethylaminu a za katalýzy DMAP. Pro porovnání vlivu objemné *tert*-butylové skupiny na horním okraji thiacalixarenu z hlediska preferenci konformerů byly jako substráty použity 5,11,17,23-tetra-*tert*-butyl-25,26,27,28-tetrahydroxythiacalix[4]aren a jeho *de-tert*-butylovaný analog.



Acylace za výše uvedených podmínek vedly převážně ke vzniku di- a tetraacylovaných thiacalix[4]arenů v různých konformacích (cone, 1,3-alternate), které byly identifikovány pomocí ^1H NMR spektroskopie. Konformace některých připravených derivátů byla také potvrzena v pevném stavu pomocí rentgenostrukturní analýzy.

Experimentální výsledky potvrdily efektivnost DMAP jako katalyzátoru pro acylace spodního okraje thiacalix[4]arenů.

LITERATURA

1. Lhoták P.: *Eur. J. Org. Chem.* 8, 1675 (2004).
2. Gutsche C. D.: *Calixarenes, Monographs in Supramolecular Chemistry*, Vol. 1, (Stoddart J. F., ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989.
3. Gutsche C. D.: *Calixarenes Revisited, Monographs in Supramolecular Chemistry* (Stoddart J. F., ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998.
4. Kumar S., Chabla H. M., Varadarajan R.: *Tetrahedron Lett.* 43, 2495 (2002).

CHARACTERISATION OF MOLECULARLY IMPRINTED MONOLITHIC COLUMNS

JAKUB ŠIRC^{a,b}, Z. BOSÁKOVÁ^a, and J. MICHÁLEK^b

^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Albertov 2030, 128 40 Prague 2, ^bInstitute of Macromolecular Chemistry, AS CR, Heyrovsky sq. 2, 162 06 Prague 6

Molecularly imprinted polymers have received much attention in various fields because of their high selectivity for target molecules. It has been recognized as a promising technique, where the molecule to be detected is added to a reaction mixture of a cross-linker, a solvent, an initiator and a functional monomer that possesses a functional groups capable of interacting with the target molecule. Binding sites in the resultant polymers involve functional groups, which are constructed according to the shape and chemical properties of the target molecules. After removal of the target molecules, these specific binding sites exhibit high selectivity and affinity for the template molecules.

Monolithic HPLC stationary phases based on molecular imprinting were prepared by *in situ* polymerization. The template compound (L-tosylphenylalanine), the functional monomer (methacrylic acid), the cross-linker (ethylene glycol dimethacrylate), the initiator (azobisisobutyronitrile or hydroxydimethylacetophenone) and a porogen mixture (dodecanol with cyclohexanol or toluene) were placed in glass columns (150 × 3 mm i.d.) and heated or irradiated to induce polymerization.

Newly prepared monolithic columns were tested on HPLC separations of enantiomer pairs of derivatized amino acids and a standard mixture of hydrophobic solutes. The structure of the monoliths was investigated by scanning electron microscopy and nitrogen/mercury porosimetry. The dependences of the polymer morphology and the chromatographic behavior on the composition of the polymerization mixture and on the polymerization conditions were also investigated.

We would like to thank the Ministry of Education, Youth and Physical Training of the Czech Republic, Grant No. 908/2005 and Academy of Sciences of the Czech Republic, project AVOZ 40500505 for financial support.

MODIFIKACE ORGANOKŘEMIČITÝCH KONSOLIDANTŮ KAMENE

MARKÉTA ŠKRDLANTOVÁ a PETR KOTLÍK

*Ústav chemické technologie restaurování památek, VŠCHT
Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
marketa.skrdlantova@vscht.cz*

Organokřemičité sloučeniny patří v současné době mezi hojně používané konsolidanty pro kámen, historické omítky památkových objektů atd. Konečným produktem jejich vytvrzování je prostorová polymerní síť (gel), tvořená především atomy křemíku a kyslíku. Samotné čtyřfunkční monomery (tetraalkoxysilany) tvoří při polymeraci pevnou polymerní síť s krátkými vzdálenostmi mezi jednotlivými uzly. Tato síť je dosti křehká.

Proto se objevují snahy modifikovat výchozí látky tak, aby vznikl méně křehký, elastičtější gel. Výhodnějších mechanických vlastností – nižší křehkosti a větší houževnatosti gelu – je obecně možno docílit prodloužením meziuzlových vzdáleností v síti. Jednou z možností, jak naměkčení polymerní sítě dosáhnout, je prodloužení úseků mezi uzly sítě zabudováním dvoufunkčních, popřípadě trojfunkčních monomerních esterů. Tuto možnost studuje tato práce.

K modifikaci základní sítě tetraethoxysilanu (TEOS) byly použity dva monomery – dimethyldiethoxysilan (DMDEOS) a methyltriethoxysilan (MTEOS). Při přípravě konsolidačních směsí byly použity dva základní typy katalýzy – kyselá katalýza kyselinou chlorovodíkovou nebo neutrální katalýza organokovovým katalyzátorem (dibutyl-bis-[1-oxo-(dodecyl)oxy]stannan, zkráceně dibutylcindilaurát – DBCDL).

Pozorovat změnu vlastností polymerní sítě přímo v kameni lze vzhledem k nehomogenitě přírodní horniny jen velmi obtížně. Proto bylo pozorováno chování organokřemičitých esterů (konsolidačních směsí) mimo přírodní materiál – na modelových směsích umělého kamene.

V těchto směsích jako pojivo byly použity modifikované konsolidační směsi, jako plnivo byla použita směs středně umletého křemene a písku. U modelových směsí byly sledovány některé fyzikálně mechanické vlastnosti (pevnost v tahu za ohybu, pevnost v tlaku, modul pružnosti v tlaku, nasákavost vodou po 48 hodinách a odolnost krystalizaci solí). Struktura modelových směsí umělého kamene byla sledována NMR spektroskopii.

Množství a funkčnost modifikátoru a typ katalyzátoru v pojivu mají značný vliv na mechanické vlastnosti modelových směsí umělého kamene. Modifikací TEOS dvoj- a trojfunkčním alkylalkoxysilanem se mění charakter vzniklého polymerního produktu, dochází ke snížení hustoty polymerní sítě a tím ke snížením hodnot modulů pružnosti a změně pevností v tahu za ohybu a v tlaku. Obecně je v případě kyselá katalýzy dosahováno vyšších pevností než v případě neutrální katalýzy.

CHIRAL BAEYER-VILLIGER OXIDATION OF FUNCTIONALIZED CYCLOHEXANONES

**RADKA ŠNAJDROVÁ, M.D. MIHOVILOVIC*,
and A. ČEJKOVÁ**

*Laboratory of Applied Biology and Bioengineering, Institute of
Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6,
*Institute of Applied Synthetic Chemistry, Vienna University of
Technology, Vienna, Austria
snajdror@yahoo.com*

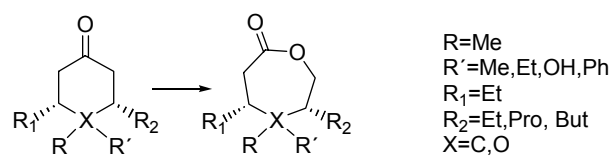
Enzyme mediated Baeyer-Villiger oxidations offer an efficient and highly selective access to chiral lactones as a building blocks of a variety of natural products and bioactive compounds.

With recent progress in genomics, a large variety of flavin dependent monooxygenases, which catalyse this biotransformations, is becoming available. These enzymes exhibit different substrate specificity and enantioselectivity. This is a prerequisite for the development of a toolbox of catalytic entities, which will be available to synthetic chemists to solve their specific problems.

In order to simplify possible applications by preparative chemists, we utilize recombinant whole-cell systems, which produce the required enzyme in substantial quantities and also carry out recycling of all required cofactors.

We synthesised various cyclohexanones bearing different functional groups. Such precursors were used for subsequent microbial Baeyer-Villiger reactions (Scheme 1). Substrate profiling involved some of 10 different expression systems for Baeyer-Villigerases from various natural sources.

Substrate profiling using a set of representative precursors is currently the only way to gain insight into geometry of the active sites of such monooxygenases, since no crystallographic data is available, yet. Chemometric analysis of substrate acceptance and enantioselectivity of the biotransformation can deliver a “super-substrate” model for the monooxygenases.



Scheme 1

This project is supported by FWF (Austrian Science Fund, Project No I19-B10).

LASEROVÁ ABLAČNÍ SYNTÉZA S HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKOU DETEKČÍ PRO GENEROVÁNÍ A SOUČASNOU ANALÝZU NOVÝCH LÁTEK; JE EXISTENCE FULLERENOVÝCH KLASTRŮ ARSENU REÁLNÁ?

ZBYNĚK ŠPALT

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta
Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno
spalt@mail.muni.cz

Laserová ablační syntéza (LA-TOF-MS) je rychlá a citlivá metoda využívající desorpci a ionizaci vzorku spojenou s detekcí vzniklých species hmotnostní spektrometrií vhodná zejména k identifikaci stopových nečistot v pevných vzorcích anorganického původu. V této práci byla studována možnost tvorby arsenových analogů fullerenu a LA-syntézy nových As sulfidů. Laserovou ablací kovového As (čistota 99.997 %) byly generovány klastry As_n ($n = 2-7$), tvorba klastrů As_n ($n = 20, 60$) fullerenového typu předpokládána kvantově-chemickými výpočty nebyla za daných experimentálních podmínek potvrzena. V další části práce byly jako prekursory pro laserovou ablační syntézu použity sulfidy arsenu As_2S_2 , As_2S_3 , As_2S_5 a jejich směsi se sírou. Bylo generováno velké množství různých sulfidů arsenu (AsS , AsS_3 , As_2S , As_2S_2 , As_2S_3 , As_2S_5 , As_2S_7 , As_3S , As_3S_4 , As_4S_3 , As_4S_4), jejichž stechiometrické složení bylo určeno na základě izotopového modelování. Vůbec poprvé bylo popsáno následujících třináct zcela nových sulfidů arsenu: AsS_2 , AsS_4 , AsS_5 , AsS_6 , AsS_7 , AsS_8 , As_2S_4 , As_2S_6 , As_3S_2 , As_3S_3 , As_3S_5 , As_3S_6 , As_3S_7 . Laserová ablace se ukázala jako vhodná metodika pro syntézu nových látek.

CYTOKININOVÉ RECEPTORY *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 A AHK3; OD LIGANDOVÉ SPECIFITY K VÝVOJI SPECIFICKÉHO INHIBITORU

LUKÁŠ SPÍCHAL a MIROSLAV STRNAD

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky,
Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc
spichy@post.cz

Cytokinininy jsou rostlinné hormony ovlivňující základní procesy růstu a vývoje rostlin. K porozumění jejich molekulárního mechanismu účinku, jako signálních molekul, výrazně přispěla až identifikace genů kódujících specifické membránové receptory v *A. thaliana*^{1,2}.

K molekulární charakterizaci cytokininových receptorů *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 a AHK3 byl využit Δ rcs a cps::lacZ mutantní bakteriální kmen *E. coli* exprimující tyto receptory. Oba receptory jsou citlivější k bazím isoprenoidních cytokininů, méně k aromatickým cytokininům. CRE1/AHK4 receptor je vysoce specifický a je citlivý pouze k bazím isoprenoidních cytokininů. AHK3 receptor navíc rozpoznává cis-zeatin, považovaný za neaktivní isomer, a také ribosidy isoprenoidních cytokininů. Rozdíly ve specifitě a citlivosti obou receptorů mohou mít souvislost s jejich rozdílným

výskytem v rostlinných orgánech. V biotestu s ARR5::GUS semenáčky *A. thaliana* byly aktivní i ostatní formy cytokininů. Vysvětlením může být metabolická aktivita, které podléhají cytokinininy v rostlinném organismu³.

Některé pyrolo- a pyrazolo-pyrimidiny byly na základě jejich antagonistického účinku a strukturní podobnosti s cytokinininy klasifikovány jako specifické anticytokinininy s účinkem na receptorové úrovni⁴. Tyto látky však nekompetují s radioaktivně značeným cytokininem na CRE1/AHK4 a AHK3 receptoru, ale působí jako inhibitory cyklin-dependentních kinas. Systematické testování látek odvozených od cytokininů v bakteriálním receptorovém testu a na izolovaných membránách obsahujících cytokininové receptory vedlo k objevu prvního specifického inhibitoru cytokininových receptorů⁵. Látka PI-55 je pro svůj antagonistický účinek v současné době dále zkoumána v naší laboratoři.

LITERATURA

- Inoue T., Higushi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T.: *Nature* 409, 1060 (2001).
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T.: *Plant Cell Physiol.* 42, 107 (2001).
- Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Strnad M., Romanov G.A., Schmölling T.: *Plant Cell Physiol.* 45, 1299 (2004).
- Iwamura H., v knize: *Cytokininins. Chemistry, Activity and Function* (Mok D.W.S., Mok M.C., ed.), str. 45. CRC Press, Boca Raton, 1994.
- Spíchal L., Kryštof V., Lenobel R., Popa I., Stýskala J., Binarová P., Cenklová V., Kontopidis G., Fischer P.M., Schmölling T., Strnad M.: *Nat. Cell Biol.*, odesláno.

FLUOROVANÉ SILYL CYKLOPENTADIENYLOVÉ KOMPLEXY – POTENCIÁLNÍ KATALYZÁTORY PRO FLUOROVOU DVOUFÁZOVOU KATALÝZU

LUCIE ŠTASTNÁ^a, JAN SÝKORA^a, IVANA ČÍSAŘOVÁ^b a JAN ČERMÁK^a

^aÚstav chemických procesů AV ČR, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, ^bKatedra anorganické chemie PŘF UK, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
stastna@icpf.cas.cz

Fluorová dvoufázová katalýza využívá výhod homogenní a heterogenní katalýzy, při reakci je katalyzátor homogenní a při separaci je specificky rozpustný ve fluorové fázi, zatím co produkty jsou v organické fázi.

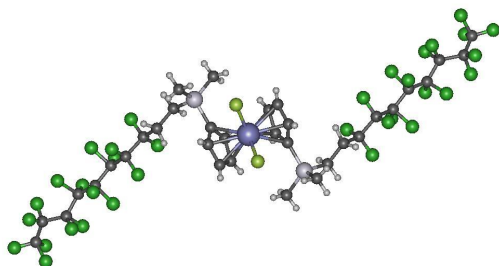
Cyklopentadienylové komplexy našly široké uplatnění v homogenní katalýze, avšak v literatuře je jen několik zmínek o jejich modifikaci pro fluorovou dvoufázovou katalýzu¹⁻⁴.

Podávalo se připravit 8 různě substituovaných cyklopentadienů. Elektron-odtahující vlastnosti perfluorovaného ohonu u takto připravených prekursorů ligandů jsou odstíněny nefluorovanou mezerou – dimethylsilylethan-dylovou skupinou. Bylo pozorováno silné fluxionální NMR chování jak v ¹H tak ¹³C spektrech. Fluorofilní vlastnosti

některých připravených cyklopentadienů byly porovnány s fluorovanými cyklopentadieny známými z literatury^{2,3}.

Cyklopentadienové ligandy prekurzorů byly použity k přípravě titaničitých komplexů s jedním nebo dvěma cyklopentadienylovými kruhy⁵. Byly stanoveny jejich rozdělovací koeficienty pro fluorový dvoufázový systém. Podařilo se i připravit rhodný komplex, který byl bohužel znečištěn neznámou látkou.

Všechny připravené látky byly identifikovány NMR spektroskopii a jeden dichlorotitanocen byl získán v krystalické formě a tudíž byla určena jeho struktura viz. obr.1. Kvůli přehlednosti jsou zobrazeny pouze ty fluorové atomy, které mají v neuspořádaném fluorovaném řetězci největší obsazovací faktory.



Obr. 1: Projekce krystalové struktury bis(perfluoroktyl)-ethylsilylcyklopentadienyldichloro titaničitého komplexu

Nefluorovaná dimethylsilylethandiylová skupina zvýšila fluorofilitu cyklopentadienů. Připravené fluorované dichlorotitanoceny budou dále testovány jako prekursory katalyzátorů pro hydrogenační reakce.

Tento projekt byl podporován Grantovou agenturou ČR (IAA 4072203).

LITERATURA

- Hughes R.P., Le Husebo T.: *Organometallics* 16, 5 (1997).
- Čermák J., Auerová K., Nguyen H.T.T., Blechta V., Vojtíšek P., Kvičala J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 66, 382 (2001).
- Kvičala J., Bříza T., Paleta O., Auerová K., Čermák J.: *Tetrahedron* 58, 3847 (2002).
- Dinh L.V., Gladysz J.A.: *Chem. Commun.* 8, 998 (2004).
- Čermák J., Šťastná L., Sýkora J., Císařová I., Kvičala J.: *Organometallics* 23, 2850 (2004).

ROLE *Ato* TRANSPORTÉRŮ V AMONIAKOVÉ SIGNALIZACI *S. cerevisiae*

DITA STRACHOTOVÁ, LIBUŠE VÁCHOVÁ a ZDENA PALKOVÁ

Mikrobiologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4-Krč

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, na pevném podkladu jsou ale schopny vytvářet organizované

struktury, kolonie. Kolonie jsou specifické pro daný druh a kmen a v jistých ohledech mohou připomínat mnohobuněčné organismy.

Při sledování vývoje kvasinkových kolonií v čase bylo zjištěno, že kolonie periodicky mění pH svého okolí z acidického na alkalické a naopak. Pro acidickou fázi je typický růst kolonií, zatímco v alkalické fázi je růst přechodně inhibován. Přepnutí z acidické do alkalické fáze je spojeno s produkcí amoniaku, který funguje jako signál mezi sousedními koloniemi a který ovlivňuje periodicitu přepínání. Jedním z důsledků amoniakové signalizace je inhibice růstu kolonie na straně přivrácené ke koloniím sousedním a její expanze do volného prostoru. Celkový počet přepnutí závisí na množství živin a prostoru, který je k dispozici¹. Přepínání vývojových fází a produkce amoniaku jsou známy nejen u *Saccharomyces cerevisiae*, ale i u dalších druhů kvasinek, jako jsou například *Candida mogii* nebo *Rhodotorula glutinis*². Studium dlouhodobého vývoje kvasinkových kolonií by mohlo pomoci pochopit způsob přežívání mikroorganismů v přirozených podmínkách.

V důsledku přijetí amoniakového signálu dochází v buňkách kolonie k mnoha změnám v expresi proteinů. Tyto změny byly u *S. cerevisiae* zjišťovány sledováním transkriptomových změn metodou DNA čipů. Data z analýz využívajících DNA čipy a další experimentální data získaná v naší laboratoři nasvědčují, že za produkci amoniaku do okolí by mohly být zodpovědné tři homologní proteiny kódované geny *ATO1* (*YNR010c*, *ADY2*), *ATO2* (*YNR002c*, *FUN34*) a *ATO3* (*YDR384c*)³. Ve své práci jsem se zaměřila na změny produkci a lokalizace uvedených proteinů na pevném médiu, ve statických a aerobně kultivovaných kulturách.

Práce je podporována z grantů GA ČR: 204-05-0294 a GAČR: 204-03-H066.

LITERATURA

- Palkova Z., Janderova B., Gabriel J., Zikanova B., Pospisek M., Forstova J.: *Nature* 390, 532 (1997).
- Palková Z., Forstová J.: *J. Cell. Sci.* 113, 1923 (2000).
- Palkova Z., Devaux F., Ricicova M., Minarikova L., Le Crom S., Jacq C.: *Mol. Biol. Cell* 13, 3901 (2002).

RESTRIKČNÍ MAPOVÁNÍ GENOMŮ BLÍZCE PŘÍBUZNÝCH SPIROCHET RODU *TREPONEMA*

MICHAL STROUHAL a DAVID ŠMAJS

Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Tomešova 12, Brno 602 00
strouhal@med.muni.cz, dsmajs@med.muni.cz

Provedli jsme restriční mapování genomů pěti příbuzných treponemálních kmenů zahrnující *T. pallidum* subsp. *pallidum* Nichols, *T. pallidum* subsp. *pallidum* SS14, *T. pallidum* subsp. *pertenue* Samoan D, *T. pallidum* subsp. *pertenue* Gauthier a *T. paraluisancuniculi*. *T. pallidum* subsp. *pallidum* je etiologickým agens sexuálně přenosné syfilis a je obligátním patogenem člověka, *T. pallidum* subsp. *pertenue* vyvolává endemické nevenerické treponemální infekce

tropických a subtropických oblastí, *T. paraluiscuniculi* způsobuje venerické onemocnění králíků a není infekční pro člověka. Lze předpokládat, že různá míra invazivity a patogenity těchto spirochet se bude odrážet v rozdílech jejich genomů. Genom *T. pallidum* subsp. *pallidum* Nichols, kompletně sekvenovaný r. 1998, byl rozdělen do 87 vzájemně se překrývajících oblastí (TPI intervaly) a pro každou oblast byla navržena kombinace příslušných primerů. Každý z těchto intervalů byl pomocí XL PCR amplifikován u všech studovaných kmenů a získané PCR produkty byly štěpeny restriktčními enzymy *Bam*H I, *Eco*R I a *Hind* III. Takto získaný restriktční profil byl použit k determinaci heterologních úseků DNA jednotlivých treponemálních kmenů.

Odlišná cílová restriktční místa byla u *T. paraluiscuniculi* nalezena na 34 místech (16 pro *Bam*H I, 5 pro *Eco*R I a 13 pro *Hind* III), z toho bylo 21 nově vzniklých restriktčních míst a 13 zaniklých; u kmene Samoan D bylo nalezeno 8 odlišných cílových restriktčních míst (1 pro *Bam*H I, 2 pro *Eco*R I a 5 pro *Hind* III), z toho bylo 5 nově vzniklých a 3 zaniklá. U kmenů Gauthier a SS14 bylo nalezeno 1 místo s odlišným restriktčním profilem pro *Hind* III. U *T. paraluiscuniculi* bylo nalezeno sedm delecí v oblastech TPI8, TPI12, TPI13, TPI34, TPI41, TPI48 a TPI66 a 3 inzerce v TPI2, TPI32B a TPI78. U kmenů Samoan D, Gauthier a SS14 byly nalezeny dvě delece v oblastech TPI13 a TPI34 a jedna inzerce v oblasti TPI12; u kmene Samoan D byla navíc nalezena delece v oblasti TPI78. Delece v TPI12 o velikosti 1,8 kb zahrnuje geny o neznámé funkci a nachází se v oblasti genu *tprD* (TP0131). Delece v TPI48 je velká 1,7 kb a zahrnuje geny *tprI* (TP0620), *tprJ* (TP0621) a geny kódující proteiny o neznámé funkci (TP0617 - TP0619). Delece v TPI78 u kmene Samoan D je přibližně 350 bp velká a nachází se v oblasti genu *tprL* (TP1031). Inzerce v oblasti TPI12 je velká přibližně 1300 bp a nachází se v oblasti genů TP0126 - TP0130; u *T. paraluiscuniculi* jsou inzerce velké přibližně 150 bp a nebyly zatím přesně charakterizovány.

Výsledky naznačují vysokou míru sekvenční homologie mezi vyšetřeny kmeny. Ačkoliv je patogenita studovaných treponemálních kmenů různá, nebyly zjištěny zásadní rozdíly mezi srovnávanými genomy. Ukazuje to na možnost, že rozdílná virulence treponemálních kmenů je podmíněna relativně malými odlišnostmi v příslušných genomech. Tyto odlišnosti jsou soustředěny zejména ve skupině genů *tpr*, 12-ti genech specifických pro *T. pallidum* o zatím neznámé funkci. Identifikovaných nukleotidových záměn lze využít při molekulární identifikaci treponemálních kmenů.

Podporováno granty IGA MZ ČR č. NF NI/7351-3 a GA ČR č. 310/04/0021.

***E. coli* EXPRESSION, PURIFICATION AND BINDING STUDIES OF GALECTIN-4**

VERONIKA SUCHÁ^a, GABRIELA JENÍKOVÁ^b, VLADIMÍRA MARKOVÁ^b, MILAN FABRY^a, PETR MALÝ^b, and JIŘÍ BRYNDA^a

^aDepartment of Recombinant Expression and Structural Biology, Institute of molecular genetics, Flemingovo nám. 2,

166 37 Praha 6, ^bDepartment of Molecular Glycobiology, Institute of molecular genetics, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Galectins belong to a family of carbohydrate-binding proteins that share conserved amino acid sequences and affinity for β -galactoside sugars.

Galectin-4 is a monomer of about 36 kDa containing two carbohydrate-binding domains (CDR1 and CRD2, 40% identical) within a single polypeptide chain². This protein is expressed only in the alimentary tract, from the tongue to the large intestine. Strong expression of galectin-4 can be induced in cancers from other tissues including breast and liver. This distinct induction can make a valuable diagnostic marker and target for the development of inhibitory carbohydrate-based drugs.

Galectins may also bind intracellular non-carbohydrate ligands and have intracellular regulatory roles in processes such as RNA splicing, apoptosis, and, as suggested most recently, the cell cycle³.

The exact function of galectin-4 has not been exactly found out yet. Full-length mouse galectin-4 and its respective carbohydrate recognition domains CRD1 and CRD2 were expressed in *E. coli* and consecutively purified. Lactose-binding affinity of CDR1 was determined by fluorescence assay based on fluorescence quantum yield of two tryptophan residues (Trp 62, Trp 75) located on opposite borders of the binding site.

Specificity of recombinant galectin-4 and its respective carbohydrate recognition domains CRD1 and CRD2 labeled with FITC was determined using a glycan array consisting of synthetic and natural carbohydrates attached to microtiter plates.

REFERENCES

1. <http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/main.shtml>
2. Gitt M.A., Colnot C., Poirier F., Nani K.J., Barondes S.H., Leffler H.: *J. Biol. Chem.* 273, 2954 (1997).
3. Huflejt M.H., Leffler H.: *Glycoconjugate J.* 20, 247 (2004).

TRANSGENNÍ ROSTLINY PRO ZVÝŠENÍ ÚČINNOSTI FYTOREMEDIACE PCB A TOLUENU

MARTINA SURÁ^{a,b}, MARTINA MACKOVÁ^{a,b}, MIKLOS SZEKERES^c, MICHAL SYLVESTRE^d, ZUZANA CHRASTILOVÁ^a a TOMÁŠ MACEK^{b,a}

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, FPBT, VŠCHT, Technická 3, 16628 Praha, ^aÚstav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo 2, 16610 Praha, ^cInstitute of Plant Biology, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, P. O. Box 521 H-6701 Szeged, Hungary, ^dINRS-Quebec, Pointe-Claire, H9R 1G6, Quebec, Canada

Odstraňování polutantů z životního prostředí je často prováděno fyzikálně-chemickými postupy, které jsou většinou velmi finančně nákladné. Snaha o nalezení levnější metody

vedla k myšlence využití fyto-remediace rostlin. Cílem této práce je zvýšení účinnosti rostlin metabolisovat některé organické polutanty jako jsou polychlorované bifenyly (PCB) a toluen. Pro tento účel byl navrhnout postup přípravy transgenních rostlin, které by měly ve svém genomu obsahovat geny potřebné k degradaci PCB nebo toluenu.

Byl vybrán bakteriální gen *bphC*, který je součástí metabolické dráhy degradace PCB bakterie *Comamonas testosteroni* B-356. Enzym 2,3-dihydroxybifenyl-1,2-dioxygenasa, kódovaný genem *bphC*, je odpovědný za rozštěpení bifenylového kruhu. Tento důležitý krok, který je u rostlin limitující v procesu biodegradace PCB, by mohlo podpořit klonování bakteriálního *bphC* do rostlinného organismu. Pro snadnější detekci exprese genu *bphC* byly navrženy různé konstrukty s kazetami obsahující gen *bphC* ve fusi s genem pro GFP („green fluorescent protein“), GUS (beta-glukuronidasu) a LUC (luciferasu). Byl navržen také konstrukt, který obsahuje gen *bphC* s histidinovou kotvou (6x His), jež umožňuje snadnou izolaci proteinu z rostlinného organismu. Jako modelové rostliny byly vybrány *Nicotiana tabacum* a *Arabidopsis thaliana*. Pro transformaci rostlin pomocí agrobakteriální infekce bylo připraveno šest konstruktů: pPCV702/CaMV35S/*bphC*/GFP (tři různé konstrukty), pPCV812i/CaMV35S/*bphC* (obsahující GUS gen), pPCV/LUC+-NOS/CaMV35S/*bphC* (obsahující LUC gen) a pPCV812i(-GUS)/CaMV35S/*bphC*/His. Transformované rostliny *Nicotiana tabacum* byly selektovány na médiu s antibiotikem. V rostlinách s CaMV35S/*bphC*/GFP byla přítomnost dané DNA i RNA ověřena se specifickými primery metodou PCR, popř. RT-PCR. Exprese fusního proteinu BphC/GFP byla dokazována imunochemicky s protilátkami proti proteinům BphC a GFP.

Konstrukt obsahující gen *bphC* ve fusi s genem pro luciferasu byl transformován do rostlin *Arabidopsis thaliana*. Přítomnost klonované DNA byla ověřena se specifickými primery metodou PCR. Byla zaznamenána také luminescence exprimované luciferasy v rostlinách *Arabidopsis thaliana*.

Gen *todC1C2* kóduje enzym toluendioxygenasu, která katalyzuje oxidaci aromatického kruhu toluenu a poskytuje tak substrát pro následnou biodegradaci. Byly připraveny dva genetické konstrukty, jeden obsahující gen *todC1* s histidinovou kotvou a druhý pouze s genem *todC2*. Tyto geny budou exprimovány v rostlinných buňkách transienční expresí, která zajišťuje rychlou odpověď na otázku aktivity exprimované toluendioxygenasy *in vivo*.

Tato práce byla sponzorována grantem MŠMT ČR č. IPO5ME745.

EFFECT OF METHYLATED ANTHRACENE DERIVATIVES ON RAT LIVER EPITHELIAL CELLS

LENKA ŠVIHÁLKOVÁ ŠINDLEROVÁ^{a,b}, LENKA UMANNOVÁ^{a,b}, JAN VONDRÁČEK^a, KATEŘINA CHRÁMOSTOVÁ^a, JIŘÍ NEČA^c, KATEŘINA PĚNČÍKOVÁ^c, MILAN ČÍŽ^d, ANTONÍN LOJEK^d, ALOIS KOZUBÍK^a, BRAD L. UPHAM^e, and MIROSLAV MACHALA^c

^aLab. Cytokinetics, Inst. Biophysics, AS CR, Kralovopolska 135, 612 65 Brno, ^bRECETOX, Fac. Sci., Masaryk Univ., Kamenice 126/3, 625 00 Brno, ^cVeterinary Res. Inst., Hudcova 70, 62132 Brno, ^dLab. Free Radical Pathophysiology, Inst. Biophysics, AS CR, Kralovopolska 135, 61265 Brno, ^eDept Paediatrics & Human Development, Michigan State Univ., B420 Life Sciences, East Lansing, MI 48824, USA sindler@ibp.cz

The methylated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons are important environmental pollutants that are also found at high levels in cigarette smoke. Methylated anthracenes are present in cigarette smoke in concentration 60-fold higher than benzo(a)pyrene¹. It has been hypothesized that they could play a role in tumour promoting effects of cigarette smoke condensates, such as inhibition of gap junctional intercellular communication (GJIC), an epigenetic event involved in the removal of an initiated cell from growth suppression. The position of methyl group has been shown to significantly affect the biological effects of methylated anthracenes on GJIC inhibition in rat liver epithelial cells, as the compounds with substitution forming bay-like region have been shown to inhibit GJIC and activate mitogen-activated protein kinases². Moreover, it has been recently shown that 1-methylanthracene (1-MeA) can induce a release of 3H-arachidonate and apoptosis in endothelial cells by a mechanism that involves activation of phospholipase A2 (ref.³). Arachidonic acid (AA)-induced cell death is often associated with oxidative stress, although a causal relationship has not yet been made.

In the present study, we investigated effects of methylated anthracenes on the release of AA, formation of reactive oxygen species (ROS), GJIC inhibition, ERK1/2 activation, induction of aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated activity and cytokinetics in rat liver epithelial WB-F344 cells, a cellular model used for studies on tumour promoting effects of xenobiotics. We found that 1-MeA and 9-MeA, both carrying methyl substitution forming a bay-like region, inhibited GJIC in concentration-dependent manner and stimulated a rapid and transient ROS formation, detected by lucigenin-dependent chemiluminescence. Contrary to that, 2-MeA failed to inhibit GJIC and induce ROS production. Also, 1-MeA and not 2-MeA induced a release of AA from WB-F344 cells assessed by HPLC and activation of ERK1/2 (p44^{MAPK}/p42^{MAPK}). No compound was cytotoxic at the range up to 100 μM concentration and they did not affect cell proliferation in confluent WB-F344 cells. All three compounds induced only a weak AhR-mediated activity.

Taken together, our data seem to suggest that bay-like methylated anthracenes can inhibit GJIC and induce AA release, but also stimulate ROS formation. These rapid effects were not associated with modulation of cell proliferation and cell death, however they might be associated with GJIC inhibition, an important tumour-promoting process, and/or perturbation of intracellular lipid signalling. Future studies should investigate the exact mechanisms of ROS formation and AA release control, as both ROS and AA can play a significant role in modulation of cell signalling and cytokinetics.

This work was supported by grant No. 524/05/0595 of Grant Agency of the Czech Republic and Ministry of Agriculture (grant No. MZE 0002716201).

REFERENCES

- Severson R. F., Snook M. E., Higman H. C., Chortyk O. T., Akin F. J., in: *Carcinogenesis* (Freudenthal R. I., Jones P. W., ed.) Raven Press, New York, 1, 269 (1976).
- Rummel A. M., Trosko J. E., Wilson M. R., Upham B. L.: *Toxicol. Sci.* 49, 232 (1999).
- Tithof P.K., Elgayyar M., Cho Y., Guan W., Fisher A.B., Peters-Golden M.: *Faseb J.* 16, 463 (2002).

DESIGN A SYNTÉZA NOVÝCH TYPŮ EXTRAKTANTŮ KOVŮ NA BÁZI LIGANDOVÝCH TENZIDŮ

EVA SVOBODOVÁ

Ústav organické chemie, Vysoká škola chemicko-technická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
svobodoe@vscht.cz

V naší skupině byly dříve připraveny lipofilní ligandy **I** a **II** obsahující 2-(hydroxyiminomethyl)pyridinové chelatorné seskupení, jejichž extrakční účinnost byla testována měřením jejich schopnosti transportovat ionty přechodných kovů (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Pd^{2+}) přes chloroformovou kapalnou membránu (model BLM – bulk liquid membrane). Bylo zjištěno, že přítomnost kvartérní amoniové skupiny zvyšuje rychlost transportu, její struktura (počet a délka alkylových řetězců) ovlivňuje rychlost a selektivitu transportu. Méně lipofilní nekvartérní alkyl(pyridin-2-yl)ketoximy **I** transportují přes kapalnou membránu kromě iontů mědi také nikelnaté kationy, přičemž rychlost transportu Ni^{2+} významně klesá s rostoucí délkou alkylového řetězce. Kvartérní amoniové soli **II** vykazují vyšší selektivitu vůči transportovaným kovům. Zatímco měďnaté ionty byly pomocí ligandů **II** transportovány velmi účinně, nikelnaté ionty jimi transportovány nejsou. Nosiče **II** rovněž účinně transportovaly paladnaté ionty^{1,2}.

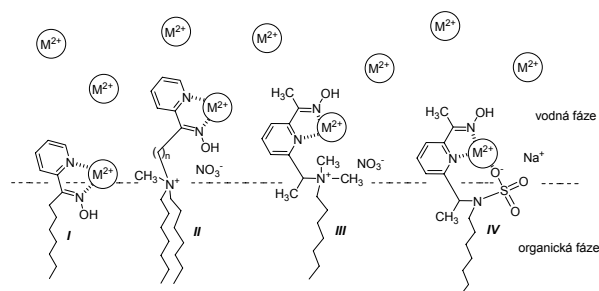


Schéma 1

Z literatury³ je známo, že elektrostatická interakce mezi záporně nabitým povrchem anionické micely a iontem kovu pozitivně ovlivňuje koordinaci tohoto iontu kovu k ligandu zabudovanému v micelě. Lze tedy předpokládat, že přítomnost anionické skupiny v molekule nosiče bude pozitivně ovlivňovat rychlost koordinace iontu kovu na fázovém

rozhraní a tedy i rychlost transportu. Proto byly navrženy a připraveny nové typy kationických **III** a anionických **IV** ligandů se stejným chelatorným seskupením (Schéma 1). Porovnáním průběhů transportů různých iontů přechodných kovů (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pd^{2+} , Cd^{2+}) pomocí ligandů **III** a **IV** bude posouzen vliv záporného náboje na transportní chování ligandu.

LITERATURA

- Cibulka R., Hampl F., Šmidrkal J. Jr., Liška F.: *Tetrahedron Lett.* 40, 6849 (1999).
- Svobodová E., Cibulka R., Šmidrkal J. Jr., Liška F., Hampl F.: *10th International Conference Separation of Ionic Solutes, Podbanské High Tatras, 6-11 Sept. 2003, Book of abstracts* (Kuruc J., ed.), str. 93.
- Son S. - G., Hebrant M., Tecilla P., Scrimin P., Tondre Ch.: *J. Phys. Chem.* 96, 11072 (1992).

PŘESNĚ DEFINOVANÉ PYRIDINIOVÉ OLIGOMERY A JEJICH DERIVÁTY VYUŽITELNÉ V MOLEKULOVÉ ELEKTRONICE

MICHAL VALÁŠEK^{a,b}, JAROSLAV PECKA^a a JOSEF MICHLE^b

^aKatedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2,

^bDepartment of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, CO80309-0215, U.S.A.

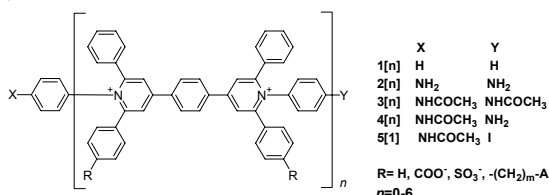
michalvalasek@hotmail.com

Poslední desetiletí se zájem chemie ubírá k novým materiálům využitelným v molekulové elektronice. Námi připravené oligomery slouží jako konstrukční články v molekulárně elektronických obvodech, ve kterých dochází k přenosu negativního náboje (elektronů) pomocí oxidačně redukčních procesů.

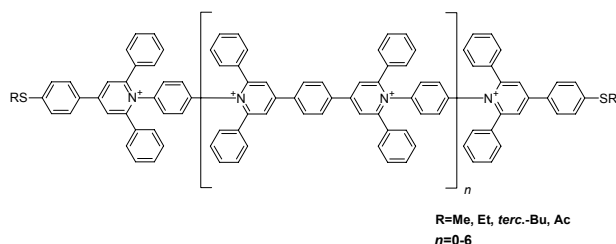
Bude prezentována nová syntetická cesta k přípravě oligomerů pyridiniového typu, ve kterých se pravidelně střídají 1,4-fenylenevé a 1,4-pyridiniové jednotky, která nevyžaduje separaci jednotlivých oligomerů. Tyto oligomery *p*-fenylen-bis-4,4'-(1-aryl-2,6-difenylyl-pyridinia) mají strukturu **1-4[n]** (Obr. 1). Monomery ($n = 1$) byly připraveny z *p*-fenylen-bis-4,4'-(2,6-difenylylpyridia) a *p*-fenylen-diaminu, *p*-aminoacetanilidu nebo anilinu. Vyšší oligomery ($n > 1$, $R = \text{H}$) byly připraveny krokovým prodlužováním monomerů pomocí pyrylium-fenylen-pyridinia³. Dále bude představena metoda na přípravu různě substituovaných oligomerů v polohách 2,6 na pyridiniových jednotkách. Monomer **5[1]** byl použit jako akceptorní část při konstrukci série donor-izolátor-akceptorů („molekulových diod“). Pro lepší rozpustnost byly též připraveny oligomery mající kovalentně vázané anionty v *para* polohách na fenylech ($R = \text{SO}_3^-$, COO^- , alkyl-A^-). Bude také pojednáno o vlivu aniontů na rozpustnost oligomerů, spektroskopických studiích a DFT optimalizací struktury³. Pro vodivostní měření byla připravena série oligomerů (Obr. 2) s vhodnými koncovými skupinami (alkylsulfanyly) vykazujícími specifickou afinitu k povrchu zlata. Bude prezentována jak syntéza těchto vhodných koncových skupin,

tak i vodivostní a elektrochemické studie této série oligomerů v závislosti na délce řetězce.

Obr. 1



Obr. 2



Tento projekt byl financován z grantů GA ČR 203/01/0644 a GA ČR 203/04/092.

LITERATURA

1. Dimroth K., Reichardt Ch.: Liebigs Ann. Chem. 93, 727 (1969).
2. Huang S.A.X., Chuang K. C.: Polymer 41, 5001 (2000).
3. Valášek M., Pecka J., Jindřich J., Michl J.: J. Org. Chem. 70, 405 (2005).

ANTIOXIDAČNÍ A CYTOPROTEKTIVNÍ ÚČINKY EXTRAKTU *Vaccinium myrtillus*

KATEŘINA VALENTOVÁ

Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta
Univerzity Palackého, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
kata.valentova@email.cz.

Plody brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) jsou po staletí využívány jako potravina, ale také v lidovém léčitelství. Od 16. století je dokumentováno používání plodů borůvky při léčbě průjmů, močových kamenů, zánětů žlučníku, kurdějí, kašle a plicní tuberkulózy. V současnosti se extrakty používají při diarheách, gastritidách, dyspepsiích a při zánětech v dutině ústní a hltanu. Koncentrovaný extrakt je registrován jako oftalmologikum a vasoprotektivum. Plody obsahují zejména fenolové látky (anthocyaniny a stilbeny), vitaminy a sacharidy. Anthocyaniny, jejichž obsah v plodech se pohybuje mezi 0,1 a 0,5 %, jsou známé antioxidanty. Jejich cytoprotektivita vůči oxidativnímu poškození buněk nebyla dosud studována. Cílem práce bylo studium biologické aktivity extraktu *V. myrtillus* (EVM) na modelu potkaních hepatocytů poškozených modelovými toxiny. Primární kultury potkaních hepatocytů byly preinkubovány 30 min s EVM v koncentraci 100 a 500 µg ml⁻¹. Následně byla kultura intoxikována terc-butylhydroperoxidem (0,5 mM, 1,5 h) nebo allylalkoholem (0,2 mM, 4 h). Hodnocena byla schopnost buněk redukovat tetrazoliovou sůl (MTT test životnosti

buněk), integrita buněčné membrány (aktivita uvolněné laktátdehydrogenasy, LDH) a koncentrace produktů lipidové peroxidace (látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, TBARS). Extrakt na tomto modelu vykázal koncentračně závislý protektivní účinek, který se ve srovnání s kontrolou, obsahující pouze příslušný toxin, projevil vyšší životností buněčné kultury, nižší aktivitou LDH a nižší koncentrací TBARS. V koncentraci 500 µg ml⁻¹ EVM byly zjištěny hodnoty odpovídající 50 % hodnot kontrolní (neintoxikované) kultury. V podmínkách *in vitro* EVM zhasel enzymaticky generovaný superoxid s účinností 46,97±1,60 ekvivalentů superoxidodismutasy (U/mg). Za zjištěné protektivní účinky EVM vůči oxidativnímu poškození hepatocytů jsou odpovědní především anthocyaniny, jejichž obsah činil 24,99 % extraktu.

Děkuji firmě IVAX-Pharmaceuticals s.r.o. za poskytnutí standardizovaného extraktu. Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 6198959216.

KVASINKOVÉ SYSTÉMY PRO TRANSPORT KATIONTŮ ALKALICKÝCH KOVŮ

KLÁRA VELKOVÁ a HANA SYCHROVÁ

Fyziologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20 Praha 4
velkova@biomed.cas.cz

Organismy se v okolním prostředí přirozeně setkávají především s ionty Na⁺, které jsou pro většinu z nich toxické. Naopak, uvnitř buněk je nutná vysoká koncentrace iontů K⁺. K udržování optimální vnitrobuněčné koncentrace kationtů alkalických kovů kvasinkovým buňkám slouží rozličné transportní systémy. Významné jsou nepochybně evolučně konzervované Na⁺/H⁺ antiportery, zprostředkující export kationtů alkalických kovů výměnou za proton. Doposud byly funkčně charakterizovány antiportery z pěti kvasinkových druhů. Podle substrátové specifity je možno rozdělit tyto proteiny do dvou skupin¹: i) transportující pouze Na⁺ a Li⁺ a ii) proteiny se širší substrátovou specifitou, rozpoznávající jako substrát také K⁺ a Rb⁺. Z rozdělení kvasinkových Na⁺/H⁺ antiporterů do těchto dvou skupin (v poměru 2:3) nelze usuzovat na jejich možnou primární funkci v životě kvasinkové buňky. Jedná se pouze o eliminaci toxických iontů Na⁺, nebo se také díky své schopnosti transportovat K⁺ podílejí na udržování buněčné homeostáze, např. regulaci pH v buňce? K získání odpovědi na tuto otázku by mohla přispět charakterizace většího počtu antiporterů z různých kvasinek. V naší laboratoři jsou v současné době studovány Na⁺/H⁺ antiportery ze dvou nekonvenčních kvasinek (osmotolerantní *Debaryomyces hansenii* a dimorfní kvasinky *Yarrowia lipolytica*) metodou heterologní exprese jejich genů v buňkách *Saccharomyces cerevisiae* postrádajících vlastní systémy pro export kationtů alkalických kovů.

Tato práce vznikla s podporou těchto grantů GA ČR:
204/03/H066, 206/05/0035.

LITERATURA

1. Kinclová O., Potier S., Sychrová H.: Microbiology 148, 1225 (2002).

DETECTION OF PHOSPHATIDYLCHOLINE - SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C IN PLANT TISSUE

ŠTĚPÁNKA ZDAROVA^{a,b}, M. POTOCKÝ^b,
O. VALENTOVA^b, and J. MARTINEC^a

^aInstitute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojova 135, 165 02 Praha 6, ^bInstitute of Chemical Technology, Technická 5, 166 28 Praha 6

Phospholipases (A2, C and D) are key molecules of broad range of signal transduction pathways in animals as well as in plants. They operate as parts of the phospholipid signaling system that transduces signals from the extracellular space to the cell. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) is an enzyme described up to now biochemically only in bacteria and animal cells. The enzyme catalyses hydrolysis of lipid phosphatidylcholine into phosphocholine (PCho) and diacylglycerol (DAG), both potential second messengers. On the gene level all available sequences of PC-specific phospholipase C comes from two groups of prokaryotic PC-PLCs. We have detected *in silico* PC-PLC homologs (putative PC-PLC genes) in *Arabidopsis thaliana* genome, comprising a novel gene family in plants.

In our investigation we have used microsomal fraction (MF) and plasma membrane enriched fractions (PM) from various plant materials as tobacco cell suspension culture, *A. thaliana* leaves or *Brassica napus* stems. The highly purified plasma membrane was prepared by phase partitioning in an aqueous PEG/dextran polymer two-phase system. PC-PLC activity was determined using radiolabelled PC as substrate. Products of enzymatic reaction were analyzed by HPLC.

The highest specific activity of this novel plant enzyme was found in tobacco cell culture BY2. Specific activity of PC-PLC was changing significantly during growth cycle of BY2 cell culture. We studied biochemical characteristics of the enzyme in PM. The enzyme was activated by millimolar Ca²⁺ concentrations and 0,15% (w/v) triton and its pH optimum was around 7. We also tested inhibitors of PLD and phosphatases to eliminate possible formation of PCho by another metabolic pathway. There were no significant variations. As a next step after successful detection of enzymatic activity in plant tissues we have focused on cloning of putative PC-PLC genes and their expression in heterologous (*E. coli*) system.

This work was supported by the Czech Ministry of Education, grant no. LN00A081.

REFERENCES

1. AGI: Nature 408, 796 (2000).
2. Wang X.: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 211 (2001).

ACYLISOKYANÁTY V CHIRÁLNÍ ANALÝZE

PETR VODIČKA a LUDVÍK STREINZ

Ústav organické chemie a biochemie, Flemingovo nám. 2,
Praha 6 – Dejvice, 166 00

Acylisokyanáty nalezly široké využití jak v organické syntéze, tak jako pomocná činidla při analýze organických látek. Dosud však nebyly připraveny chirální acylisokyanáty, které by díky své reaktivitě a přítomnosti chirálního centra mohly mít zásadní význam v analýze opticky aktivních látek. Předmětem tohoto příspěvku tedy je příprava některých nových acylisokyanátů tohoto typu a studium jejich vlastností. V první fázi našeho výzkumu bylo připraveno několik typů chirálních acylisokyanátů. Po vyzkoušení různých způsobů přípravy se jako nejvhodnějším ukázala metoda, kdy byl acylisokyanát připraven reakcí příslušného amidu chirální kyseliny s oxalylchloridem. Ačkoliv uvedená metoda má obecnou platnost, ukázala se jako nevhodná pro amidy kyselin snadno podléhající racemizaci (viz. např. 2-fenyl-2-(1-naftyl)acetamid). V takovém případě byla vypracována individuální metoda přípravy.

Design látek byl navrhován tak, aby vznikající diastereomery měli vhodnou, dostatečně rigidní konformaci, ze které lze dobře vyvodit stereochemii analyzovaných látek.

V druhé části této práce jsme připravenými acylisokyanáty derivatizovali sérii chirálních sekundárních alkoholů. Analýzou $\Delta\delta$ NMR spekter vznikajících karbamátů jsme posuzovali účinnost těchto činidel ($\Delta\delta = \delta(R) - \delta(S)$) a dále jsme zjišťovali jejich nejvýhodnější konformaci. Přestože rozdíly $\Delta\delta$ nebyly příliš velké, prostorové uspořádání v centrální části molekuly bylo u všech derivátů totožné (potvrzeno počítačovými simulacemi a X-Ray analýzami). Na základě této stabilní konformace lze tedy i s malými rozdíly ve spektrech určovat nejen optickou čistotu, ale i absolutní konfiguraci analyzovaných látek.

Projekt byl podporován výzkumným záměrem Z4 055 0506 a grantem GAČR 203/05/2141.

LITERATURA

1. Vodička P., Streinz L., Koutek B., Buděšínský M., Ondráček J., Císařová I.: Chirality 15, 472 (2003).
2. Vodička P., Streinz L., Vávra J., Koutek B., Buděšínský M., Ondráček J., Císařová I.: Chirality, v tisku.

MECHANISMS OF MODULATION OF OXIDATIVE BURST BY QUATERNARY BENZOPHENANTHRIDINES

JIŘÍ VRBA and MARTIN MODRIANSKÝ

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Oxidative burst, a part of cellular immunity, is a metabolic event that depends on protein kinase C (PKC)-mediated phosphorylation of cytosolic components of phagocyte NADPH oxidase. Sanguinarine (SA) and chelerythrine (CHE), quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids with anti-inflammatory activity, are known to inhibit microtubule assembly and PKC activity. We have previously shown that SA and CHE inhibits both chemotactic peptide *N*-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced oxidative burst in DMSO-

differentiated HL-60 cells while this inhibition cannot be ascribed to direct inhibition of PKC activity. In this study we examined effect of SA and CHE on subcellular localization of phosphorylated PKC substrates, effect on phosphorylation of PKC, and whether SA and CHE inhibition of oxidative burst is related to the alkaloids interaction with microtubules. Western blot analyses of cytosolic and membrane fractions obtained from PMA-activated differentiated HL-60 cells showed that in the cytosolic fraction SA and CHE at concentrations from 2 to 10 μM decreased level of phosphorylated PKC substrate of ~ 50 kDa while increased level of ~ 60 kDa protein. In the membrane fraction SA and CHE caused concentration-dependent decrease of phosphorylated PKC substrates except the protein of ~ 50 kDa. Western blot detection also revealed that both alkaloids at the same concentrations accelerated dephosphorylation of PKC α/β II isoforms autophosphorylated at Thr638/Thr641. Furthermore, both SA and CHE induced phosphorylation of PKC by phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1), but this action was observed only at higher alkaloid concentrations. Our experiments also showed that colchicine, vincristine, and taxol, microtubule interacting alkaloids, and benzimidazole derivative nocodazole inhibited neither fMLP nor PMA-induced oxidative burst, thus, it is microtubule-independent. We conclude that SA and CHE affect PKC activity in different cellular compartments and cause acceleration of specific PKC dephosphorylation, rather than PDK1-mediated PKC phosphorylation, thus contributing to the oxidative burst inhibition.

This research was supported by grant MSM CR 6198959216.

DUAL BEHAVIOUR OF BERBERINE ON AhR-DEPENDENT TRANSCRIPTION

RADIM VRZAL^a, ADÉLA ZDAŘILOVÁ^a, LUDEK BLÁHA^b, and ZDENĚK DVORÁK^a

^a*Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc,*
^b*Masaryk University Brno, Res. Ctr. for Environmental Chem. and Ecotoxicology (RECETOX), Kamenice 3, 625 00 Brno.*

The plants containing berberine, a quarternary isoquinoline alkaloid, have been used in the traditional medicine for the centuries. Berberine itself exhibits antibacterial, anti-inflammatory and antitumor effects. As the consequence of growing concern about the use of natural products in the pharmacotherapy, the investigation of possible interactions between P450 system and these products is of the general interest. Cytochrome P450 1A1, an enzyme which is under transcription control of aryl hydrocarbon receptor (AhR), is involved in the promotion of cancer due to its ability to transform pro-carcinogenes (e.g. benzo[a]pyrene) into the ultimate carcinogens. Thus, potential influence of P450 1A1 might have an impact in terms of cancer prevention.

In this work, we examined the influence of berberine on AhR-dependent transcription. An increased CYP1A1 mRNA level (HepG2 cells) and AhR-dependent luciferase activity (H4IIE.luc cells) were observed with high concentration of

berberine (10-50 μM) and in short incubation periods (6 and 24 h). Long incubation period (48 h) and low doses of berberine (< 1 μM) had no effect. HPLC analyses refuted the hypothesis of berberine metabolic transformation by human and rat hepatoma cells. Furthermore, we have found berberine to be an inhibitor of CYP1A1 enzyme activity both in cell culture (HepG2) and on pure enzyme ($\text{IC}_{50} = 2,5$ μM). Whether berberine acts as a ligand of AhR or it triggers some signaling pathway, remains to be disclosed.

This work was supported by the grant MSM CR 6198959216 and the grant GA CR 303/04/P074.

MOŽNOSTI VYUŽITÍ STACIONÁRNÍCH FÁZÍ NA BÁZI ZrO₂ V KONTROLE LÉČIV

VÁCLAV ŽIŽKOVSKÝ, RADIM KUČERA, JAROSLAV SOCHOR a JIŘÍ KLIMEŠ

*Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
zizkovskyyv@faf.cuni.cz*

V moderních léčivých přípravcích bývá stále častěji zastoupeno více chemických substancí, jejichž struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti (M_r , pKa, log P) jsou značně odlišné. Navíc chemicko-fyzikální vlastnosti příbuzných látek, popřípadě degradačních produktů, které se vyskytují jako nečistoty v léčivu, bývají velmi podobné léčivu vlastním. Proto je nezbytné vyvíjet nové separační metody kontrolně analytického hodnocení, které mají dostatečnou selektivitu i pro separaci takto komplikovaných směsí. Vedoucí úlohu v kontrole léčiv má bezesporu HPLC. Naprostá většina aplikací využívá pro separaci kolony s modifikovaným silikagelem i přes jeho známá omezení (pH a tepelná stabilita, interakce zejména bazických léčiv s volnými silanoly). Jako zajímavou alternativou ke standardním silikagelovým kolonám se jeví stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého. Tyto stacionární fáze jsou v posledních letech velmi intenzivně studovány pro mnoho jejich pozitivních vlastností využitelných právě v chromatografii. Zejména jde o vysokou chemickou (pH ≈ 1 –14) a tepelnou (cca do 200 °C) stabilitu. Zirkoniová kolona se chová díky přítomnosti volných *d*-orbitalů u Zr (IV) atomů v kyselém a neutrálním prostředí jako aniontový měnič, zatímco v bazické oblasti má schopnost fungovat jako měnič kationtů. Z toho vyplývá, že na výsledné retenci se podílí nejen reverzní mechanismus jako u modifikovaného silikagelu, ale selektivita kolony je výrazně ovlivněna i iontovými interakcemi analytu se stacionární fází. Možnost pracovat za zvýšené teploty se pozitivně odráží na zvýšení sorpční kinetiky a snížení viskozity mobilní fáze, což vede ke zkrácení doby analýzy a snížení zatížení pumpy přístroje. Z těchto důvodů se naskytá možnost výhodného využití kolon na bázi ZrO₂ pro separaci a analytické hodnocení řady léčiv.

V naší pilotní studii jsme se zaměřili na využití kolon se stacionární fází na bázi ZrO₂ ve zkoušce na příbuzné látky a rozkladné produkty u široce využívaného nesteroidního antiflogistika ibuprofenu – jako modelové látky (analyt

obsahuje různě kyselé a neutrální látky s odlišnými pKa a log P hodnotami). K hodnocení jak substance tak i léčivého přípravku (krém) jsme úspěšně využili analytické kolony Discovery®Zr-PS a Discovery®ZrCarbonC18. Při vývoji metody jsme se zaměřili na faktory ovlivňující retenci a selektivitu. Jako rozhodující faktor ovlivňující interakci analytu se stacionární fází se ukázalo nastavení pH eluentu. Zvláště pak u analýzy léčivého přípravku, kde spolu s rozkladnými produkty ibuprofenu byly hodnoceny konzervační látky (parabeny) a 4-hydroxybenzoová kyselina jako jejich degradační produkt. Všechny látky byly úspěšně separovány s dostatečným rozlišením a v kratších retenčních časech než na běžných reverzních fázích. Dosažené výsledky naznačují širokou možnost ve využití zirkoniových stacionárních fází v kontrole kvality a kvantity léčiv, zvláště pak v případech, kde je třeba výrazně jiné selektivity, než je možno dosáhnout na běžně užívaných modifikovaných silikagelech.



SIGMA-ALDRICH

SEZNAM AUTORŮ

Adam, Vojtěch	353, 377, 378, 379	Frei, Eva	353
Aimová, Dagmar	353	Fryček, Rudolf	359
Alexandrová, Zuzana	354, 382	Fuchs, Renate	356
Anděra, Ladislav	359	Gagnon, Jean	367
Anelli, Pier Lucio	370	Gilboa-Garber, Nechama	367
Babula, Petr	377	Guryča, Vilém	359
Bartůšek, Karel	377	Halada, P.	378
Bělohradský, Martin	380	Haškovec, Cedrik	374
Bendová, Z.	369	Havel, Ladislav	377
Beranová, Katarina	354	Havlíček, Libor	376
Bílková, Zuzana	375	Helánová, Šárka	360
Bláha, Luděk	392	Herrmann, Pavel	360
Blanářová, Olga	361	Hocek, Michal	382
Blašík, Ondřej	378	Hofmanová, Jiřina	361
Bleha, Miroslav	368	Holý, Petr	380
Böhmová, Gabriela	355	Honys, David	365
Borská, Romana	369	Horváth, Viktor	361
Bosáková, Z.	383	Hradilová, Jana	361
Brabec, Marianne	356	Hrachovinová, Ingrid	380
Brdička, Radim	372	Hrdina, Radim	362
Bruchová, Hana	372	Hrkal, Z.	378
Brynda, Jiří	387	Husáková, Petra	372
Brzobohatý, B.	361	Chaloupková, Radka	362
Brzobohatý, Břetislav	355	Chramostová, Kateřina	388
Bulánková, Petra	355	Chrastilová, Zuzana	387
Ciencialová, Alice	357	Chvátalová, Kateřina	363
Císařová, Ivana	380, 385	Illnerová, H.	369
Čáp, Michal	356	Imberty, Anne	367
Čečková, Martina	356	Imramovský, Aleš	363
Čejková, A.	384	Janalíková, Magda	364
Čermák, Jan	379, 385	Jeníková, Gabriela	387
Červený, Lukáš	357	Jinoch, Pavel	380
Češková, Pavla	360	Jiráček, Jiří	357
Číž, Milan	388	Karpenko, Vladimír	371
Damborský, Jiří	362	Káš, Martin	365
Divišová, Hana	372	Kizek, René	353, 377, 378, 379
Doubravová, Kateřina	358	Klamová, Hana	374
Dračínský, Martin	358	Klejduš, Bořivoj	365
Dubská, Lenka	359	Klimeš, Jiří	392
Dvořák, Zdeněk	392	Knoppová, Monika	365
Dvořáková, Hana	383	Koblovská, Radka	365
Fabry, Milan	387	Koc, Michal	366
Fernetti, Cristina	370	Kočalka, Petr	366
		Konečná, Hana	355
		Kopečný, Jiří	367

Kostlánová, Nikola	367	Michálek, J.	383
Kotašková, Jana	369	Michálek, Jiří	358
Kotlík, Petr	384	Michl, Josef	389
Kotora, Martin	360, 362, 373, 374	Mikšanová, Markéta	381
Koukalová, Šárka	355	Mistr, Adolf	361
Koutek, Bohumír	357	Mitchell, Edward	367
Kováčiková, Z.	369	Modrianský, Martin	391
Kovář, Jan	366	Moravcová, Jana	374
Kozmík, Václav	370	Müller, Petr	373
Kozubík, Alois	361, 388	Nadřová, Zuzana	366
Kráčalíková, Kateřina	368	Neča, Jiří	388
Královský, Josef	375	Nečas, David	373
Kroutil, Aleš	361	Nešvera, Jan	365
Kryštof, Vladimír	373, 376	Novák, Petr	374
Křenková, Jana	375	Novotná, Zuzana	377
Kubáč, David	368	Novotný, Miloš V.	359
Kučera, Radim	392	Opatřilová, Radka	374
Kurfürst, Milan	370	Otáhalová, Eva	374
Kusenda, Branislav	369	Ouzká, Šárka	375
Kutý, M.	376	Pacáková, Věra	359
Lapčík, Oldřich	365	Palenčár, Petr	376
Laurinová, K.	369	Palková, Zdena	356, 386
Lhoták, Pavel	365, 383	Paprskářová, Martina	376
Libra, Antonín	356, 370	Pascolo, Lorella	370
Libus, Jiří	370	Pátek, Miroslav	365
Lojek, Antonín	388	Pávek, Petr	356, 357
Lorusso, Vito	370	Pecka, Jaroslav	389
Lubal, Přemysl	353	Pejchar, Přemysl	377
Macek, Tomáš	387	Pěničková, Kateřina	388
Macková, Martina	354, 357, 387	Petrlová, Jitka	353, 378, 379
Macková, Zuzana	365	Petřek, Jiří	377
Machala, Miroslav	388	Pluskalová, Michaela	378
Machara, Aleš	370	Pohl, Radek	366
Maláková, Jana	357	Pojarová, Michaela	383
Malý, Petr	387	Polanc, Slovenko	363
Marinov, I.	378	Pospěchová, Kateřina	356
Marková, Vladimíra	387	Pospíšilová, Šárka	369
Maršálková, Linda	371	Pošta, Martin	379
Martinec, Jan	377	Potěšil, David	353, 377, 378, 379
Martinec, J.	391	Potočky, M.	391
Martínková, Ludmila	368	Prokop, Zbyněk	362
Masařík, Michal	379	Rejman, Dominik	366
Matyk, Josef	372	Rittich, Šimon	380
Merkerová, Michaela	372	Rosenberg, Ivan	366
Mihovilovic, M.D.	384	Rybáčková, Markéta	380

Rýdlová, Helena	381	Štruncová, Soňa	369
Ryšlavá, Edita	354	Švihálková Šindlerová, Lenka	361, 388
Salaj, Peter	380	Tichý, Boris	369
Sehnal, Petr	354, 382	Tiribelli, Claudio	370
Sejbal, Jan	358	Truksa, Jaroslav	366
Sheard, Michael	359	Turánek, Jaroslav	361
Sládek, M.	369	Turek, Pavel	374
Slanina, Jiří	363	Turský, Matyáš	373
Sochor, Jaroslav	392	Uldrijan, Stjepan	373
Souček, Karel	361	Umannová, Lenka	388
Sova, Petr	361	Upham, Brad L.	388
Spíchal, Lukáš	385	Vácha, F.	376
Stará, Irena G.	354, 382	Váchová, Libuše	386
Starý, Ivo	354, 382	Valášek, Michal	389
Stibor, Ivan	365, 383	Valentová, Kateřina	390
Stiborová, Marie	353, 381	Valentova, Olga	377
Strachotová, Dita	386	Valentova, O.	391
Streinz, Ludvík	391	Velková, Klára	390
Strnad, Miroslav	373, 376, 385	Veselý, Martin	365
Strouhal, Michal	386	Visigalli, Massimo	370
Suchá, Veronika	387	Víteček, Jan	377
Sumová, A.	369	Vlašínová, Helena	377
Surá, Martina	387	Vodička, Petr	391
Sures, Bernd	353	Vojtěšek, Bořivoj	360, 373, 379
Suttnar, Jiří	380	Vojtišek, Pavel	379
Svoboda, Jiří	370	Vondráček, Jan	388
Svobodová, Eva	389	Vrba, Jiří	391
Sychrová, Hana	390	Vrzal, Radim	392
Sýkora, Jan	379, 385	Vyskot, Boris	355
Sylvestre, Michal	387	Vyzula, Rostislav	360
Szekeres, Miklos	387	Wimmerová, Michaela	367
Šaman, David	354, 382	Závada, Jiří	380
Šedo, Ondrej	381	Zdarova, Štěpánka	391
Šilhár, Peter	382	Zdařilová, Adéla	392
Šimánová, Markéta	383	Zdráhal, Zbyněk	355
Širc, Jakub	383	Zehnálek, Josef	353
Široký, Jiří	355	Žák, František	361
Škrdlantová, Markéta	384	Žižkovský, Václav	392
Šmajš, David	364, 386		
Šnajdrová, Radka	384		
Špalt, Zbyněk	385		
Šťastná, Lucie	385		
Štaud, František	356, 357, 370		
Štěpánová, Lucie	375		
Štorchová, Helena	370		



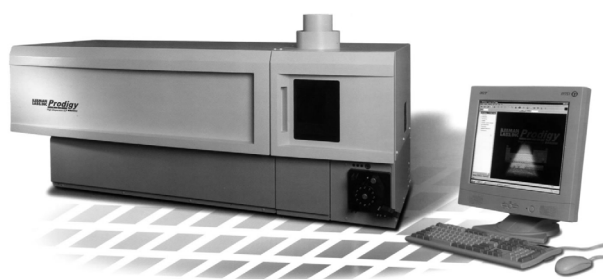
BAS®

Rudice s.r.o.

Best Analytical Systems

Nový ICP spektrometr PRODIGY

Přístroj, který předbíhá konkurenci o několik let.



Obr. ICP spektrometr Prodigy

Tento článek přináší zásadní revoluční informace o novém ICP spektrometru Prodigy, který zcela mění dosavadní situaci na trhu ICP-OES. Zatím jen malá skupinka zasvěcených odborníků ví, že existuje lepší analytické řešení než CID detektor. Toto řešení se jmenuje **L-PAD** neboli velkoplošný programovatelný detektor (*Large format – Programmable Array Detector*). Tento nový detektor používá pouze nový ICP spektrometr **Prodigy**. Ne náhodou název spektrometru Prodigy znamená „zázrak“.

ICP Prodigy je moderní, vysoce výkonný simultánní ICP spektrometr, který v sobě spojuje výhody optického systému Echelle a nového velkoplošného programovatelného polovodičového detektoru **L-PAD**. Spektrometr Prodigy je konstruován s ohledem na minimální servis, maximální robustnost a dlouhodobou spolehlivost.

Historie firmy Teledyne Leeman Labs

Výrobce ICP spektrometru Prodigy firma Teledyne Leeman Labs (dále jen TLL) je přední světový výrobce

ICP spektrometrů. Již přes 20 let je úspěšným průkopníkem v zavádění technických novinek v ICP spektrometrii. Jako příklad uveďme první ICP spektrometr s Echelle optikou (r. 1981) a první volně běžící oscilátor s frekvencí 40 MHz (r. 1987). Tyto jako první uvedla firma TLL a dnes jsou považovány za celosvětový standard v ICP. Spektrometry firmy TLL byly v minulosti na evropský trh dodávány pod OEM značkami Philips a Pye Unicam.

Nový polovodičový detektor L-PAD

Nový detektor L-PAD s více než milionem pixelů v kombinaci s Echelle optickým systémem zaručuje vysokou disperzi a rozlišení. Aktivní plocha detektoru je 4× větší než u detektorů v ostatních ICP spektrometrech. Proto Prodigy poskytuje úplné pokrytí vlnového rozsahu od 165 do 1100 nm v jediném měření při zachování výborného rozlišení a disperze. Dosahuje tak vysokého analytického výkonu.

Detektor L-PAD má vlastní integrovanou CPU jednotku s procesorem Pentium™, který je 4× rychlejší než u konkurenčních spektrometrů. Tato jednotka řídí všechny funkce detektoru, jako jsou časování, sběr dat a binning. Binning umožňuje současné součtové vyčítání více pixelů při zachování šumu, jaký je při vyčítání pouze jednoho pixelu. Binning a rychlejší CPU u L-PAD zajišťují podstatně nižší šum, než jaký mají dosavadní CID detektory, a tím i lepší detekční limity na reálných vzorcích.

Schopnost programovatelné integrace umožňuje, aby detektor L-PAD zaznamenal celé spektrum nebo jen jeho požadované části. Velkou výhodou je metoda nedestruktivního vyčítání, která umožňuje sledovat úroveň signálu každého pixelu v každém okamžiku expozice. Tato metoda zabráňuje saturaci pixelů detektoru. Dále umožňuje současné rychlé integrování intenzivních čar a dlouhé integrování u slabých čar, a to i při bezprostřední sousednosti těchto čar. Díky tomu spektrometr Prodigy dosahuje výborných detekčních limitů i na reálných vzorcích.

Detektor L-PAD nemá blooming efekt. Je to zásadní rozdíl oproti CCD detektorům a segmentovaným SCCD detektorům. Blooming je vzájemné ovlivňování nábojů na sousedních pixelech detektoru. Blooming efekt je u detektoru L-PAD odstraněn na fyzikální úrovni technologií CID a použitím odvodních kanálků. V praxi to znamená, že spektrometr Prodigy má nejšířší dynamický rozsah v ICP spektrometrii – přes deset řádů.

Nejmodernější technologie – nejlepší analytický výkon mezi ICP spektrometry

Spektrometry s Echelle optikou jsou dlouhodobě uznávané pro své vlastnosti, kterými jsou vysoká disperze a rozlišení, vysoká světelná propustnost, výjimečná stabilita a nízké rozptylové světlo. Čím lepší je disperze optiky spektrometru, tím lepší je separace píků ve spektru.

Všechny ostatní ICP spektrometry však používají starší typy detektorů s podstatně menší aktivní plochou, než má L-PAD. Tato skutečnost u nich výrazně degraduje disperzi a rozlišení celého optického systému. Proto se u konkurenčních ICP spektrometrů s Echelle optickým systémem a polovodičovým detektorem setkáte s nutnými kompromisy. Těmi jsou buď použití úzké vstupní štěrbinou pro zachování rozlišení na úkor zhoršení limitů detekce, a nebo použití širší vstupní štěrbinou pro dosažení vyšší citlivosti za cenu zhoršení rozlišení. To má také za následek větší výskyt spektrálních interferencí, které je pak nutno eliminovat dekonvolucí.

Segmentované detektory SCCD jsou omezeny ve výběru vlnových délek. Díky tomu je možný přístup jen k určitým spektrálním oblastem. I v jednotlivých segmentech detektoru však stále dochází k bloomingu.

Jiné konkurenční spektrometry pro udržení rozlišení rozdělují měření na sekvenční analýzu několika spektrálních oblastí. Důsledkem je pak velmi zdlouhavé měření. Rovněž se tak zvyšuje spotřeba argonu, a tím i provozní náklady.

Díky vlastnostem nového detektoru L-PAD tyto kompromisy u Prodigy zcela odpadají. Spektrometr Prodigy má nejlepší disperzi mezi ICP spektrometry na trhu, a to 0,06 nm/mm při vlnové délce 200 nm. Jsou tak zcela minimalizovány spektrální interference. Je to dáno také nejdelší ohniskovou vzdáleností optického systému mezi ICP spektrometry na trhu, a to 800 mm. Spektrometr Prodigy má vysoké rozlišení, a to i při využití dostatečně široké standardní vstupní štěrbinou. Provedení optického systému spektrometru Prodigy zaručuje, že toto rozlišení je výborné po celé ploše detektoru.

ICP Prodigy má nejčistší optický systém na světě! U Prodigy po celou dobu životnosti nedochází ke zhoršování citlivosti v UV oblasti. Je to zajištěno koncepcí optického systému. Je zde zcela eliminován outgasing, tedy uvolňování organických látek z komponent optického sys-

tému. Outgasing z dlouhodobého hlediska zhoršuje propustnost světla v UV oblasti a je problémem u všech dosa-
vadních ICP spektrometrů.

Díky popsaným přednostem nového detektoru L-PAD využívá spektrometr Prodigy plně všech výhod optického systému Echelle, a dosahuje tak nejlepších analytických parametrů mezi ICP spektrometry.

Stabilita

Spektrometr Prodigy má vynikající krátkodobou i dlouhodobou stabilitu. Má teplotní stabilizaci optického systému a také používá novou patentovanou technologii Image Stabilized Plasma Source (ISPS). Jedná se o plo-
voucí uložení celého optického systému. ISPS zajišťuje rychlý start přístroje a výbornou dlouhodobou stabilitu.

Právě proto je nový ICP spektrometr Prodigy zárukou přesných a nezpochybnitelných výsledků chemických analýz.

Prodigy na českém trhu

Ve světě je již známo, že mít ICP Prodigy v chemické laboratoři znamená mít prestiž mezi laboratořemi a zákazníky. Totéž v plné míře platí i pro Českou republiku.

ICP spektrometr Prodigy uvádí na český a slovenský trh výhradní zastoupení TLL firma BAS Rudice. Díky velmi atraktivní zaváděcí ceně je právě nyní ta nejvhodnější doba pro nákup tohoto jedinečného ICP spektrometru!

Prodej, instalaci, zaškolení obsluhy, záruční a pozá-
ruční servis ICP spektrometrů Prodigy zajišťuje zkušený tým odborníků firmy BAS Rudice, který je vyškolen u výrobce firmy TLL.

První ICP spektrometr Prodigy v ČR je již nainstalován ve firmě RSM Chemacryl v Sokolově a zákazník je plně spokojen.

Více informací na www.bas.cz a www.leemanlabs.com.
Můžete nás také navštívit na několika výstavách – viz www.bas.cz/vystavy.php.

BAS Rudice spol. s r.o.

Pražská 66

678 01 Blansko

Tel./fax: 516 417 449, 516 418 776

www.bas.cz, e-mail: bas@bas.cz

1st European Chemistry Congress

Chemical Sciences

Building the Europe of knowledge

Promoting innovation and economic growth



27-31 August 2006

Budapest, Hungary

www.euchems-budapest2006.hu

A conference focusing on frontiers in chemical and molecular sciences supported by all the national chemical sciences organisations of Europe.

"Exciting and long overdue" – Harry Kroto, Nobel Laureate

Plenary Lectures by Nobel Laureates: Paul J. Crutzen, Sir Harry Kroto, George A. Olah, Sir John Walker, Kurt Wüthrich, Ahmed H. Zewail

Keynote Lectures by: Annette Beck-Sickinger, David C. Clary, François Diederich, Malcolm L. H. Green, Walter Leitner, Steven V. Ley, Klaus Müllen, Jan Reedijk, Pierre Potier, Manfred Reetz

One and two-day special topics symposia:

New Developments in Theoretical and Computational Chemistry
Cutting Edge Spectroscopy
Hot Topics in Nuclear & Radiochemistry
3D Chemical Imaging in Analysis
Novel Multifunctional Ligands in Coordination Chemistry
Polymer Architecture - From Structure to Functional Control
New Concepts and Methods in Catalysis
Structure & Function of Biomolecules

New Frontiers in Organic Synthesis Chemistry, Food and Health
New Frontiers in Medicinal Chemistry
Frontiers in Supramolecular Chemistry Materials & Devices
Environmental Chemistry
Green & Sustainable Chemistry & Processes
Chemistry Meets Proteins

Topics on education, history and the senses

Over 100 top-level lectures and 100 short oral communications

Extensive poster sessions

Large exhibition and a job fair for young scientists

Congress organization: EuCheMS* executive committee: Gábor Náray-Szabó (chair), György Horvai (local chair)

Congress host: Hungarian Chemical Society

Scientific programme committee: Jean-Marie Lehn (chair), E. Peter Kündig (co-chair)

*EuCheMS, the European Association for Chemical and Molecular Sciences incorporates 50 member societies which in total represent some 150,000 individual chemists in academia, industry and government in over 35 countries across Europe

OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	297	EDITORIAL	297
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Trendy v totální syntéze alkaloidů	298	Trends in Total Synthesis of Alkaloids	298
J. Hájíček		J. Hájíček	
Oxazolidinové deriváty efedrinu	318	Oxazolidine Derivatives of Ephedrine	318
M. Astrová, L. Kurc a L. Červený		M. Astrová, L. Kurc, and L. Červený	
Fukosidasy a oligosacharidy obsahující fukosu	324	Fucosidase and Fucose -Containing Glycoconjugates	324
E. Benešová, M. Marková, P. Lipovová a B. Králová		E. Benešová, M. Marková, P. Lipovová, and B. Králová	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Charakteristika tlakových fluktuací v různých režimech suspenzí plyn-tuhá látka	330	Characteristics of Pressure Fluctuations in Different Operation Regimes of Gas-Solid Suspensions	330
O. Trnka, M. Hartman a V. Veselý		O. Trnka, M. Hartman, and V. Veselý	
Stanovení sorpční kapacity sorbentu Tenax TA pro určení koncentrací vybraných organických látek v ovzduší	339	Breakthrough Characteristics of Selected Organic Compounds on Tenax TA	339
A. Kroupa, I. Viden a S. Vodrážka		A. Kroupa, I. Viden, and S. Vodrážka	
Diferenciální permeametr určený k měření propustnosti plynů a par organických látek skrze ploché polymerní membrány	345	Differential Measurement of Permeability of Gases and Organic Vapors through Flat Polymer Membranes	345
L. Hendrich, V. Hynek a M. Šípek		L. Hendrich, V. Hynek, and M. Šípek	
KONFERENCE SIGMA-ALDRICH – SBORNÍK	351	SIGMA-ALDRICH CONFERENCE – ABSTRACTS	351

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 99 (2005), čís./no. 5 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 129, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 115 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT v Praze, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohlav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: M. Bláhová, I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRAŇIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Rápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Mišek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; t el/fax +420 222 220 184, e-mail: mblahova@csvts.cz, simanek@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2005 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plně předplatné 2005 (12 čísel) 1512 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 756 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2005 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Dáno do tisku 29.4.2005.