

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



**Metody stanovení rozpustnosti hydrofobních modelových
karcinogenů ve vodném prostředí**

**Solubility of lipophilic model carcinogens in water
environment**

Martin Řeboun

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Václav Martínek Ph.D.

Praha, 2013

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli panu RNDr. Václavu Martínkovi Ph.D. za zadání zajímavého tématu. Zvláště pak za cenné rady, ochotu a trpělivost, kterou mi během práce věnoval.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením
RNDr. Václavu Martínkovi Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze, 13. 5. 2013

Podpis

Martin Řeboun

Abstrakt:

2-Nitrobenzantrhron a 3-nitrobenzanthron jsou široce zastoupené polutanty v životním prostředí. Jejich zdrojem je automobilová doprava, ale i jiné spalovací procesy. 3-nitrobenzanthron je prokázaným mutagenem a karcinogenem v savčích i bakteriálních systémech. Po metabolické aktivaci tvoří adukty s purinovými bázemi v DNA. Zatímco příbuzný 2-NBA vykazuje o 3–4 řády nižší genotoxické působení.

Jedním z cílů práce bylo stanovit rozpustnost 2-NBA, a také dalších dvou modelových karcinogenů - Sudanu I a ellipticinu ve vodném prostředí. Získané hodnoty porovnat mezi sebou a s již známou rozpustností 3-NBA. Rozpustnost by mohla být jedním z možných vysvětlení velmi nízkých genotoxických účinků 2-NBA oproti ostatním sledovaným látkám. Sudan I je běžné azobarvivo, které se běžně používá k barvení nejrůznějších látek, a je to prokázaný lidský karcinogen. Ellipticin, rostlinný alkaloid, je látka zajímavá zvláště díky svým protinádorovým účinkům, které pravděpodobně souvisí s její genotoxicitou.

K dalším cílům patřilo stanovení rozpustnosti sledovaných látek v metanolu, získání jejich extinkčních koeficientů a ověřit popřípadě vylepšit spektrofotometrické techniky, které byly použity pro tato stanovení. Ke stanovení byly použity dvě různé spektrofotometrické metody. Jedna byla založena na vymezení platnosti Lambertova – Beerova zákona. Zatímco druhá stanovovala koncentraci nad sraženinou, popřípadě krystaly dané látky.

Klíčová slova: rozpustnost, UV-VIS spektroskopie, 3-nitrobenzanthron, 2-nitrobenzanthron, ellipticin, Sudan I

Abstract:

2-Nitrobenzanthron (2-NBA) and 3-nitrobenzanthron (3-NBA) are pollutants widely occurring in the environment. The main sources of benzantrones are combustion products (i.e. diesel exhausts, wood and cigarette smoke ...). 3-NBA is proven strong mutagen and carcinogen for bacteria and mammals and it is probably mutagenic also to humans, while 2-NBA shows genotoxic properties lower by 3-4 orders of magnitude. Here we consider the possibility that large difference in the solubility, and consequently also the difference in bioavailability of these isomers could be the factor partially explaining this phenomenon.

One of our goals was to determine the solubility of 2-NBA in water and compare it with 3-NBA and also with other carcinogens studied in our laboratory (Sudan I, ellipticin). The second aim was to determine extinction coefficients of these compounds in water and in methanol.

Two different methods were employed to determine the solubility of the model compounds. The first method was based on spectrophotometric verification of the Lambert-Beer law. The results were then compared with other method utilizing determination of concentration of a compound in equilibrium with solid phase.

(In Czech)

Key words: solubility, UV-VIS spectroscopy, 3-nitrobenzanthrone, 2-nitrobenzanthrone, ellipticine, Sudan I

Seznam zkratek

[³ H] ellipticin	značený ellipticin pomocí izotopu vodíku
11-NBA	11-nitrobenzanthron
1-NBA	1-nitrobenzanthron
2-NBA	2-nitrobenzanthron
3,11-DNBA	3,11-dinitrobenzanthron
3',4'-di(OH)-Sudan I	(1-[(3,4-dihydroxyfenyl)azo]-2-naftol)
3,9,11-TNBA	3,9,11-trinitrobenzanthron
3,9-DNBA	3,9-dinitrobenzanthron
³² P-postlabeling	Značení pomocí radioaktivního fosfátu
3-ABA	3-aminobenzanthron
3-NBA	3-nitrobenzanthron
4',6-di(OH)-Sudan I	(1-[(4-hydroxyfenyl)azo]naftalen-2,6-diol)
4'-OH-Sudanu I	(1-[(4-hydroxyfenyl)azo]-2-naftolu)
6-OH-Sudanu I	(1-(fenylazo)naftalen-2,6-diolu)
9-NBA	9-nitrobenzanthron
A	absorbance
Abl	onkogen
C. I.	colour index
CO	oxid uhelnatý
COX	cyklooxygenasa
CYP	Cytochrom P450
dA	Deoxyadenosin
dA-C8-N-ABA	N-(2'-deoxyadenosin-8-yl)-3-aminobenzanthron
dA-N ⁶ -ABA	2-(2'-deoxyadenosin-N ⁶ -yl)-3-aminobenzanthron
dG	deoxyguanosin
dG-C8-N-ABA	N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron
dG-N ² -ABA	N-(2'-deoxyguanosin-N ² -yl)-3-aminobenzanthron
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
Erb B	onkogen

E _{red}	redukční potenciál
FAD	flavinadenindinukleotid
Fes	onkogen
Fos	onkogen
G-proteiny	GTP dependentní proteiny
GIT	gastrointestinální trakt
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	vysokotlaká chromatografie
HRP	křenová peroxidasa
Jun	onkogen
l	délka optického prostoru
logP	dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu
LPO	laktoperoxidasa
LUMO	Nejnižší neobsazený molekulový orbital
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí
Mos	onkogen
MPO	myeloperoxidasa
Myb	onkogen
Myc	onkogen
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NAT1, NAT2	N,O-acetyltransferasa 1 a 2
NBA	Nitrobenzanthron
N-PAH	Nitroaromatické polycyklické uhlovodíky
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa
P450	pigment absorbující při 450 nm
PHS	Prostaglandin H-syntasa
p.p.m.	počet na milion částic
POR	Cytochrom P450 reduktáza
Raf	onkogen
Ras	onkogen
Rel	onkogen
rev/nmol	počet zpětných mutací na nmol

rpm	otáčky za minutu
S9 frakce	Supernatant směsi jaterních enzymů centrifugovaný při 9000 g
SD	Směrodatná odchylka
Sis	onkogen
Src	onkogen
SULT1A1, SULT1A2	Sulfotransferasa 1A1 a 1A2
TA98	Kmen bakterií <i>Salmonella typhimurium</i>
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialová část spektra
VIS	viditelná část spektra
N	nevazebný orbital
σ	sigma vazebný orbital
σ^*	sigma antivazebný orbital
π	pi vazebný orbital
π^*	pi antivazebný orbital
$\varepsilon/\varepsilon_{kor}$	extinkční (korigovaný) koeficient
LC-ESI-MS	metoda hmotností spektrometrie (kapalinová chromatografie spojená s ionizací elektron sprejem)

Obsah

Abstrakt:	4
Abstract:	5
Seznam zkratk	5
Obsah.....	8
1 Úvod.....	10
1.1 Vývoj onkologického onemocnění.....	11
1.2 Karcinogeneze.....	13
1.2.1 Fáze karcinogeneze	13
1.3 Biotransformace xenobiotik.....	15
1.3.1 První fáze biotransformace.....	16
1.3.2 Druhá fáze biotransformace	17
1.4 Významná xenobiotika a karcinogeny	17
1.4.1 Sudan I.....	17
1.4.2 Ellipticin.....	20
1.4.3 Nitrobenzanthrony.....	23
1.5 Enzymy podílející se na biotransformaci xenobiotik.....	29
1.5.1 Systém monooxygenas se smíšenou funkcí.	29
1.5.2 Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1.).....	29
1.5.3 NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (EC 1.6.5.2)	30
1.6 Spektrofotometrie.....	30
2 Cíl práce	32
3 Materiál a metody.....	33
3.1 Laboratorní přístroje a chemikálie	33
3.2 Metoda a postup práce.....	34
3.2.1 Příprava zásobních roztoků	34
3.2.2 Práce se spektrofotometrem a použité nastavení.....	34
3.2.3 Korekce vlnových délek.....	36
3.2.4 Všeobecná ustanovení k metodám.	41
3.2.5 Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků Sudanu I a ellipticinu. 41	
3.2.6 Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků 2 - NBA	42

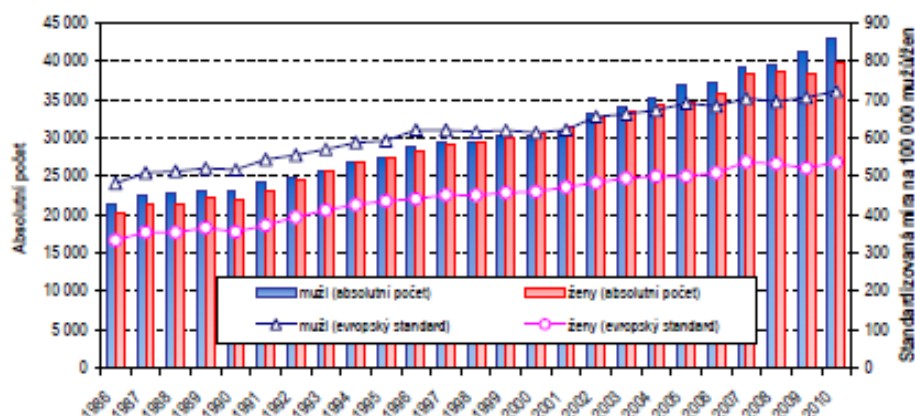
3.2.7	Stanovení extinkčních koeficientů u metanolových roztoků Sudanu I.....	42
3.2.8	Stanovení rozpustnosti pomocí ověření platnosti Lambertova - Beerova zákona	43
3.2.9	Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly Sudanu I	43
3.2.10	Stanovení koncentrace roztoku nad sraženinou elliptycinu ve vodě.	43
3.2.11	Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly elliptycinu a Sudanu I v metanolu.	43
4	Naměřená data a výsledky.....	45
4.1	Stanovení extinkčních koeficientů	45
4.1.1	Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků Sudanu I.....	45
4.1.2	Stanovení extinkčních koeficientů v pufovaných vodných roztocích elliptycinu	46
4.1.3	Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků 2 - NBA	47
4.1.4	Stanovení extinkčních koeficientů u metanolových roztoků Sudanu I.....	48
4.1.5	Stanovení extinkčních koeficientů u metanolových roztoků elliptycinu	49
4.2	Stanovení rozpustnosti jednotlivých látek.....	50
4.2.1	Stanovení rozpustnosti pomocí ověření platnosti Lambertova - Beerova zákona	51
4.2.2	Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly Sudanu I	55
4.2.3	Stanovení koncentrace roztoku nad sraženinou elliptycinu ve vodě.	56
4.2.4	Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly Sudanu I v metanolu.	57
4.2.5	Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly elliptycinu v metanolu.....	58
5	Diskuze.....	59
6	Závěr.....	62
7	Citovaná literatura	64

1 Úvod

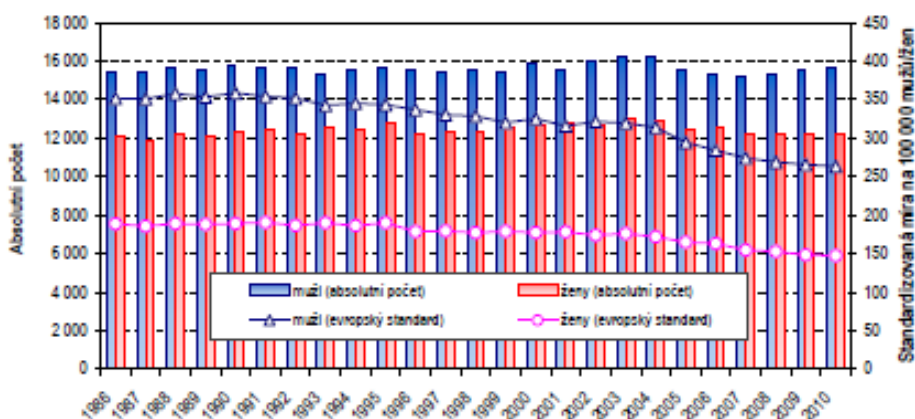
Současný vývoj společnosti vědy a techniky přináší do našeho stylu života nevídaný rozvoj a relativní blahobyt. Bohužel nám také přináší spoustu obtíží, které souhrnně nazýváme civilizační choroby. Krom obezity spojené s kardiovaskulárními potížemi, se mezi civilizační choroby může zařadit i rakovina.

Nádorová onemocnění byla v roce 2010 druhou nejčastější příčinou úmrtí. V témže roce bylo nově evidováno na 82 606 případů nových zhoubných a *in situ* novotvarů a zemřelo 27 834 pacientů. [1] Podle incidence nádorových onemocnění je dlouhodobě nejčastějším onemocněním rakovina kůže následovaný nádorem prostaty a prsu a tlustého střeva. I když onkologických případů dlouhodobě přibývá. Úmrtnost vykazuje stagnaci a v posledních několika letech i mírný pokles (viz.Obrázek 1) [1].

Graf 1: Vývoj incidence ZN a novotarů in situ u mužů a žen (1986–2010)



Graf 2: Vývoj úmrtnosti na ZN u mužů a žen (1986–2010)



Obrázek 1: Časový vývoj zhoubných novotvarů a novotvarů *in situ* a vývoj úmrtí na zhoubné novotvary v letech 1986 až 2010 v České republice a v Československu dělených podle pohlaví v porovnání s evropským standardem. Graf uvádí absolutní počty i standardizovanou míru na 100 000 obyvatel [1].

1.1 Vývoj onkologického onemocnění

Projevem onkologického onemocnění je nádor (novotvar, tumor). Jedná se o nadměrně a nekontrolovatelně vznikající novou tkáň. Takto vzniklé nádory můžeme dělit na benigní tedy nezhoubné a maligní (zhoubné). Maligní nádory pronikají do jiných tkání. Tvoří metastáze, které se pomocí lymfatického nebo krevního řečiště šíří dále do těla, kde se usazují a rostou. Zatímco benigní nádory zůstávají lokalizovány ve svých původních orgánech a jsou tedy snáze chirurgicky odstranitelné [2–4].

Vznik nádorového onemocnění je ovlivněn různými faktory. Tyto faktory se v první řadě dělí na faktory vnitřní a vnější. Vnitřní faktory jsou dědičnost, oslabení či poškození

obranyschopnosti jedince. Vnější faktory se vyskytnou až u 90 % procent všech nádorových onemocnění [5,6].

Jsou děleny podle druhu vlivu na:

Fyzikální:

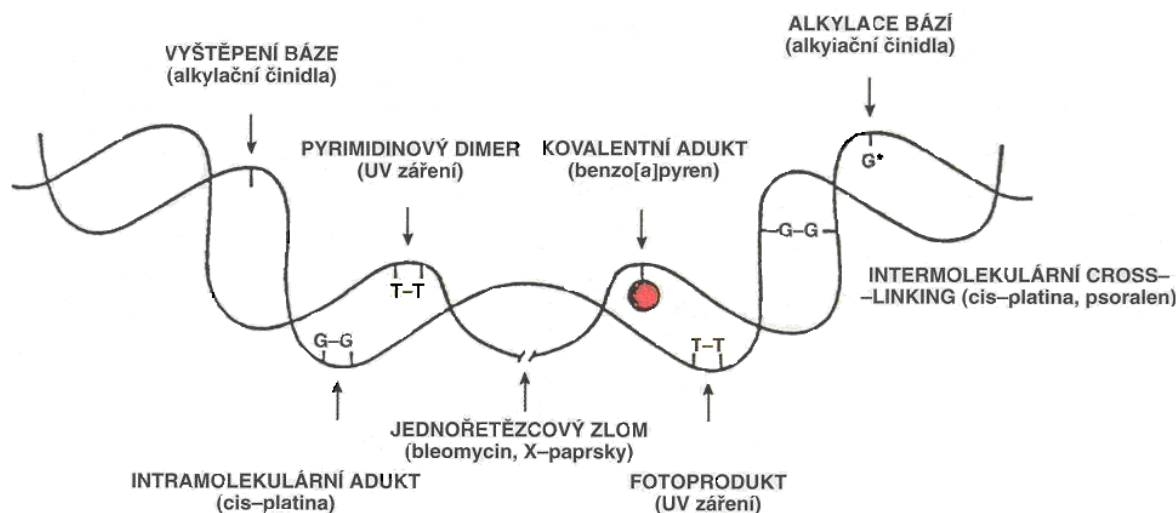
Tento vliv zahrnuje například Rentgenovo, ultrafialové či radioaktivní a kosmické záření. Dalším vlivem mohou být submikroskopické částice a s nimi spojená onemocnění jako jsou azbestóza a berylióza, které se projevují dlouhodobým zjizvováním plic [5–7].

Biologický:

Tento vliv zahrnuje především infekce organismů virů, bakterií a parazitů. Onkoviry podle odhadů mohou způsobit 15 – 20 % všech případů onkologických onemocnění [5–7].

Chemický:

Chemickým vlivem se rozumí vliv chemických látek, se kterými člověk přichází do styku. Jejich účinek se dělí podle způsobů účinku na genetickou informaci, a to na genotoxické, které tvoří kovalentní adukty s DNA, nebo na chemické karcinogeny způsobující změny struktury DNA. Těmi se myslí zlomy DNA, dělené na jednořetězcové (angl: single-strand break DNA) a dvou-řetězcové zlomy (angl: double-strand break DNA), nebo přesmyk řetězců (angl: cross-linking). Přesmyk může být intramolekulární či intermolekulární mezi dva řetězce DNA, nebo může docházet k interakci s proteiny. Poslední možností jsou mechanismy epigenetické, které tvoří nekovalentní interakce s DNA. Těmito interakcemi se myslí například vmezeření do šroubovice DNA. Všechny možnosti jsou zobrazeny na schématu (Obrázek 2) [2,3,8,9].



Obrázek 2: Schematické znázornění genotoxických účinků různých vnějších faktorů. [3]

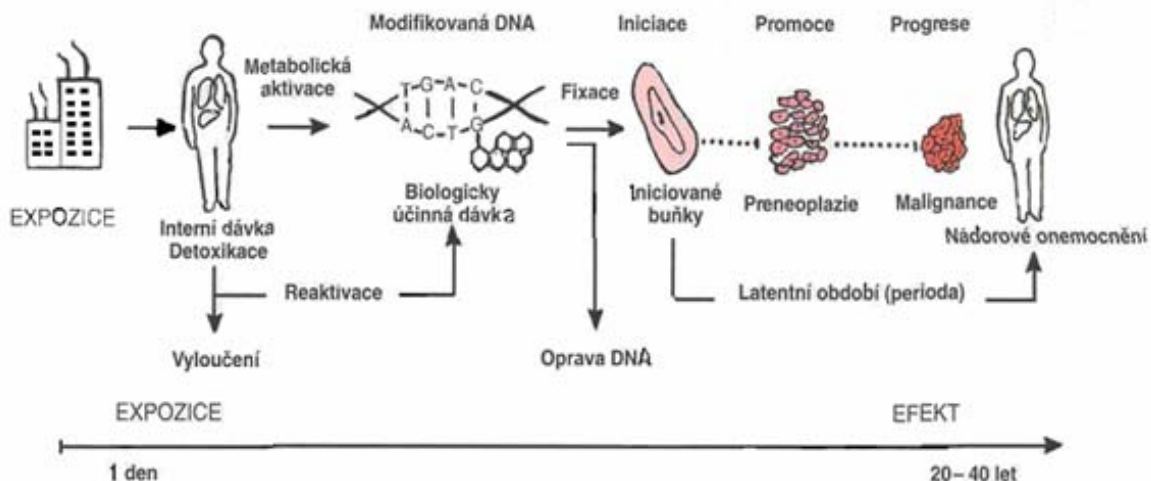
1.2 Karcinogeneze

Karcinogeneze představuje několikastupňový proces, při kterém se dlouhodobě kumulují poruchy na určitých genech. Narušení těchto genů následovně nabourává funkci jimi kódovaných proteinů. K rozvoji procesu stačí, aby došlo k poruchám v přibližně 0,1 % všech genů. Geny, jejichž poškození vede ke vzniku nádorového bujení, se dělí na protoonkogeny a tumor-supresorové geny [3,4,9]. Mutací protoonkogenů vznikají onkogeny, které se přepisují jako onkoproteiny. Ty následně nekontrolovatelně působí na proliferaci buněk, a tak rozběhnou nádorové bujení. Onkoproteiny mohou být růstové faktory (Sis), jejich receptory (Erb B), tyrosinkinasy (Abl, Src, Fes), G-proteiny (Ras), serinové nebo threoninové proteinkinasy (Raf, Mos) nebo transkripční faktory (Fos, Jun, Myc, Myb, Rel) [3,4,9].

Tumor-supresorové proteiny pracují jako inhibitory cyklin-dependentních kinas. Kinasy tlumí proliferaci a následně indukují proces řízeného zániku buněk – apoptózu. Cyklíny, cyklin-dependentní kinasy a jejich inhibitory jsou regulátory buněčného cyklu. Nádorové onemocnění pak případně vzniká jejich nevyváženou činností, které se projevuje nadměrným a nekontrolovatelným růstem buněk. [3,4,9]

1.2.1 Fáze karcinogeneze

U karcinogeneze rozlišujeme tři fáze. Iniciační, promoční a progresní. Celý průběh je znázorněn na obrázku (Obrázek 3)



Obrázek 3: Průběh karcinogeneze [3]. Na obrázku je znázorněn průběh karcinogeneze, od expozice karcinogenu, přes metabolickou aktivaci a všechny tři fáze karcinogeneze. Také je zde uvedena časová osa, na které je vidět, že může dojít ke vzniku onemocnění až za desítky let od expozice.

Iniciační fáze:

V této fázi dochází ke změnám na DNA. Jedná se o mutace, které vedou ke spuštění onkogenů a k deaktivaci tumor – supresorových genů. Dojde k tvorbě tzv. iniciované buňky. K tomuto jevu může dojít spontánně, nicméně reparační procesy či imunitní odezva způsobí nápravu. Největším podílem změn ve struktuře DNA je zastoupena kovalentní vazba, a to až 90 % u lidských karcinogenů. To se projevuje vazbou karcinogenu na bázi či deoxyribosu DNA [2,3].

Další možností modifikace DNA je tvorba hydroxyderivátů bází DNA působením radikálových forem kyslíku. Může jí být také tvorba cyklických aduktů vznikajících z genotoxických bifunkčních činidel. Radiace či tvorba interkalátů, nebo vznik pyrimidinových dimerů [3,8].

Promoční fáze

V této fázi se zvýší proliferace iniciovaných buněk, to vede ke vzniku benigního nádoru. Na tento jev působí různé promotory. Tedy látky s epigenetickým účinkem. Ty mohou být orgánově specifické (sacharin – močový měchýř, fenobarbital – játra), nebo působit v několika tkáních najednou. Nicméně mezi klíčové faktory jsou hlavně zahrnuta aktivita a

regulace proteinkinas a fosfatas. Významným faktorem mohou být aktivní formy kyslíku [2,8].

Fáze progresu

Tato fáze se v zásadě podobá iniciační fázi. Zásadním rozdílem je však rozsah modifikace DNA. Tak vznikají maligně pozmeněné buňky, které se nadále šíří do dalších tkání [2,8].

1.3 Biotransformace xenobiotik

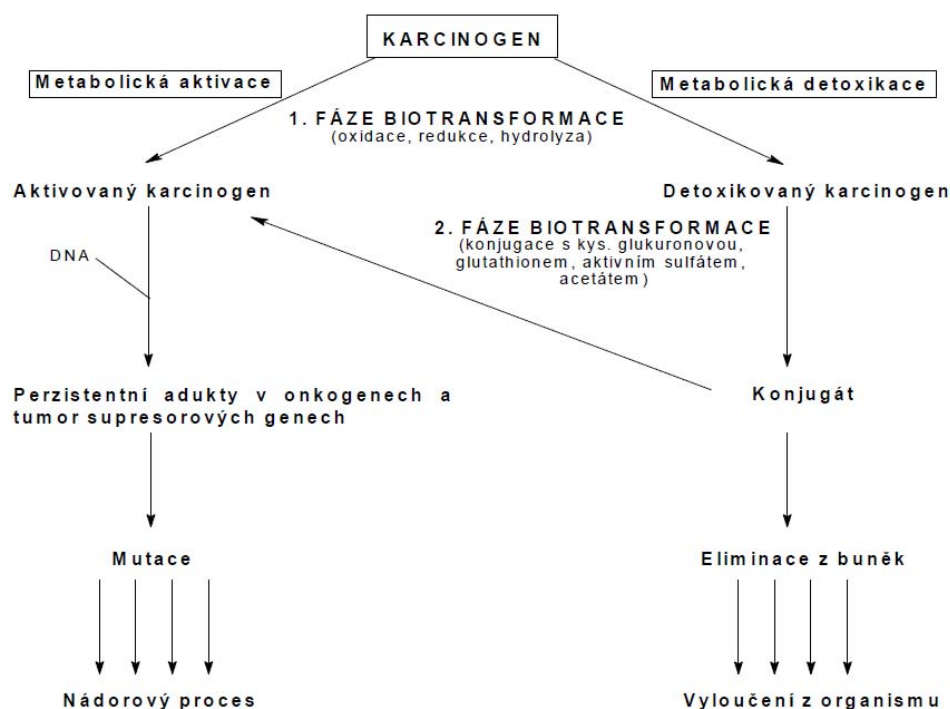
Xenobiotika je označení pro cizorodé látky, kterým může být organismus vystaven, i když se v něm běžně vyskytovat nemají. Tyto látky často mají toxické účinky. Mohou být přírodního původu, nebo vznikající lidskou činností. Sem se řadí převážně látky vyráběné cíleně ať už v chemickém (plasty, nátěrové hmoty), potravinářském průmyslu (barviva, emulgátory), zemědělství (pesticidy, herbicidy, fungicidy). Mezi významné zdroje xenobiotik řadíme i farmaceutický průmysl či zplodiny z dopravy. [10,11]

Vstup těchto látek do organismu může probíhat buď per orálně, inhalačně nebo popřípadě trans dermálně a jinak. Pak následuje transport krví nebo lymfou k cílové tkáni. Způsob detoxifikace organismu závisí na schopnosti rozpouštět se ve vodných roztocích nebo v tucích. Hydrofilní látky jsou schopny projít organismem rychle a brzy se vyloučí např. močí. Zatímco hydrofobní látky se mají tendenci hromadit v buňkách, potom co projdou přes membránu do buněk. Proto jsou podstoupeny tzv. biotransformaci. Tak se označuje souhrn enzymově katalyzovaných reakcí, které vedou k přeměně látky na látku s vyšší rozpustností. Tedy dojde ke zvýšení jejích hydrofilních vlastností. Tyto látky se pak snadněji vylučují z organismu. K biotransformačním procesům dochází v místech vstupu do organismu. (plíce, kůže, GIT). Dále v ledvinách, ale nejvíce látek je přeměňováno v játrech.

Biotransformace se dělí na dvě základní větve (**Obrázek 4**). První je větev detoxifikační, kdy dojde k odstranění xenobiotika z buňky a k následnému vyloučení. Druhou cestou je cesta aktivační. Při této cestě vzniká výrazně více biologicky aktivní látka, než je původní mateřská sloučenina [10,11].

Této skutečnosti se využívá při aktivaci léčiv, kdy dochází k přeměně na aktivní formu léku. Nicméně u jiných látek takto roste toxicita a mutagenní a karcinogenní vlastnosti jiných xenobiotik [12].

U živočichů se biotransformace dělí na dvě fáze. V první fázi dojde k zabudování nebo odkrytí funkční skupiny. Tato fáze se též nazývá derivatizační. Tak se látka připraví na druhou konjugační fázi. V této fázi dochází ke tvorbě konjugátů nově přeměněného xenobiotika s endogenními sloučeninami. Tak dojde k dalšímu navýšení hydrofility cizorodé látky. A následně může dojít k jejímu snadnějšímu vyloučení [13].



Obrázek 4: Průběh karcinogeneze. Schéma zobrazuje jednotlivé děje biotransformace. Rozděluje dvě základní větve: Metabolickou aktivaci a detoxikaci. Dále zdůrazňuje možný přesmyk v druhé části biotransformace [13].

1.3.1 První fáze biotransformace

V této fázi musí dojít ke zvýšení polarit y látky. Toho je docíleno buď zavedením nové polární látky, nebo jejím demaskováním na molekule této látky. Toho dosáhneme jedním ze tří mechanismů, a to oxidačními reakcemi, nebo redukčními reakcemi popřípadě hydrolytickými reakcemi. Jako oxidační reakce bereme C-hydroxylace, N-hydroxylace, S-oxidace a N-oxidace. Dále to mohou být dealkylace a deaminace, epoxidace a oxidace alkoholů. Redukční reakce zastupují nitroredukce a azoredukce. Hydrolytických reakcí se účastní estery a amidy [10,11].

Pokud je již cizorodá látka dostatečně polární, může být vyloučena. Pokud není, vstupuje do konjugační fáze, aby mohla být vyloučena v konjugátu. Všechny reakce první fáze jsou spojeny s enzymovými systémy. Tyto systémy jsou lokalizovány v endoplasmatickém

retikulu. Hlavní systém, který katalyzuje reakce, je systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO). Jako terminální oxidáza slouží Cytochrom P450. Dále se reakcí účastní peroxidasy, dioxygenasy, alkoholdehydrogenasa, monooxygenasy, aldehyddehydrogenasa, katalasa . Dále se na reakcích první fáze biotransformace podílí xanthinoxidasa, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (NQO1) a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa [3,10,11].

1.3.2 Druhá fáze biotransformace

V konjugační fázi probíhají metabolické reakce, při kterých dochází k syntéze konjugátu s endogenní sloučeninou nebo funkční skupinou. Takto vzniklý konjugát je rozpustnější ve vodě oproti původní sloučenině a je tedy schopen být vyloučen močí nebo ve žluči. Látka vstupující do konjugátu musí obsahovat funkční skupinu, která je do látky zavedena v první části biotransformace. Mezi endogenní sloučeniny, reagující s xenobiotiky za vzniku stabilního produktu, patří kyselina glukuronová, aktivní sulfát, acetát, glutathion, glycin, taurin. Většina konjugátu vede k detoxifikaci. Nicméně v určitých případech vede vznik konjugátu k tvorbě toxičtějšího aktivního metabolitu. Touto sloučeninou může být N-hydroxylovaný amin nebo aktivní acetát. Takové acetáty se pak mohou rozpadnout za vzniku karbeniového nebo nitreniového iontu. Tyto reaktivní ionty mohou reagovat s DNA (Obrázek 4). A zahájit tak proces karcinogeneze [3,10,14].

Enzymy konjugační fáze jsou především ve skupině transferas. Nejvýznamnějšími představiteli jsou UDP-glukuronosyltransferasy, N-acetyltransferasy, glutathion-S-transferasy a sulfottransferasy [3,10,14].

1.4 Významná xenobiotika a karcinogeny

1.4.1 Sudan I

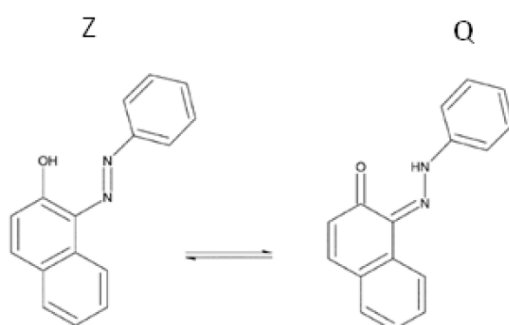
Sudan I systematickým názvem (fenylazo)-2-naftol je významným představitelem azobarviv. Z toho jsou také odvozeny jeho C. I. (colour index) názvy: Solvent Yellow 14 nebo Oil Orange. Azobarviva jsou rozsáhlá skupina chemicky příbuzných látek, které absorbují ve viditelné oblasti spektra. Azobarviva pokrývají celou škálu barev od žlutozelené přes oranžovou až po hnědou nebo modrou barvu. Proto tvoří více jak 50 % všech barviv. Jejich barevnost jim propůjčuje funkční skupina $-N=N-$, s obsahem dvou sp^2 hybridizovaných atomů. Nejčastěji se vyskytují barviva s obsahem jedné azo skupiny, nicméně mohou vznikat

diazo a triazo sloučeniny. Azobarviva mohou mít několik tautomerních forem. Azobarviva můžeme rozdělit do skupiny azo pigmentů, která je ve vodě nerozpustná a na skupinu azo barviv, která se ve vodě rozpouští. Azo pigmenty se dělí do několika skupin v závislosti na struktuře [15].

Azo barviva v organismu podléhají primárně přeměně působením NAD(P)H - dependentních reduktas, popřípadě přeměnou v játrech díky jaterním reduktasám. Tak vznikají aromatické aminy. Tyto látky jsou pro organismus karcinogenní a mohou se dělit do pěti skupin. Na anilíny, rozvinuté anilíny (jako je benzidin). Dále na sloučené aromatické aminy, heterocyklické aminy či aminoazo a jiné azo sloučeniny[16,17].

Při metabolické aktivaci aminoazo barviv dochází právě ke změnám na jejich amino skupině. N-hydroxylace nebo sulfatace a následný rozpad konjugátu vede k tvorbě nitreniových či karbeniových iontů. Tyto ionty následně kovalentně modifikují DNA, což vede k rozvoji procesu karcinogeneze [16,17].

Samotný Sudan I je směsí dvou tautomerních forem, (Z) azo fenolická forma a (Q) chinon(hydrazonová).



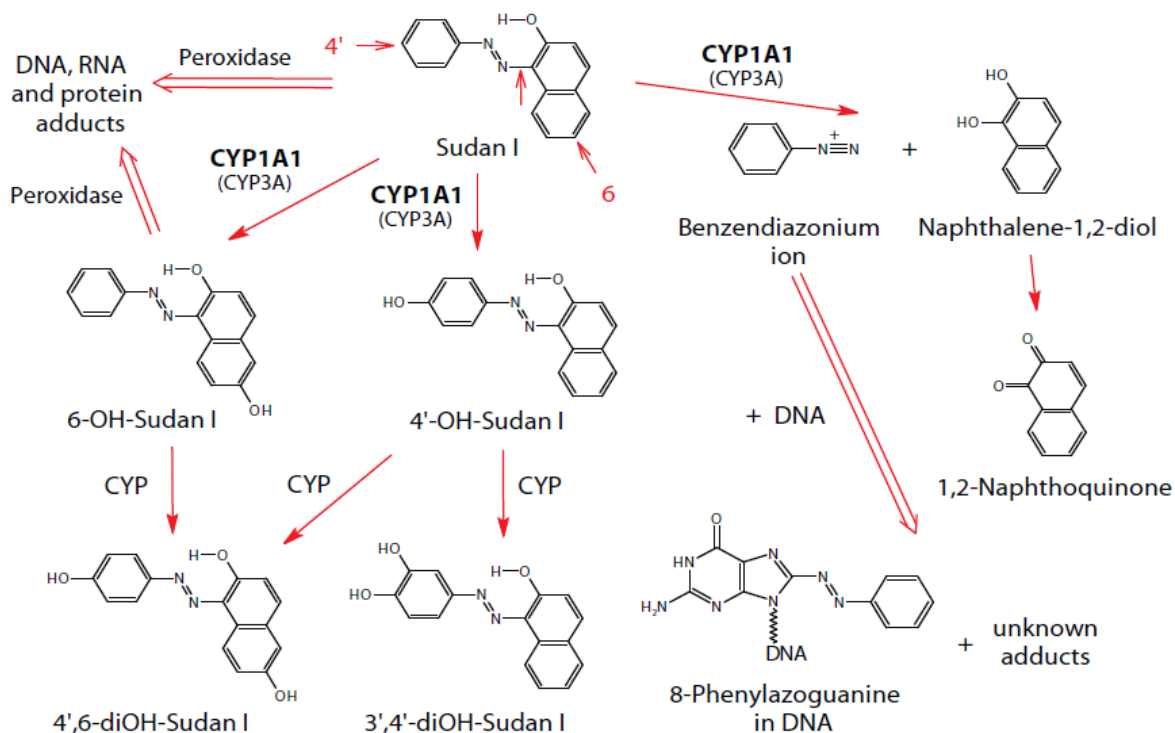
Obrázek 5: Tautomerní formy Sudanu I [18]

Sudan I byl v minulosti používán jako potravinářské barvivo. Dokud nebyl označen za nebezpečný, protože je původce nádorů v játrech, močovém měchýři sledovaných organismů (krys, myši a králíků). V roce 2005 byl označen za genotoxický a karcinogenní pro lidský organismus. Před tímto zjištěním byl označen původcem kontaktní dermatitidy. A přidán na seznam lidských kožních alergenů. I přes tato fakta byl Sudan I používán jako barvivo v chilli koření, či olejích a dalších potravinách. A nadále zůstává významným barvivem pro nejrůznější materiály, jako jsou oleje, benzíny, boty či podlahy. [19]

Metabolická přeměna Sudanu I probíhá v játrech, v kterých dochází k oxidačním či redukčním dějům (Obrázek 6). Studie prokázaly, že oxidační reakce vede k tvorbě hydroxylovaných produktů. V místě 4' benzenového kruhu. Zde dochází ke vzniku 4'-OH-Sudanu I (1-[(4-hydroxyfenyl)azo]-2-naftolu) a ke vzniku 6-OH-Sudanu I (1-(fenylazo)naftalen-2,6-diolu). Vyloučení těchto metabolitů je snadné, ať už samostatně nebo ve spojení s kyselinou glukuronovou či sulfátem. Sudan I může být dále metabolizován i redukčními cestami. U nich dochází k tvorbě 1-amino-2-naftolu a para-amino-fenolu. I zde se jedná o detoxifikační cestu organismu.[20]

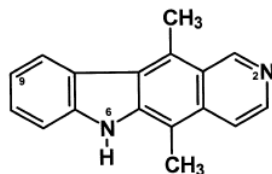
Nicméně dochází i k tvorbě minoritních produktů identifikovaných jako 3',4'-di(OH)-Sudan I (1-[(3,4-dihydroxyfenyl)azo]-2-naftol) a 4',6'-di(OH)-Sudan I (1-[(4-hydroxyfenyl)azo]naftalen-2,6-diol). Také byl rozpoznán produkt oxidačního štěpení azoskupiny. Ten byl detekován pomocí techniky ³²P-postlabeling a jedná se benzendiazoniový iont, stanovený v reakci se zbytky guaninu v DNA jako 8-(fenylazo)guanin. Tento adukt byl detekován po aktivaci pomocí cytochromy P450 a také byl nalezen v jaterní DNA potkanů, kteří byli Sudanu I vystaveni. V DNA močového měchýře však dochází k aktivaci Sudanu I působením enzymů - peroxidas za tvorby odlišných produktů [21,22].

Na biotransformaci Sudanu I se v menším rozsahu podílejí i redukční reakce. Jedním z enzymů, které se podílí na tomto metabolickém ději je NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa.



Obrázek 6: Metabolismus Sudanu I [19]

1.4.2 Ellipticin

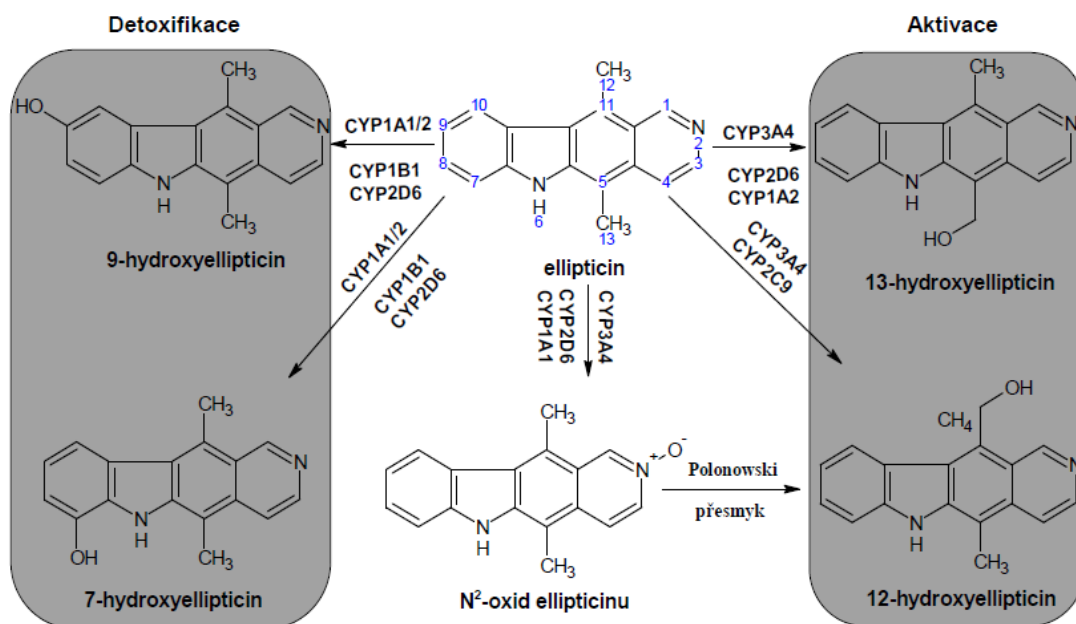


Obrázek 7: Vzorec ellipticinu

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karpazol) (Obrázek 7) a jeho deriváty 9-hydroxyellipticin, 2-methyl-9-hydroxy-ellipticin jsou rostlinné alkaloidy. Pocházejí z rostlin *Apocynaceae*. Ellipticin a jeho polární deriváty se využívají jako protinádorová léčiva. K léčbě karcinomu prsu se využívají především acetáty, ty jsou účinné i na kostní metastáze. Ellipticin je dále účinný proti akutní myeloblastické leukémii, či karcinomu štítné žlázy. Dále vykazuje aktivitu proti HIV. Výhody ellipticinu v klinickém využití jsou vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním, nízká hematologická toxicita a minimální nefrotoxické účinky [23–25].

Ellipticin je v organismu přeměňován na pět metabolitů (Obrázek 8). A to především 9-hydroxyellipticin, dále pak N²-oxid ellipticinu, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin,

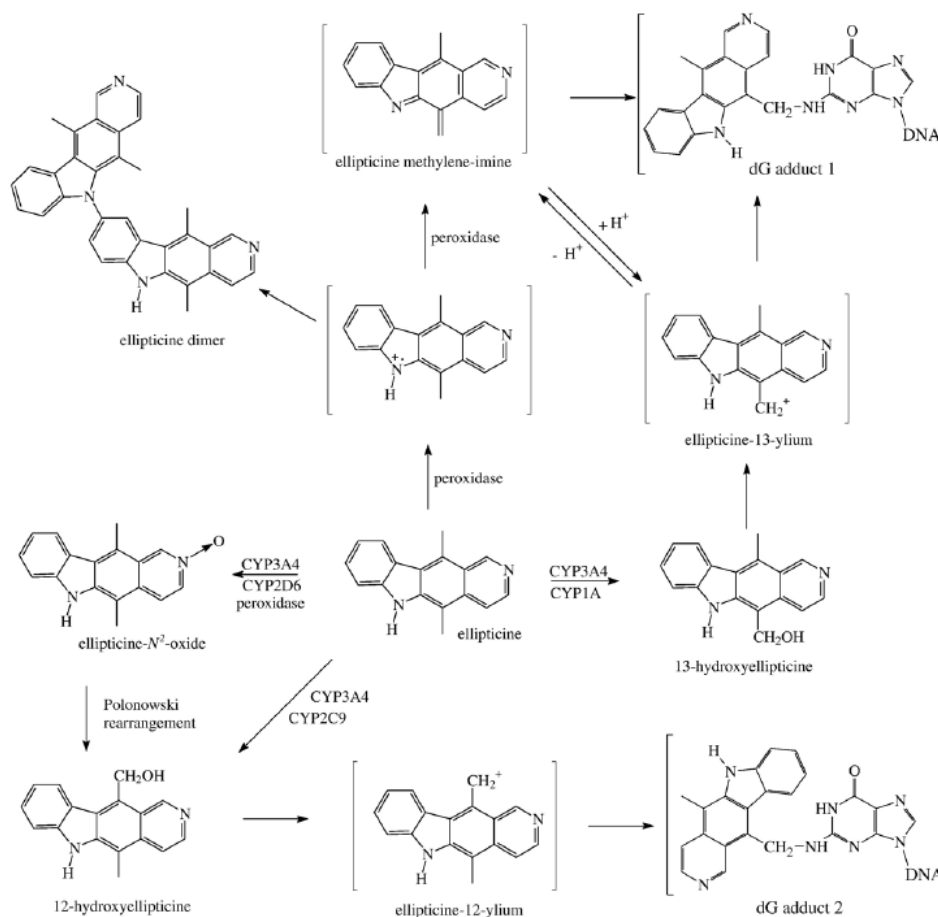
v menší míře pak na 7-hydroxyellipticin. Tyto metabolity jsou tvořeny v jaterních mikrosomech člověka a dalších živočichů (králíka, potkana a myši) [25].



Obrázek 8: Metabolismus ellipticinu pomocí lidských cytochromů P450 [26].

Ellipticin je přeměňován enzymy z rodiny cytochromů P450. Jeho aktivaci způsobují tyto enzymy CYP3A4, 1A 2D6 a 2C9. Zatímco detoxifikační cestu zajišťují enzymy CYP1A1, 1B1 a 2D6. Ellipticin je dále přeměňován peroxidasami [27].

Zatímco CYP jsou exprimovány hlavně v nádorových buňkách prsních a ledvinových, v jiných buňkách jsou jejich množství řádově nižší. Ellipticin je oxidován řadou peroxidas: Myeloperoxidasou (MPO), křenovou peroxidasou (HRP), lidskou cyklooxygenasou (COX-2), ovčí COX-1, nebo hovězí laktoperoxidasou [28,29]. Aduktů těchto metabolitů s DNA se shodují s adukty tvořenými po metabolické aktivaci pomocí CYP (Obrázek 9) [29,30].

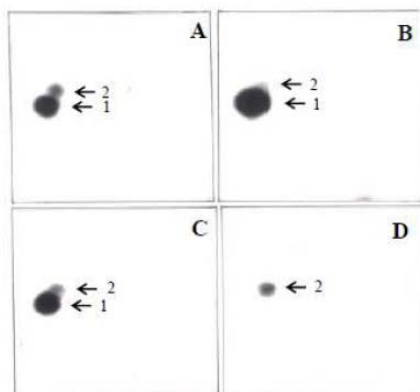


Obrázek 9: Metabolická aktivace ellipticinu za vzniku aduktu s DNA pomocí lidských CYP a peroxidas [30]. (Sloučeniny v závorkách nejsou experimentálně prokázány)

Aktivační metabolity ellipticinu jsou prekurzory sloučenin, které tvoří kovalentní vazbu s DNA a vytvářejí tak adukty. Tyto adukty byly stanoveny pomocí dvou nezávislých metod a to ^{32}P -postlabelingem a pomocí $[^3\text{H}]$ ellipticinu [31]. Tak byly detekovány dva adukty. Majoritní, který vznikl jen v přítomnosti aktivačních enzymů. Zatímco minoritní adukt vznikl samovolně, pravděpodobně autooxidací (Obrázek 10) [31].

Tvorba aduktů byla sledována v tkáních potkana. Dále v plicních fibroblastech křečka (V-97), které byly transfekovány lidskými cytochromy (CYP3A4, 1A1, 1A2). V lidských buňkách byl sledován v neuroblastomech, v prsním adenokarcinomu (MC7-7) a také v leukemických buňkách (HL-60 a CCRF-CEM). Metabolity, které tvoří adukty s DNA, jsou 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin. Zdrojem aduktů také může být N^2 -oxid ellipticinu. Ten podléhá Polonowskiho přesmyku za vzniku 12-hydroxyellipticinu, z něj vzniká reaktivní agens ellipticin-12-ylidium, který vede ke vzniku minoritního aduktu. Majoritní produkt pak

vzniká z 13-hydroxyellipticinu přes ellipticin-13-ylum. Minoritní i majoritní adukty se vážou na deoxygunanosin [27,32].



Obrázek 10: Adukty ellipticinu s DNA detekovány pomocí metody ^{32}P - postlabeling. Adukty vznikly po aktivaci cytochromy P450: A - potkan, B - králík, C - člověk a D - bez enzymové aktivace. 1- majoritní adukt vzniklý aktivací pomocí enzymů. 2 - minoritní produkt vznikající samovolně.[33]

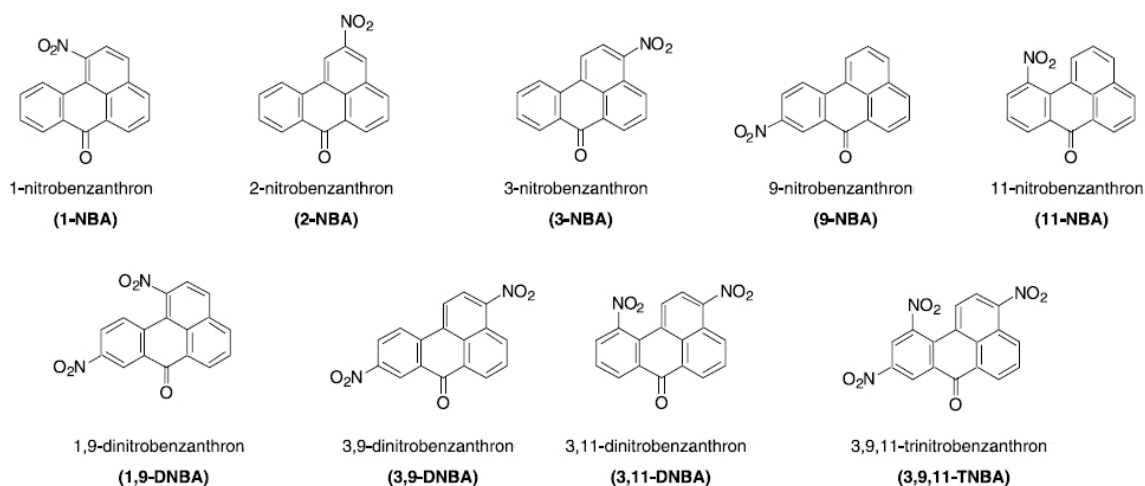
1.4.3 Nitrobenzanthrony

Nitrobenzanthrony (NBA) jsou představitelem látek souhrnně označovaných nitroaromatické polycyklické uhlovodíky (N-PAH). Tyto látky jsou jako skupina významnými polutanty životního prostředí. Mají významné karcinogenní a toxikologické účinky a jsou silně podezřelé jako lidské karcinogeny [13]. I když stále nejsou jako lidské karcinogeny jednoznačně prokázány. Takřka celá skupina projevuje silné mutagenní vlastností v bakteriálních a dokonce savčích buňkách. N-PAH prostupují všechny složky životního prostředí, proto je najdeme adsorbované na prachových částicích, vznikajících jako důsledek intenzivního automobilismu a průmyslu. V povrchových vodách a půdách v okolí sídel a průmyslových aglomerací. O kontaminaci prostředí těmito látkami může svědčit i fakt, že se nacházejí v říčních sedimentech. Dalším zdrojem může být například cigaretový kouř, popřípadě grilovaná jídla [13,34].

První práce, která prokázala přítomnost NBA v životním prostředí, byla uveřejněna roku 1997, její náplní bylo stanovení NBA ve spalinách dieselových motorů a v prachových částicích získaných z ovzduší [35]. Od té doby byly NBA sledovány i v jiných prostředích v různých koncentracích.

Nitrobenzanthrony se utvářejí reakcí mateřské sloučeniny benzanthronu s oxidy dusíku. 3-NBA silně karcinogenní derivát benzanthronu se tak vytváří za atmosférických podmínek. Jeho syntetická příprava však probíhá v atmosféře oxidu dusičitého a ozónu [36,37].

Do současnosti bylo připraveno a zkoumáno pět různých mono derivátů NBA a (jmenovitě 1- nitrobenzanthron (1-NBA), 2- nitrobenzanthron (2-NBA), 3- nitrobenzanthron (3-NBA), 9-nitrobenzanthron (9-NBA), 11-nitrobenzanthron (11-NBA)). Také byly připraveny tři dinitroderiváty benzanthronu, a to 1,9 - dinitrobenzanthron, 3,9-dinitrobenzanthron a jeden trinitroderivát benzanthronu 3,9,11-trinitrobenzanthron (3,9,11-NBA). U těchto derivátů byly jednak zkoumány mutagenní vlastnosti, ale i některé fyzikální konstanty.



Obrázek 11: Strukturální vzorce známých nitro derivátů benzanthronu. [36] První řádek zleva 1-NBA: 1-nitrobenzanthron, 2-NBA: 2-nitrobenzanthron, 3-NBA: 3-nitrobenzanthron, 9-NBA: 9-nitrobenzanthron, 11-NBA: 11-nitrobenzanthron, Druhý řádek zleva 1,9-DNBA: 1,9-dinitrobenzanthron, 3,9-DNBA: 3,9-dinitrobenzanthron, 3,11-DNBA: 3,11-dinitrobenzanthron, 3,9,11-TNBA: 3,9,11-trinitrobenzanthron.

Mutagenní vlastnosti autoři testovali na různých kmenech bakterie *Salmonella typhimurium*, a to v přítomnosti S9 jaterní mikrosomální frakce. Ale i bez ní. Mutagenní vlastnosti těchto látek se pohybují v rozmezí od 6 do 208 400 rev/nmol pro kmen bakterie TA98 bez S9 frakce. S touto frakcí pro stejný kmen se mutagenita pohybuje kolem pouhých 21-1114 rev/nmol [36]. K dalším zajímavým výsledkům studie patří, že mutagenní aktivita NBA je minimálně ovlivněna fyzikálně - chemickými vlastnostmi látky. Tyto vlastnosti byly následující: Energie nejnižšího neobsazeného orbitalu (LUMO), redukční potenciál jednotlivých sloučenin, orientace nitroskupiny a hydrofobní chování. To bylo stanoveno pomocí rozdělovacího koeficientu oktanol - voda získaného z chromatografických dat v jeho logaritmické formě [36].

Rozdělovací koeficient (P) je jednou z fyzikálních vlastností sledovaných látek často spojovaných s chováním sledované látky v organismu. Je definován jako poměr rovnovážných koncentrací látky ve dvou nemísitelných fázích vody a oktanolu. Určuje míru hydrofobního chování chemické látky. Jeho hodnota roste pro sloučeniny s nepolárními

strukturami, jako je více aromatických jader nebo délka řetězce. A nabývá malých hodnot pro sloučeniny s polární skupinou. Běžně se jeho hodnoty pohybují v rozdílu 12 řádů, proto se uvádí jako logP. V různých studiích se používá jako ukazatel schopností prostupovat membránami a interagovat s biologickými receptory [38].

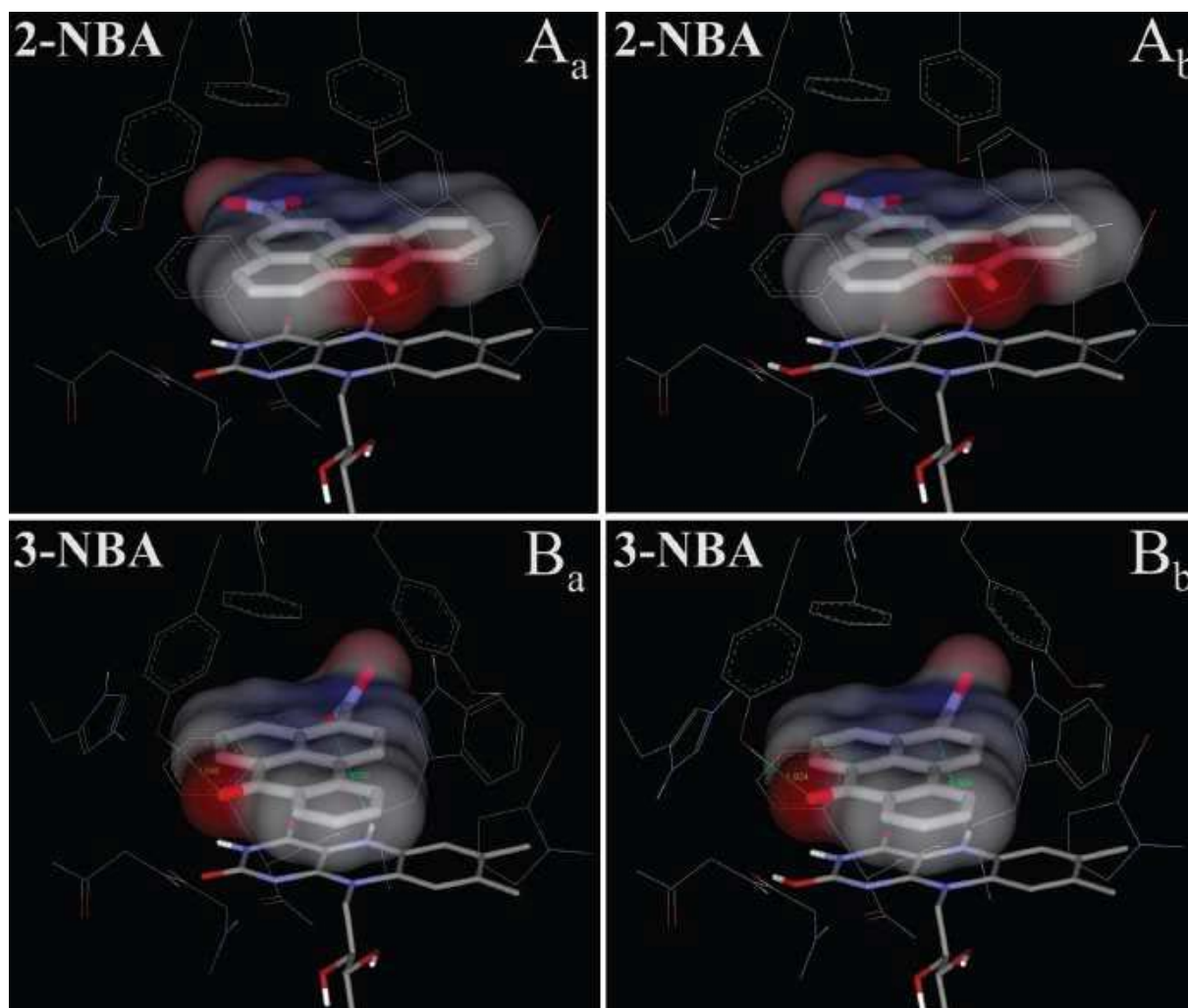
Pro sledované nitrobenzanthrony se hodnoty dekadických logaritmů pohybují v rozmezí od 3,60 do 3,99. Tento rozdíl pouhých 0,39 vedl autory k závěru, že prostupnost nitrobenzanthronů do buněk není rozhodujícím faktorem pro jejich mutagenní aktivitu [36].

Tabulka 1: Přehled fyzikálně - chemických vlastností různých derivátů benzanthronu [36]. Dekadický logaritmus mutagenních vlastností u kmenu TA98, LUMO - energie nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu. E_{red} – redukční potenciál, logP - dekadický logaritmus rozdělovací rovnováhy oktanol - voda znázorňující hydrofobní chování látek a jejich prostupnost přes biologické membrány.

	Log TA98	LUMO (eV)	E _{red} (mV)	Log P	dihedrál ní úhel (stupně °)				
					1	2	3	9	11
1-NBA	3,75	-1.896	-1063	3,60	62,3				
2-NBA	2,20	-1,909	-1113	3,99		1,1			
3-NBA	5,32	-2,099	-987	3,90			0		
9-NBA	4,93	-1,929	-1087	3,79				2,5	
11-NBA	0,78	-1,722	-1084	3,67					64,2
1,9-DNBA	4,62	-2,435	-854	3,75	60,9			0,8	
3,9-DNBA	4,67	-2,605	-833	3,82			0,5	1	
3,11-DNBA	3,52	-2,417	-861	3,79			10,4		69,8
3,9,11-TNBA	4,47	-2,934	-703	3,61			13,8	1,9	63,7

U jiných studií se autoři zaměřili na ultimativní karcinogen - nitreniový ion, který vzniká při metabolické aktivaci nitrobenzanthronů. Zde bylo zjištěno, že mutagenní vlastnosti těchto sloučenin lze dát do souvislosti se stabilitou jejich nitreniového iontu [39]. U jednotlivých látek byl pozorován významný rozdíl u rovnovážných konstant příslušných hydrolytických reakcí vedoucích ke vzniku ultimativního karcinogenu. Tato data ukazují, že metabolity 2-NBA se na příslušný iont rozpadají výrazně neochotněji, a to až o 3 - 4 řády než metabolity nejčastějšího karcinogenního nitrobenzanthronu 3-NBA [40]. Také byly pozorovány rozdíly v redukci 2- a 3-NBA pomocí bakteriálních reduktas a také savčí chinon:oxidoreduktasy [39]. Redukce 2-NBA pomocí chinon:oxidoreduktasy na rozdíl od redukce 3-NBA prakticky

neprobíhá. Proto by se dal 2-NBA označit za špatný substrát reduktasy, a proto je jeho aktivace výrazně pomalejší. Pomocí výpočtů se však odhaduje, že vazba 2-NBA do aktivního místa enzymu probíhá s podobnou afinitou. I když v orientaci méně vhodné k redukci [40]. Mutagenita nitrobenzanthronů se pravděpodobně zvyšuje v savčích buňkách. Tyto organismy obsahují systém sulfotferas a N-acetyltransferas, který participuje na aktivaci díky konjugačním reakcím. Tento systém je jiný než v bakteriálních buňkách [36,41].



Obrázek 12: Porovnání vazby 2- a 3- NBA do aktivního místa NQO1 [40].

2- NBA ve srovnání s 3-NBA

2-NBA (2-NBA, 2-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) na rozdíl od svého izomeru 3-NBA (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) nepatří mezi nejsilnější mutageny.

3-NBA izomer je prokázaným karcinogenem pro hlodavce a potencionálním pro člověka [42]. Genotoxické účinky této látky byly prokázány tvorbou aduktů s DNA, která byla

pozorována *in vitro* v buněčných kulturách a *in vivo* u laboratorních potkanů a myší. Pro 2-NBA byla pozorována jen minimální tvorba aduktů s DNA *in vitro* [34,37,41,43,44].

Oba deriváty jsou hojně zastoupeny ve složkách životního prostředí a byly prokázány teprve nedávno. Byly detekovány ve spalínách dieselových motorů, proto by genotoxickou aktivitou mohli být zasaženi především lidé pracující v dopravě, zaměstnanci čerpacích stanic a pochopitelně různí mechanici autodílen a jiných opravárenských podniků. To potvrzuje nález metabolitů 3-NBA v moči horníků, vystavených zplodinám dieselových motorů. 2-NBA však majoritně vzniká přeměnou v atmosféře [34,37,45–49].

Koncentrace 3-NBA v ovzduší je srovnatelná s běžnými polutanty jako jsou benzo(a)pyren, 1-nitropyren, 1,3-, 1,6-, a 1,8-dinitropyreny. 3-NBA se pohybuje v rozmezí od 0,6 do 6,6 p.p.m. Proto se denní příjem člověka může pohybovat až okolo 90 pg 3-NBA [50]. Některá data ukazují, že obsah 2-NBA ve vzorcích vzduchu může být až 70x větší než 3-NBA. Takto zjištěná koncentrace byla 495 pg/m³ pro 2-NBA, zatímco 3-NBA obsahoval pouhých 6,8 pg/m³ [21]. Proto je divné, že při tak rozdílné možnosti expozice organismu jsem nenašel žádná data, v kterých by byly detekovány metabolity 2-NBA ve vzorcích moči stejně, jak tomu bylo u 3-NBA [37].

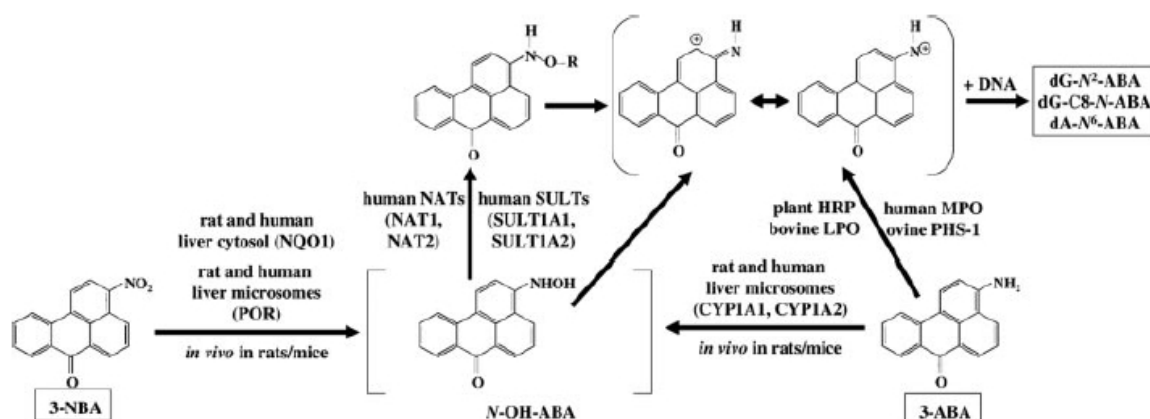
I když některé studie ukazují, že u 2-NBA dochází k tvorbě aduktu s DNA, není stále známa jeho přesná aktivační cesta, na rozdíl u jeho izomeru 3-NBA.

Stanovení aktivační cesty je důležitý krok pro posouzení individuální citlivosti organismů [37]. Na schématu (Obrázek 13) je znázorněna hlavní aktivační cesta 3-NBA v organismu. Hlavní redukční cesta z 3-NBA na N-hydroxy-3-aminobenzanthron (*N*-OH-ABA), která je první částí biotransformace, vede přes nitroredukcí. Ta je katalyzována pomocí cytosolárních reductas, kterými jsou hlavně NA(P)H:chinon-oxidoreduktasa (NQO1), minoritně pak xanthinoxidasa, nebo mikrosomální enzym NADPH:cytochrom-P450-reduktasa (POR) [50–53].

N-OH-ABA je nestabilní [50]. V druhé fázi biotransformace dochází k přeměně na nitreniový nebo karboniový iont. Tyto ionty reagují s DNA za vzniku kovalentních aduktů. Na druhé fázi se podílí N,O-acetyltransferasy (NAT) a sulfottransferasy (SULT), které jsou obsaženy i v jaterních buňkách. U NAT se majoritně podílí NAT 2 a s menším podílem NAT 1. U SULT to jsou pak enzymy SULT1A1 a částečně SULT1A2.

Na schématu (Obrázek 13) je také znázorněna druhá cesta vedoucí ke vzniku *N*-OH-ABA, a to je zpětná oxidace hlavního metabolitu 3-aminobenzanthronu (3-ABA). Proto je oxidace 3-ABA považována za hlavní oxidační cestu. V játrech a v plicích je tento děj katalyzován pomocí enzymů z rodiny cytochromů P450. Jako hlavní enzymy této reakce

vystupují CYP1A1 a CYP1A2. Dalším aktivačním enzymem mohou být peroxidasy, které pro tuto činnost mohou využít peroxid vodíku vzniklý při metabolické aktivaci 3-NBA. Tato cesta převládá v orgánech, ve kterých se CYP1A1 a CYP1A2 vyskytují jen minoritně, jako jsou ledviny, močový měchýř či prsní žlázy. Zástupci, kteří se na tomto mohou podílet, jsou prostaglandin-H-syntasa (PHS), laktoperoxidasa (LPO), myeloperoxidasa. Při těchto reakcích může dojít ke vzniku radikálů, které mohou poškodit DNA [52,53].



Obrázek 13: Schéma metabolické aktivace 3-NBA v organismu [53]. 3-NBA je redukován NQO1 a POR na N-hydroxyaminobenzanthron. Z této látky dále vzniká nitreniový iont, který může přesmyknout na karbokationt.

Adukty 3-NBA a 2-NBA byly detekovány pomocí metody značení radioaktivním fosfátem „³²P-Postlabelling“ a následnou HPLC nebo TLC. Adukty vznikají na purinových bázích a to na deoxyguanosin (dG) a Deoxyadenosin (dA). Poměr aduktů je 70 % (dG) ku 30 % (dA). Vzniklé adukty byly identifikovány jako: 2-(2'-deoxyadenosin-N⁶-yl)-3-aminobenzanthron (dA-N⁶-ABA), N-(2'-deoxyguanosin -N²-yl)-3-aminobenzanthron (dG-N²-ABA) a N-(2'-deoxyguanosin -8-yl)-3-aminobenzanthron (dG-C8-N-ABA) [37].

Nejnověji byl také v moči detekován N-Acetyl-S-(3-aminobenzanthron-2-yl)cystein (3-ABA-MA), a to pomocí hmotnostní spektrometrie (LC-ESI-MS) [54].

I když není známa přesná aktivační cesta 2-NBA, tak se na jejím určení pracuje. Nejnovější stanovení ukazují, že 2-NBA není vhodný substrát pro enzymy, které přeměňují 3-NBA [40,55]. A ke vzniku aduktů s DNA v [41] došlo pravděpodobně pomocí jiných, zatím neurčených enzymů [55,56].

1.5 Enzymy podílející se na biotransformaci xenobiotik

1.5.1 Systém monooxygenas se smíšenou funkcí.

Systém monooxygenas se smíšenou funkcí nebo též mikrosomální monooxygenasový systém (MFO) se podílí na oxidačních, oxygenačních a dokonce redukčních reakcích. Skládá se z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, cytochromu P450 a fosfolypidové membrány. Dále může fakultativně obsahovat cytochrom b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasu.

U eukaryot je MFO umístěn na vnější straně membrány endoplasmatického retikula (ER) převážně v orgánech, ve který je vyšší koncentrace xenobiotik, jako jsou především játra, plíce a GIT. Sám se zde pak podílí na první fázi biotransformace. V přírodě se vyskytují tři systémy MFO. Krom výše zmíněného může existovat tzv. mitochondriální enzymový systém P450. Ten je umístěn na vnitřní straně mitochondriální membrány a skládá se z membránového cytochromu P450 a z rozpustného NADPH-P450 redukujícího systému. Tento MFO systém byl detekován pouze v živočišné říši. Třetím typem je bakteriální systém, který má již obě složky volně rozpustné v cytoplasmě [5,57].

1.5.2 Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1.)

V případě cytochromu P450 se jedná o hemový enzym podílející se na oxidačních dějích v metabolismu lipofilních látek. CYP je hemthiolátový protein, který se skládá z přibližně 500 aminokyselin a prosthetické skupiny protoporfyrinu IX. Železo vázané v CYP je vázáno přes thiolátovou skupinu cysteinu na rozdíl od klasických cytochromů, kde je vázáno přes imidazolový zbytek histidinu.

Lidské CYP se dělí na 18 rodin a 44 podrodin. Bylo identifikováno 57 funkčních cytochromů, které mají nejružnější funkční substrátovou i tkáňovou specifitu [58].

CYP existují ve dvou spinových formách. První z těchto forem je forma vysokospinová, v které se ion železa vyskytuje v pentakoordinovaném stavu a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované. Spin má tedy hodnotu 5/2. Ion železa se drží nad rovinou porfyrinového skeletu. Druhá nízkospinová forma se vyznačuje tím, že železo je v hexakordinovaném stavu a spin nabývá hodnoty 1/2. Ion může interagovat s jiným ligandem. Atom železa se vyskytuje v rovině kruhu [59].

CYP vystupuje v systému MFO jako terminální oxidasa, která přímo katalyzuje zabudování atomu kyslíku do molekuly substrátu. Všechny funkce, kterých může cytochrom P450 nabývat, jsou následující: Oxidasová, v které dochází k aktivaci molekuly kyslíku pro

další oxygenasovou reakci CYP. Oxygenasová, ve které je aktivovaný kyslík včleněn do molekuly substrátu. Peroxidasová, kdy je kyslík nahrazen peroxidem bez spotřeby NADPH. Redukční, při které není aktivován kyslík, protože je vázán substrát jako 6 ligand. Poslední možnou funkcí je produkce peroxidu vodíku a aktivních forem kyslíku. To nastává v případě, když aktivovaná molekula kyslíku není zabudována do molekuly substrátu, ale je uvolněna do prostoru. Tam z ní zpravidla vzniká peroxid vodíku [14,59].

Druhý kyslík z molekuly je redukován na vodu. Elektrony k tomu potřebné jsou zajištěny NADPH:cytochrom P450 reduktasou [14,59].

1.5.3 NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (EC 1.6.5.2)

Je dalším enzymem, který se podílí na biotransformaci xenobiotik, tentokrát redukční cestou.

Tento enzym je představitelem skupiny flavoproteinů. Své redukční vlastnosti uplatňuje na široké spektrum látek, jako jsou chinony, naftochinony a azo- či nitrosloučeniny. NQO1 funguje jako dvouelektronová reduktasa, která může využívat NADH i NADPH jako kofaktory[60].

NQO1 se vyskytuje v cytosolu buněk eukaryotních organismů. U savců je nejvíce exprimován v játrech. Je to homodimer, který obsahuje v každém centru jednu prosthetickou skupinu FAD. Aktivní centrum je tvořeno z obou podjednotek. V případě působení NQO1 se setkáváme s ping-pongovým mechanismem. Při tomto mechanismu dochází k redukcí flavinového kofaktoru pomocí pyridinových nukleotidů. Oxidovaný nukleotid se uvolní a následně váže substrát. Použitím heterodimerů bylo zjištěno, že podjednotky enzymu NQO1 fungují v případě dvouelektronových redukčních reakcí nezávisle na sobě [60,61].

1.6 Spektrofotometrie

Použití spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné části spektra (UV - VIS) je základní metodou stanovení v biochemické laboratoři. Většina biologicky aktivních látek kromě sacharidů má v této oblasti specifické absorpční pásy a jejich koncentraci lze stanovit na základě spektrálních vlastností. O oblasti UV spektra mluvíme při absorpci při vlnových délkách přibližně od 180 do 400 nm [62]. O viditelném spektru se hovoří při vlnových délkách od 400 do 750 nm [62,63].

Pro UV - VIS spektrofotometrii mají základní význam kvantované přechody elektronů ze základního do excitovaného stavu. Díky kvantování jednotlivých hladin mají význam jen ty fotony, které splňují podmínku, že jejich energie odpovídá energii přechodu elektronu mezi

hladinami. Rámcově se zde uplatňují přechody mezi σ (vazebný) a σ^* (antivazebný). Tyto absorbují ve vzdálené UV oblasti a nejsou pro běžná stanovení použitelná. Daleko významnější přechody π (vazebný) a π^* (antivazebný) a n (nevazebný), které absorbují při vyšších vlnových délkách, jsou charakteristické pro molekuly s násobnými vazbami. Přechody $n \rightarrow \pi^*$ a $n \rightarrow \sigma^*$ jsou významné pro přechody látek s heteroatomy [63,64].

Čistě elektronová spektra by měla poskytnout čárové linie (spektra). Nicméně při běžném stanovení za laboratorní teploty získáváme spektra, ve kterých se zohledňuje i vibrace a rotace molekul, to vede k získání spojitých spekter. Na tvar spekter má kromě teploty vliv i použité prostředí, čím polárnější, tím více dochází k vyhlazování linií. Rozpouštědlo má také vliv na posun absorpčních maxim [63,64]. Části molekuly, které mají své specifické absorpční pásy, se označují jako chromofory. Typickým chromoforem je peptidová vazba s absorpčním pásmem v rozmezí 200 - 225 nm, absorpce bází nukleových kyselin při 260 nm [63,64].

Vlastností absorpce spojené s určitými chromofory se využívá při enzymových reakcích, v kterých se může sledovat specifická absorbance NAD(P)H při 340 nm a její změna v průběhu reakce. Také se spektrofotometricky dá stanovit množství cytochromu P450 pomocí komplexu s CO po redukcí hemu. Takto vzniklý komplex má při vlnové délce 450 nm specifický absorpční pás [63,64].

Základem kvantifikačních spektrofotometrických metod je Lambertův - Beerův zákon (Rovnice 1), který je spojením dvou samostatných zákonů. Lambertův zákon stanovuje závislost změny intenzity světla prošlého vzorkem na změně délky kyvety. Zatímco Beerův zákon stanovuje závislost této intenzity na změně koncentrace. Jejich spojením získáme výsledný zákon, který se nejčastěji zapisuje:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Rovnice 1

Kde „A“ je absorbance (záporný dekadicky logaritmus transmitance). „ ε “ značí extinkční (molární absorpční koeficient) „c“ je koncentrace sledovaného roztoku a „l“ je délka optického prostoru.

2 Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo stanovit rozpustnost vybraných modelových karcinogenů (Sudanu I, ellipticinu a nitrobenzanthronů) ve vodném prostředí pomocí spektroskopických technik. Dílčími cíli pak bylo určit extinkční koeficienty studovaných látek ve vodě i v methanolu. Ověřit k tomuto účelu již dříve zavedené spektroskopické metody pro stanovení rozpustnosti málo rozpustných látek a tuto techniku dále vylepšit za účelem zvýšení její citlivosti. Vylepšenou metodiku pak použít k určení rozpustnosti látky s velmi nízkou rozpustností ve vodě (2-NBA). Bude-li to možné ověřit rozpustnost zájmových sloučenin také další metodikou a výsledky porovnat.

3 Materiál a metody

3.1 Laboratorní přístroje a chemikálie

Přístroje:

Spektrofotometr Hewlett - Packard 8453(HP 8453) s diodovým polem

Membránová čistírna vody s UV lampou-Millipore Simplicity 182

Ultrazvuková lázeň Elma E30H Elmasonic

Vodní lázeň

Centrifuga Beckmann ALEGRA x22R

Centrifuga Eppendorf 5418

Analytické váhy OHAUS discovery DU216CD

Třepačka Yellow-line

Chemikálie:

Deionizovaná voda

Fosfátový pufr o pH7

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. **LACHNER** Česká republika

Hydrogenfosforečnan didraselný p.a. **LACHNER** Česká republika

Ellipticin 5 a 10 mg **FLUKA** Švédsko

Sudan Yellow pro HPLC **BRITISH DRUG HOUSE** Velká Británie

2-nitrobenzanthron dar Doc. H.H. Schmeisera, Německé centrum pro výzkum rakoviny v Heidelbergu

Metanol pro chromatografické využití 99,9% **LACHNER** Česká republika

Dimethylsulfoxid 99,5% GC **ALDRICH - SIGMA** Německo

Software:

UV- VIS Chemstation Agilent

MS Excel 2003, Microsoft Corporation

Další vybavení

Mikroinjekční stříkačky 1 a 5 μ l

Skleněné dělené pipety 25, 2 a 1 ml

Kyvety s optickou drahou 9 cm (sklo), 3 cm (sklo) a 1 cm (křemen)

Teploměr

3.2 Metoda a postup práce

3.2.1 Příprava zásobních roztoků

Navážka Sudanu byla převedena do skleněné lahve se zábrusem a rozpuštěna v metanolu na výslednou koncentraci Sudanu, která byla 1 mmol/l. Roztok byl při rozpouštění hodinu protřepáván a před použitím byl ponechán ve tmě dva dny. Kontrola celkového rozpuštění proběhla centrifugací na centrifuze Eppendorf malého vzorku zásobního roztoku a vizuální kontrolou sedimentu na dně mikrozkuřavky. Výsledný roztok byl jasně červeno oranžové barvy a po dobu práce byl stabilní.

Navážka elliptycinu byla rozpuštěna v methanolu a uchována ve skleněné zábrusové láhvi. Výsledná koncentrace byla 1 mmol/l. Roztok byl míchán na třepačce yellow line po dobu tří hodin. Úplné rozpuštění bylo kontrolováno, jako v předchozím případě, centrifugací a hledáním sraženiny v mikrozkuřavce. Výsledný roztok byl žlutě zářící.

Navážka 2-NBA byla rozpuštěna v dimethyl sulfoxidu (DMSO) tak, aby vznikl roztok o koncentraci 0,5 mmol/l. Byl zahříván a sonikován v sondační lázni Elmasonic opakovaně po 30 sekundách, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění. To bylo kontrolováno opět stáčením na centrifuze Eppendorf. Roztok byl nevýrazně žlutý. Pro použití byl následně roztok ředěn DMSO na výslednou koncentraci 0,273 mmol/l.

3.2.2 Práce se spektrofotometrem a použité nastavení

Práce byla vypracována na jednopaprskovém spektrofotometru HP 8453 s diodovým polem. Spektrofotometr měří v rozsahu od 190 do 1100 nm s krokem jeden nanometr. Pro měření v této škále je vybaven dvěma lampami. V rozmezí vlnových délek 190 - 800 nm používá nízkotlakou deuteriovou lampu. Druhá wolframová lampa měří v rozmezí 340- 1100 nm[65]. Pro práci se spektrofotometrem jsem použil software od společnosti Agilent UV - Vis chemstation v němž jsem si připravil následující nastavení:

Sudan I:

Pro měření absorbance Sudanu ve vodných roztocích jsem použil nastavení, které snímalo fixní vlnové délky ze spektra. A to 484 nm jako vlnovou délku maximální absorpce. Další dvě vlnové délky 350 nm a 600 nm jako referenční vlnové délky pro růst zákalu.

Integrační doba během záznamu jednoho spektra byla 5 s a délka skleněné kyvety 3 cm (Obrázek 14, vpravo).

Pro měření metanolových roztoků byla použita integrační doba 5 s, ale délka kyvety jen 1 cm. Za vlnovou délku odpovídající maximální absorpci byla určena vlnová délka 285 nm a k ní lokální minima v 214 a 340 nm.

Ellipticin:

Ellipticin jsem měřil při stejné integrační době. Délka kyvety byla ve všech měřeních 1 cm. Pro měření ve vodných roztocích jsem vybral referenční vlnové délky o 260 a 330 nm. Největší hodnota absorpce byla u vlnové délky 300 nm. V metanolovém roztoku jsem jako vlnovou délku největší hodnoty absorpce zvolil 285 a jako referenční vlnové délky 250 a 320 nm.

2-NBA:

Ke sledování vodných roztoků 2-NBA jsem použil stejný integrační čas, nicméně použité kyvety měly objem 500 ml a optickou dráhu 9 cm (Obrázek 14, vlevo). Vlnová délka maximální absorpce pro vodný roztok byla zvolena 404 nm. Jako reference 345 a 600 nm.



Obrázek 14: Kyvety pro měření vyšších objemů. Kyveta s optickou drahou 9 cm (vlevo). Kyveta s optickou drahou 3 cm (vpravo). Včetně stojánku k upevnění do přístroje.

3.2.3 Korekce vlnových délek

K redukci šumů se běžně používá více bodová korekce na pozadí, k tomu se využívají dvě referenční vlnové délky, které ji ohraničují [65].

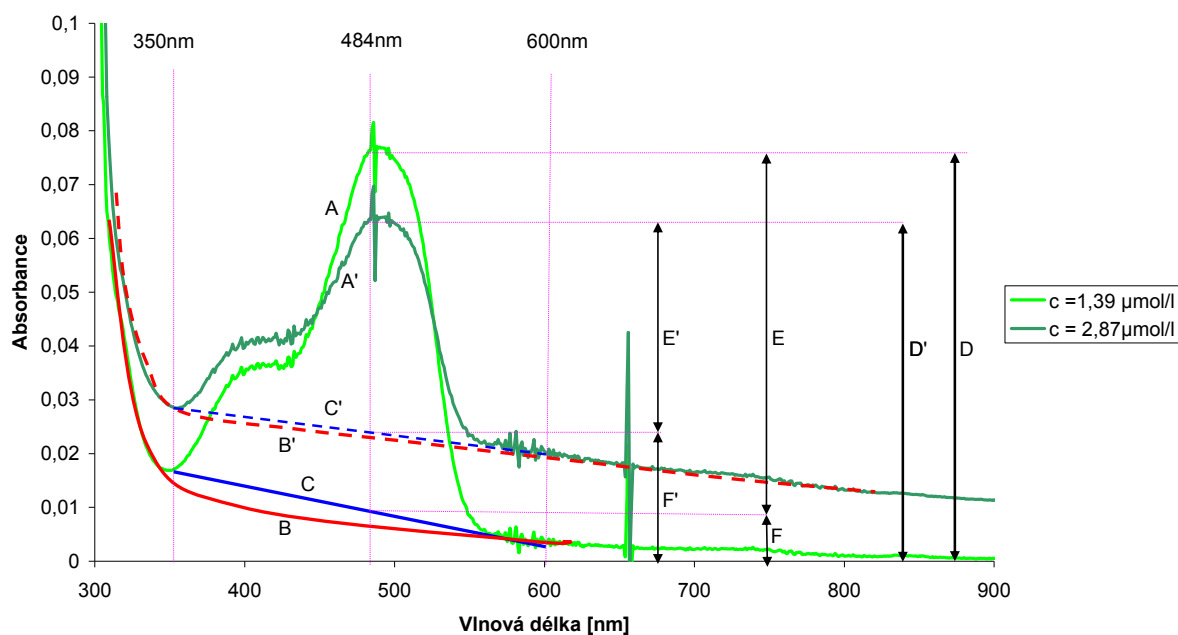
Na grafickém znázornění korekce (Obrázek 15) jsou vidět dvě spektra zobrazující absorpční maximum Sudanu ve vodném roztoku. Spektrum A odpovídá absorpci látky při teoretické koncové koncentraci 1,39 $\mu\text{mol/l}$. Zatímco A' odpovídá teoretické koncové koncentraci 2,87 $\mu\text{mol/l}$. Nicméně teoretickou koncentrací se myslí taková, která by vznikla po přidání zásobního metanolového roztoku, pokud by byla látka zcela rozpustná. Tedy teoretická koncentrace odpovídá látce v kapalně i pevné fázi obsažené v kyvetě. Na těchto spektrech byly zvoleny 3 vlnové délky, a to 350 nm, 484 nm a 600 nm.

Vlnová délka 350 nm je referenční délkou paty vrcholu, kde by měla být minimální absorpce. Jedná se ale jen o lokální minimum, protože v systému absorbují i jiné látky, nebo chybu měření, tedy zde dochází k balastní absorpci (červená křivka B a B'). Vlnová délka 484

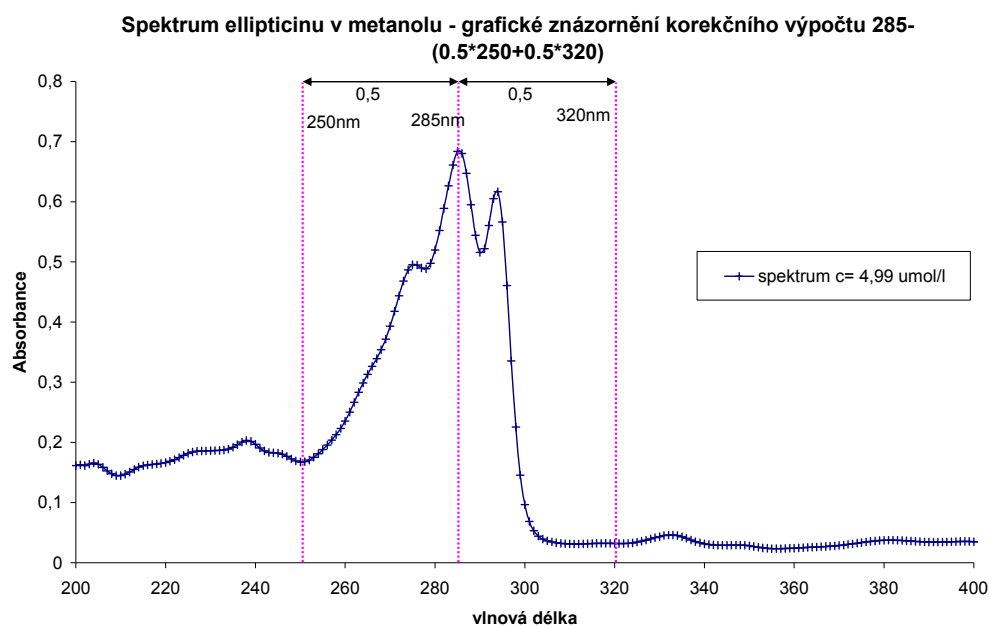
nm odpovídá takové vlnové délce, která se pohybuje u maximální hodnoty absorpce Sudanu. Maximální absorpce je znázorněna šipkou D a D'. Druhou referenční délkou je délka 600 nm, která je v místech u zadní paty vrcholu a zde by v pravém roztoku neměla absorbovat jiná látka obsažená v systému. Při porovnání spekter A a A' zjistíme, že u spektra A' dochází k zvýšení u referenčních délek. A dokonce k poklesu v okolí absorpčního maxima. To bereme jako projev přechodu absorpčního spektra na spektrum rozptylové. K získání čisté absorpce (šipky E a E') použijeme korigovanou vlnovou délku, kterou získáme lineárním proložením rozptylové křivky v rozmezí referenčních délek (linka C a C'). V oblasti, která odpovídá vlnové délce maxima (na obrázku vlnová délka 484 nm), odečteme přírůstek rozptylu (šipka F a F'). Ten získáme odečtením váženého průměru absorbancí referenčních vlnových délek od absorpance odpovídající maximu.

Vliv jednotlivých referencí byl vážen podle vzdálenosti od maxima, čím blíže - tím větší váha. Grafické znázornění pro vodný roztok Sudanu a benzanthronu je zobrazeno ve spektrech těchto látek (Obrázek 17, Obrázek 18). Pro metanolové roztoky je korekce znázorněna na spektru ellipticinu (Obrázek 16). Účinnost takto získané korekce je znázorněna na grafu (Obrázek 19). Na tomto grafu jsou znázorněny dvě závislosti růstu absorpance na růstu koncentrace. Přičemž jedna je korigovaná. Korigovaná délka roste pomaleji a v koncentracích, kde dochází ke srážení, dojde k nárůstu chyby. Přímka se pak zalomí u koncentrací, kde vzniká již makroskopická sraženina.

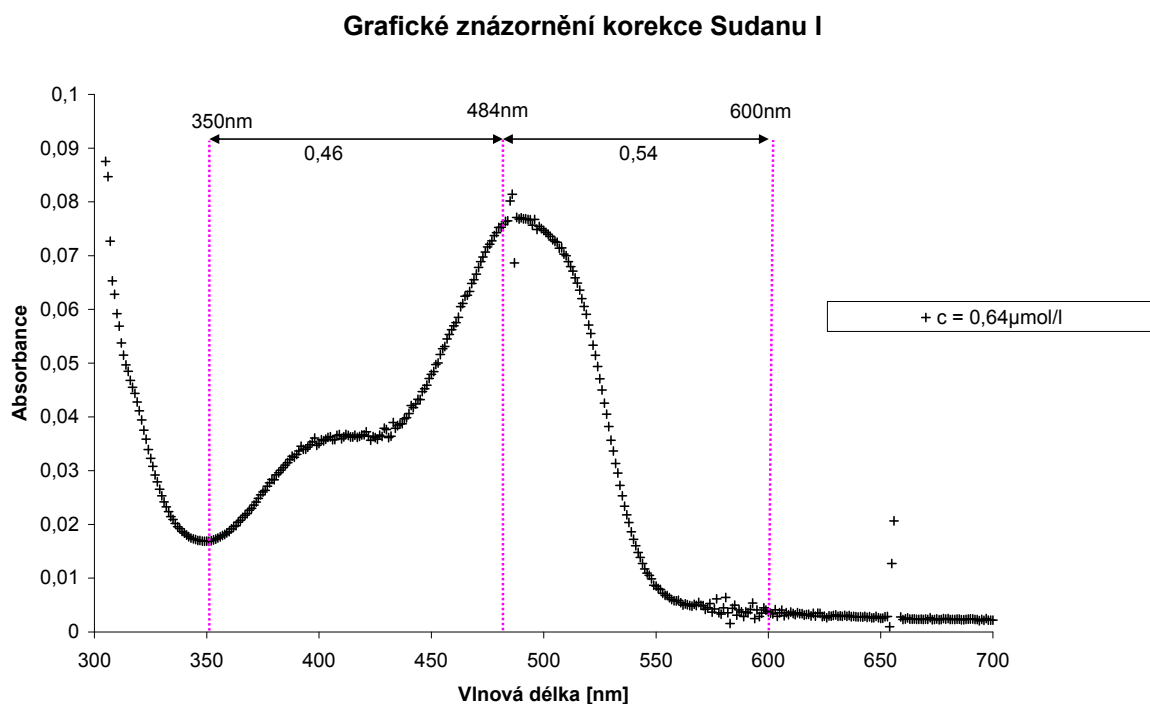
Grafické znázornění korekce na pozadí u vodných roztoků Sudanu I



Obrázek 15: Ilustrační obrázek korekce na pozadí. Linky A a A' zobrazují spektra Sudanu I ve vodném roztoku. A odpovídá koncentraci celkového Sudanu I v kyvetě $1,39 \mu\text{mol/l}$ A' odpovídá koncentraci $2,87 \mu\text{mol/l}$. Červené linky B a B' znázorňují přidavek balastu k celkové absorpci. Modré úsečky C a C' znázorňují lineární proložení křivek B a B'. Šipky D a D' znázorňují maximální absorpci v místě blízko absorpčního maxima. Šipky E a E' pak znázorňují absorpční hodnoty roztoků očištěných od balastu. Úsečky F a F' jsou pak znázorněním balastní absorpce.

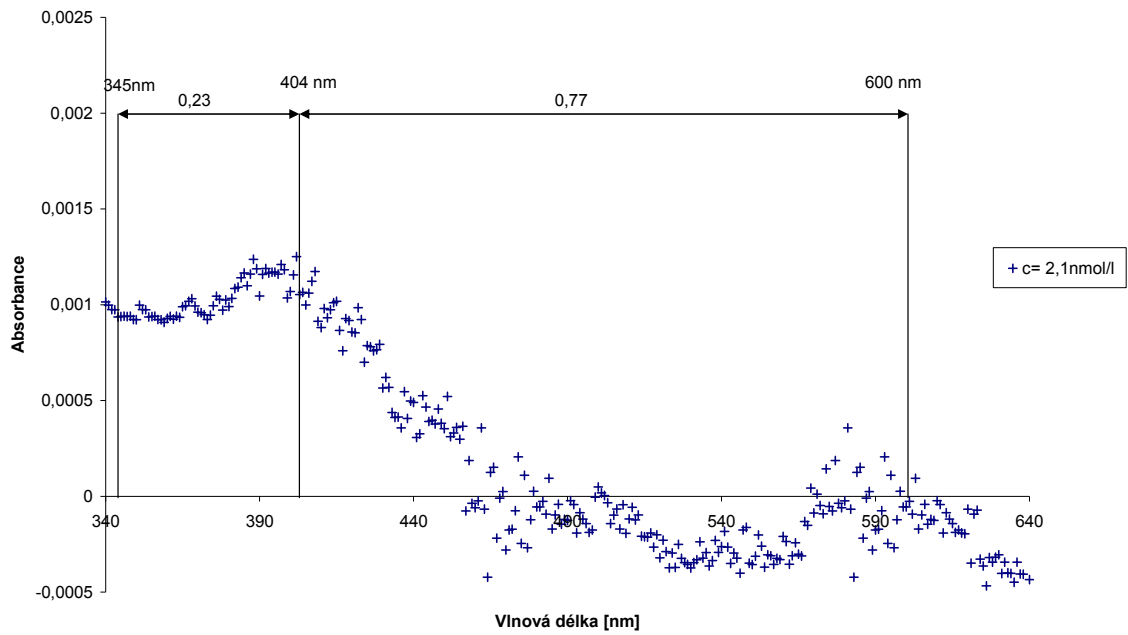


Obrázek 16: Spektrum ellipticinu v metanolu odpovídající koncentraci 4,99 $\mu\text{mol/l}$ při teplotě 23 $^{\circ}\text{C}$



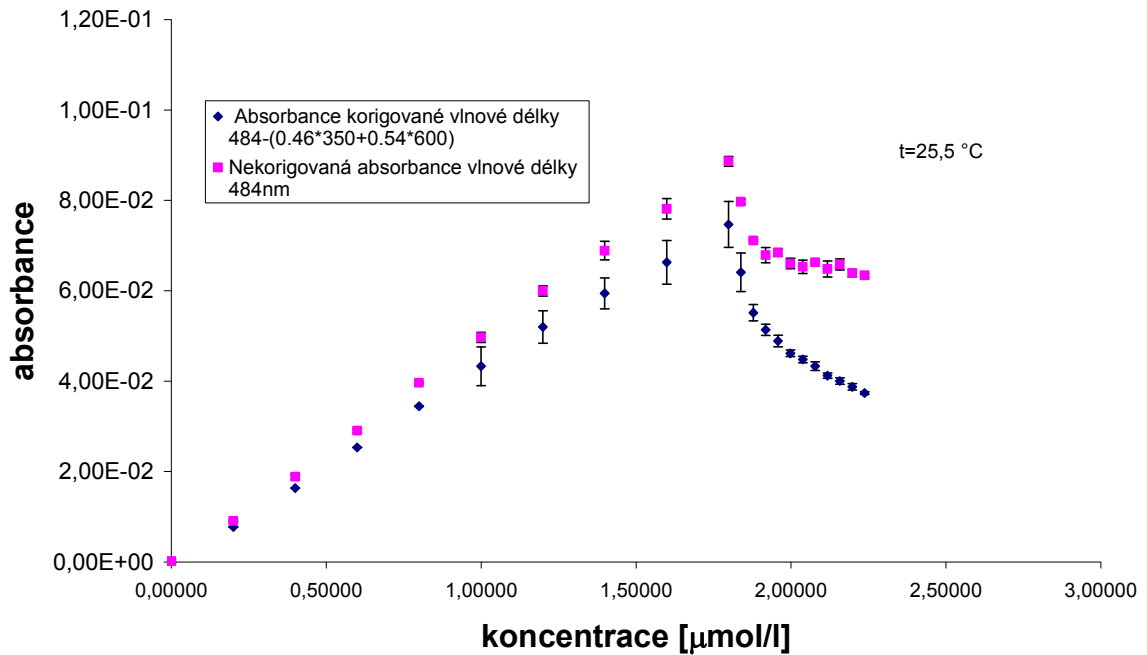
Obrázek 17: Grafické znázornění korekce $\{A_{484} - (0.46 \cdot A_{350} + 0.54 \cdot A_{600})\}$ Sudanu pro vodný roztok a koncentraci $c = 0,64 \mu\text{mol/l}$. Při teplotě 24,5 $^{\circ}\text{C}$.

Spektrum 2- nitrobenzanthronu ve vodě



Obrázek 18: Spektrum 2-NBA ve vodě odpovídající koncentraci 2,1 nmol/l při teplotě 24°C. Grafické znázornění korekčního výpočtu $A_{404} - (0.77 * A_{345} + 0.23 * A_{600})$.

Stanovení maximální rozpustnosti Sudanu I pro korigovanou vlnovou délku



Obrázek 19: Znázornění účinnosti korekce ve vodném roztoku Sudanu I

Protože každá látka má své specifické absorpční pásy, u kterých ještě může vlivem rozpouštědla docházet k posunu, byly stanoveny tyto korigované hodnoty (Tabulka 2).

Tabulka 2: Přehled korigovaných vlnových délek pro jednotlivé látky a rozpouštědla

Rozpouštěná látka	Rozpouštědlo	Rovnice
Sudan I	voda	$A_{484}-(0.46 \cdot A_{350}+0.54 \cdot A_{600})$
	metanol	$A_{481}-(0.48 \cdot A_{350}+0.52 \cdot A_{600})$
Ellipticin	voda	$A_{300}-(0.43 \cdot A_{260}+0.57 \cdot A_{330})$
	metanol	$A_{285}-(0.5 \cdot A_{250}+0.5 \cdot A_{320})$
2-NBA	voda	$A_{404}-(0.77 \cdot A_{345}+0.23 \cdot A_{600})$

3.2.4 Všeobecná ustanovení k metodám.

Součástí všech metod bylo použití skleněného nádobí při práci s karcinogeny. Tím se omezovala sorpce těchto lipofilních látek na plastické špičky, či stěny mikrozkuvek. V případech, kde bylo použití plastového nádobí nezbytné, jako byla centrifugace, je vše uvedeno.

Ke statistickému zpracování výsledku byl použit program Microsoft Office Excel 2003. Ze statistických funkcí, které tento program nabízí, byly použity funkce:

PRŮMĚR (číslo1, číslo2,...) která stanoví průměr z 1 až 30 hodnot [66].

SMODCH která určí směrodatnou odchylku (SD), je definována vztahem (Rovnice 2), kde „x“ je střední hodnota výběru PRŮMĚR (číslo1, číslo2,...) a „n“ je velikost hodnoty [66].

$$= \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Rovnice 2

3.2.5 Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků Sudanu I a ellipticinu

Ke stanovení extinkčního koeficientu byl použit následující postup. Do různých objemů vody (3ml, 20ml a 25ml) byl mikrozkuvkou přidáván zásobní roztok Sudanu I v metanolu,

také o různých objemech (0,3 až 5 μ l). Difuze do celého objemu byla zajištěna promícháním pomocí skleněné tyčinky a byl jí dán čas 5 minut. Po této době bylo změřeno spektrum. Podle objemu buď v křemenné kyvetě s 1cm optickou drahou nebo ve skleněné kyvetě s 3cm optickou drahou. Z tohoto spektra se vybraly referenční vlnové délky. Ty byly vyneseny do grafu, lineární část byla proložena regresní přímkou, z její směrnice se vypočetl extinkční koeficient. Takto bylo změřeno vždy minimálně 10 přídavek. Při stanovení byla zaznamenávána teplota.

U ellipticinu se postupovalo analogicky. Také byl přidáván 1mM roztok v methanolu do přebytku pufru o pH = 7. Tam se zamíchal skleněnou tyčinkou a po době 5 minut se proměřil. Objem vody byl u ellipticinu konstantní (3 ml) a měnil se jen krok přídavek. Měření se prováděla v kyvetách s optickou drahou 1 cm. Velikost přídavek zásobního roztoku byla 0,3 - 5 μ l. Nastavení spektrofotometru pro tuto metodu je popsáno výše. Počty přídavek vždy přesáhly deset. Z nich byla použita lineární část pro stanovení extinkčního koeficientu.

3.2.6 Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků 2 - NBA

Tato metoda v principu vycházela ze stejného základu, jako dvě předcházející. I zde byly přidávány mikrolitry (0,5 - 50 μ l) různě koncentrovaných roztoků 2-NBA v DMSO. Přídavky byly důkladně rozmíchány v objemech vody 400 - 500 ml. Jako kyveta zde posloužila čtverhranná skleněná láhev o objemu 1000 ml, kterou jsem do přístroje upevnil pomocí moduritového stojánku (Obrázek 14). Protože docházelo k ohřívání kyvety, byla pod moduritový stojánek ještě umístěna izolační folie o šířce půl centimetru. Tato folie omezila ohřívání na minimum. Tato skleněná kyveta propouštěla vlnové délky v rozmezí 320 - 900 nm.

3.2.7 Stanovení extinkčních koeficientů u metanolových roztoků Sudanu I.

Stanovení extinkčních koeficientů u Sudanu I probíhalo přidáváním metanolového roztoku do kyvety s obsahem rozpouštědla (3 ml). Po každém přídávku 5 μ l bylo vše řádně zamícháno, pak se čekalo 5 minut, než došlo k proměření spektra. Ze spektra se odečetly vlnové délky, z nich se vypočetla korekce. A tato korekce byla použita pro výpočet extinkčního koeficientu. Optická dráha zde byla 1 cm. Přídavek bylo maximálně pět.

I při stanovení ellipticinu se vycházelo z pěti přídavek (5 μ l) zásobního metanolového roztoku do přebytku metanolu (3 ml). Dále se vše promíchalo skleněnou tyčinkou a nechalo 5

minut ustálit. Pak se změřilo spektrum a z vybraných vlnových délek se vypočetla korekce. Touto korekcí se proložila lineární regresní přímka. Na konci stanovení byla změřena teplota.

3.2.8 Stanovení rozpustnosti pomocí ověření platnosti Lambertova - Beerova zákona

Tato stanovení probíhala analogicky s metodami určování extinkčních koeficientů ve vodných roztocích, jen s přidáváním zásobních roztoků se pokračovalo do chvíle, než došlo k zřetelné odchylce od linearity. Doba mezi jednotlivými přídávky byla vždy více než 5 minut. Na konci stanovení byla změřena teplota.

3.2.9 Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly Sudanu I

Roztok byl připraven navážením Sudanu I do půllitrové kónické baňky. K němu bylo přidáno 500 ml vody. Roztok se opakovaně zahříval k 60°C, a pak se za intenzivního třepání ochlazoval na laboratorní teplotu. Následně byl nechán 5 dní ve tmě, aby se ustálil. Pak byl proměřen. Následně byl proměřen po 21 dnech a po 25 dnech, kdy se nechal ještě 24 hodin promíchávat na třepačce.

3.2.10 Stanovení koncentrace roztoku nad sraženinou elliptycinu ve vodě.

Sraženina byla získána z měření rozpustnosti pomocí odchylky od Lambertova - Beerova zákona (3 ml). Byla převedena do skleněné nádoby, ve které byla nechána 2 dny, aby se usadila. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 2 ml, které byly stočeny na centrifuze eppendorf (15 minut 14 000 rpm), v plastové mikrozkuhavce. Tento roztok byl následně změřen v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm. Na konci stanovení byla změřena teplota.

3.2.11 Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly elliptycinu a Sudanu I v metanolu.

Krystaly elliptycinu byly ve skleněné lahvičce částečně rozpuštěny v metanolu. Navážka byla připravena pro vznik 6 mmol/l roztoku v 5 ml metanolu. Roztok se nechal 2 hodiny třepat a následně ustálit tři dny ve tmě. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 3 a 5 μ l, tyto objemy se přidaly do nadbytku metanolu, kde se proměřilo spektrum podle nastavení pro metanolové roztoky elliptycinu. V křemenné kyvetě o optické dráze jeden centimetr. Výsledná koncentrace se získala výpočtem z kalibrační přímky s ohledem na ředění. Na konci stanovení byla změřena teplota.

Stanovení rozpustnosti Sudanu bylo provedeno obdobně jako předcházející stanovení ellipticinu. Navážka na stanovení však byla připravena na vznik 30 mmol/l roztoku. Následně se již pracovalo analogicky.

4 Naměřená data a výsledky

4.1 Stanovení extinkčních koeficientů

Pro každou látku byly extinkční koeficienty stanovovány v sérii pro čistou absorpci při vlnové délce s maximální absorpcí a pro její korigovanou hodnotu (Tabulka 2).

4.1.1 Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků Sudanu I

Extinkční koeficienty ϵ_{484} a $\epsilon_{484\text{kor}}$ pro Sudan I ve vodě a pro vlnovou délku odpovídající hlavnímu absorpčnímu pásu ve viditelné oblasti (484 nm). Výsledná hodnota extinkčních koeficientů $\epsilon_{484}=0,016 \pm 0,06 \text{ l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ byla získána jako průměr z 16 měření (Tabulka 3). Tato hodnota však vykazovala nižší reprodukovatelnost a vyšší směrodatnou odchylku (cca 38 %). Proto byla pro většinu měření používána hodnota absorpance korigovaná na případný vliv zákalu a kolísání nulové linie u použitého jednopaprskového spektrofotometru, viz kapitola 3.2.3 na str. 36. Výsledná hodnota korigovaného extinkčního koeficientu $\epsilon_{484\text{kor}}$ je $0,013 \pm 0,02 \text{ l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Tabulka 3 Přehled stanovení extinkčního koeficientu Sudanu I ve vodě

číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [l.μmol ⁻¹ .cm ⁻¹] **	korigovaný extinkční koeficient* [l. μmol ⁻¹ .cm ⁻¹]
1.	0,0299	3	0,011	0,010
2.	0,0391	3	0,017	0,013
3.	0,0307	3	0,012	0,010
4.	0,0436	3	0,019	0,015
5.	0,0363	3	0,014	0,012
6.	0,0343	3	0,012	0,011
7.	0,0398	3	0,037	0,013
8.	0,0327	3	0,013	0,011
9.	0,0098	1	0,010	0,010
10.	0,0227	3	0,009	0,007
11.	0,0411	3	0,014	0,014
12.	0,0416	3	0,016	0,014
13.	0,0418	3	0,016	0,014
14.	0,045	3	0,016	0,015
15.	0,048	3	0,016	0,016
16.	0,0469	3	0,017	0,016
Průměr			0,016	0,013
±SD			0,006	0,002

* korigovaná $A_{484} - (0.46 * A_{350} + 0.54 * A_{600})$

** A_{484} bez korekce

4.1.2 Stanovení extinkčních koeficientů v pufrovaných vodných roztocích ellipticinu

Extinkční koeficienty ϵ_{300} a ϵ_{300kor} pro ellipticin ve vodě a pro vlnovou délku určenou jako maximu absorpce 300 nm a její korigovanou hodnotu. Byla zprůměrována celkem z 5 hodnot jednotlivých směrodatných odchylek viz tabulka (Tabulka 4). Výsledná hodnota byla

stanovena pro nekorigovanou vlnovou délku $\epsilon_{300}=0,016 \pm 0,06 \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a pro korigovanou vlnovou délku $\epsilon_{300\text{kor}}=0,013 \pm 0,02 \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Tabulka 4 Přehled stanovení extinkčních koeficientů ellipticinu ve vodě při 25°C

číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [$\text{l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$] **	korigovaný extinkční koeficient* [$\text{l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$]
1.	0,0584	1	0,066	0,058
2.	0,0651	1	0,075	0,065
3.	0,0645	1	0,076	0,065
4.	0,0578	1	0,068	0,058
5.	0,0626	1	0,078	0,063
Průměr			0,073	0,062
±SD			0,005	0,003

* korigovaná $A_{300}-(0.43*A_{260}+0.57*A_{330})$

** A_{300} bez korekce

4.1.3 Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků 2 - NBA

Extinkční koeficienty ϵ_{404} a $\epsilon_{404\text{kor}}$ pro 2-NBA ve vodě a pro vlnovou délku určenou jako maximum absorpce 404 nm a její korigovanou hodnotu. Byla zprůměrována celkem z 5 hodnot jednotlivých směrodatných odchylek viz tabulka (Tabulka 5). Výsledná hodnota byla stanovena pro nekorigovanou vlnovou délku $\epsilon_{404}=\pm 1.\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a pro korigovanou vlnovou délku $\epsilon_{404\text{kor}}=0,049 \pm 0,008 \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Tabulka 5: Přehled stanovení extinkčních koeficientů 2-NBA ve vodě

číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [l.μmol ⁻¹ .cm ⁻¹] **	korigovaný extinkční koeficient* [l. μmol ⁻¹ .cm ⁻¹]
1.	0,4849	9	0,085	0,054
2.	0,3225	9	0,056	0,036
3.	0,3918	9	0,047	0,044
4.	0,5351	9	0,059	0,056
5	0,4832	9	0,093	0,054
Průměr			0,07	0,049
±SD			0,02	0,008

* korigovaná $A_{404} - (0.77 * A_{345} + 0.23 * A_{600})$

** A_{404} bez korekce

4.1.4 Stanovení extinkčních koeficientů u metanolvých roztoků Sudanu I.

Extinkční koeficienty ϵ_{481} a ϵ_{481kor} pro Sudan I metanolu pro jeho vlnovou délku určenou jako maximum absorpce 481 nm a její korigovanou hodnotu. Byly zprůměrovány z 3 hodnot jednotlivých směrníc viz tabulka (Tabulka 6). Výsledná hodnota byla stanovena pro nekorigovanou vlnovou délku $\epsilon_{481} = 0,016 \pm 0,0002 \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a pro korigovanou vlnovou délku $\epsilon_{481kor} = 0,014 \pm 0,001 \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Tabulka 6: Přehled stanovení extinkčních koeficientů Sudanu I v metanolu 23°C

číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [l.μmol ⁻¹ .cm ⁻¹] **	korigovaný extinkční koeficient* [l. μmol ⁻¹ .cm ⁻¹]
1.	0,0139	1	0,016	0,014
2.	0,0141	1	0,016	0,014
3.	0,0141	1	0,016	0,014
Průměr			0,016	0,014
±SD			0,0002	0,0001

* korigovaná $A_{481} - (0.48 * A_{350} + 0.52 * A_{600})$

** A_{481} bez korekce

4.1.5 Stanovení extinkčních koeficientů u metanolvých roztoků ellipticinu

Extinkční koeficienty ϵ_{285} a ϵ_{285kor} pro ellipticin metanolu pro jeho vlnovou délku určenou jako maximum absorpce 300 nm a její korigovanou hodnotu. Byly zprůměrovány z 3 hodnot jednotlivých směrníc viz tabulka (Tabulka 6). Výsledná hodnota byla stanovena pro nekorigovanou vlnovou délku $\epsilon_{285} = 0,044 \pm 0,0001$ l.μmol⁻¹.cm⁻¹ a pro korigovanou vlnovou délku $\epsilon_{285kor} = 0,015 \pm 0,001$ l.μmol⁻¹.cm⁻¹

Tabulka 7: Přehled stanovení extinkčních koeficientů ellipticinu v metanolu při teplotě 23°C

číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [l.μmol ⁻¹ .cm ⁻¹] **	korigovaný extinkční koeficient* [l.μmol ⁻¹ .cm ⁻¹]
1.	0,115	1	0,138	0,115
2.	0,114	1	0,133	0,114
3.	0,114	1	0,133	0,114
Průměr			0,135	0,114
±SD			0,0021	0,0004

* korigovaná $A_{285} - (0.5 * A_{250} + 0.5 * A_{320})$

** A_{285} bez korekce

4.2 Stanovení rozpustnosti jednotlivých látek

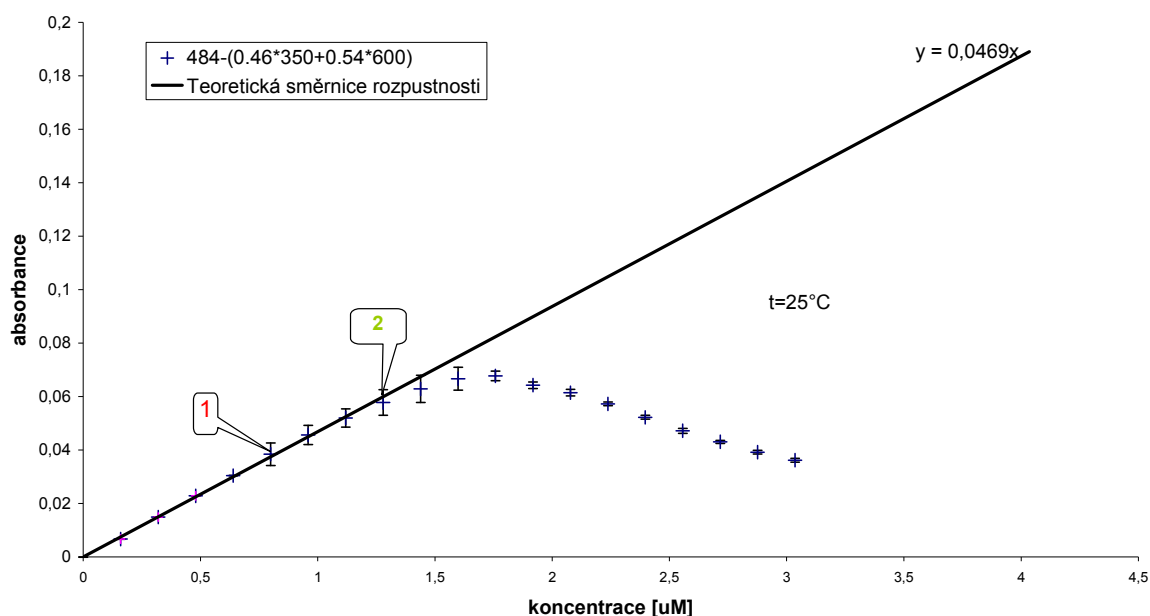
K určení maximální možné rozpustnosti Sudanu I, ellipticinu a 2-NBA ve vodě byly použity dvě spektroskopické metody. První metoda byla založena na sledování absorbance vodného roztoku Sudanu I tedy ověření Lambertova - Beerova zákona. Druhá pak využívala zjištěné hodnoty extinkčního koeficientu k výpočtu koncentrace nad nerozpuštěným Sudanem I a ostatními látkami.

4.2.1 Stanovení rozpustnosti pomocí ověření platnosti Lambertova - Beerova zákona

Sudan I:

Do vody byl přidáván roztok Sudanu I v metanolu. A byl sledován nárůst absorbance odpovídající absorpčnímu maximu zvolenému pro Sudan I ve vodě (484 nm). Korigovanému na případný zákal (Tabulka 2). Ze získaných dat pro korigovanou vlnovou délku byl sestrojen graf závislosti korigované vlnové délky na celkové koncentraci v roztoku (rozpuštěný i vysrážený),

Stanovení rozpustnosti Sudanu I pomocí Lambertova - Beerova zákona



Obrázek 20: Graf závislosti koncentrace na absorbanci korigované vlnové délky pro Sudan I. „Bod 1“ místo nárůstu rozptylu odpovídá koncentraci 0,87 $\mu\text{mol/l}$. „Bod 2“ odklon od Lambertova -Beerova zákona.

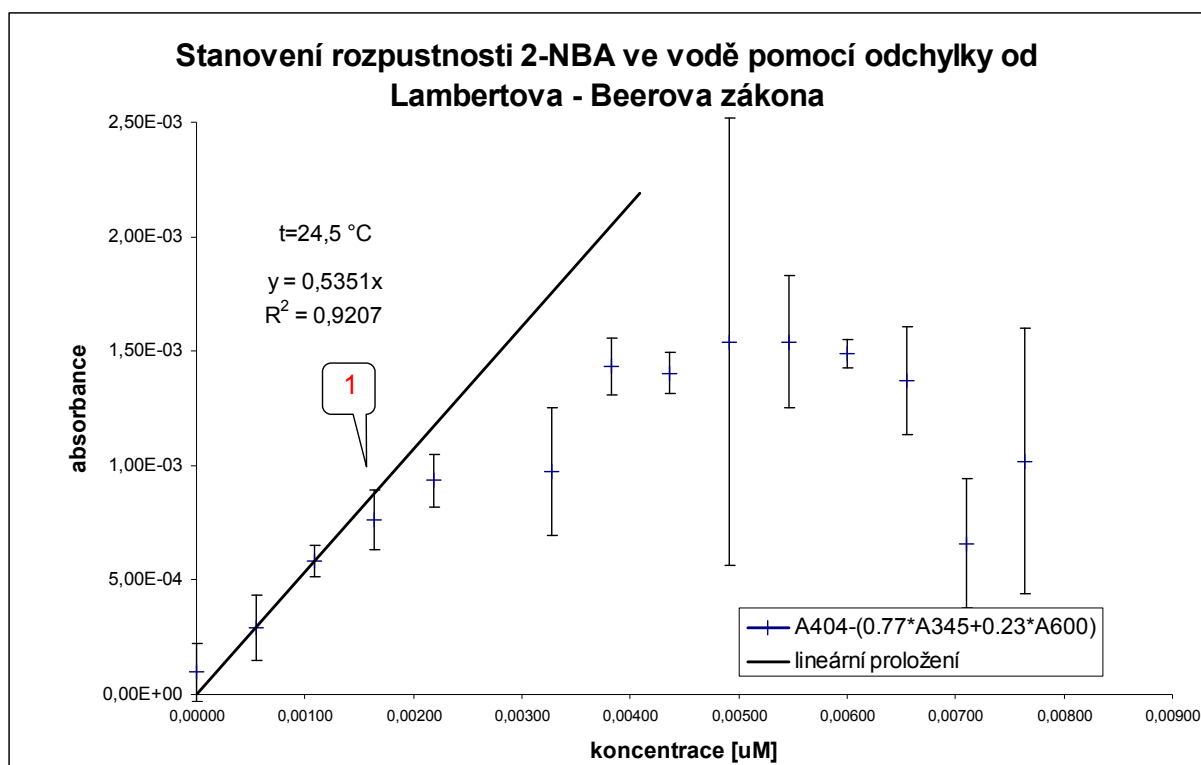
Linearita stoupání je na grafu vidět až do hodnoty 1,11 $\mu\text{mol/l}$. Na grafu je patrný odklon již v hodnotě 1,23 $\mu\text{mol/l}$ - bod 2. Nicméně podle nárůstu chyb měření (vždy byla provedena 3 měření pro jeden přídavek) je patrné, že ke změnám v roztoku dochází již kolem hodnoty výsledné koncentrace 0,87 $\mu\text{mol/l}$ - bod 1. Další výsledky potvrzují, že k vysrážení dochází při průměrné koncentraci kolem 1 $\mu\text{mol/l}$ (Tabulka 8).

Tabulka 8: Přehled intervalů rozpustnosti Sudanu I ve vodě. Rozmezí koncentrací, při kterých dochází ke vzniku sraženiny Sudanu I.

Velikost přídatku/objem kyvety (μl)	Výrazný nárůst chyby měření [μmol/l]	Odklon od linearity [μmol/l]	T (°C)
4/2500	0,87	1,23	25
1/2500	0,91	1,03	26,5
5/2500	0,99	1,29	-
0,5/25000	0,83	0,99	26
5/2500	0,99	1,19	24,5
Průměrná hodnota:	0,92	1,1	
SD	0,06	0,1	

2-Nitrobenzanthron

Do vody byl přidáván slabě koncentrovaný zásobní roztok 2-NBA v DMSO. Tento roztok byl intenzivně zamíchán a nechán stát přibližně 5 minut, aby se 2-NBA dostal do celého objemu. Každý přídatek byl s časovým odstupem třikrát proměřen. Objem rozpouštědla byl 500ml a délka optické dráhy 9 cm.



Obrázek 21: Stanovení rozpustnosti 2-NBA ve vodě pomocí odchyly Lambertova - Beerova zákona. Chybové úsečky ukazují chybu vypočtenou ze třech paralelních měření.

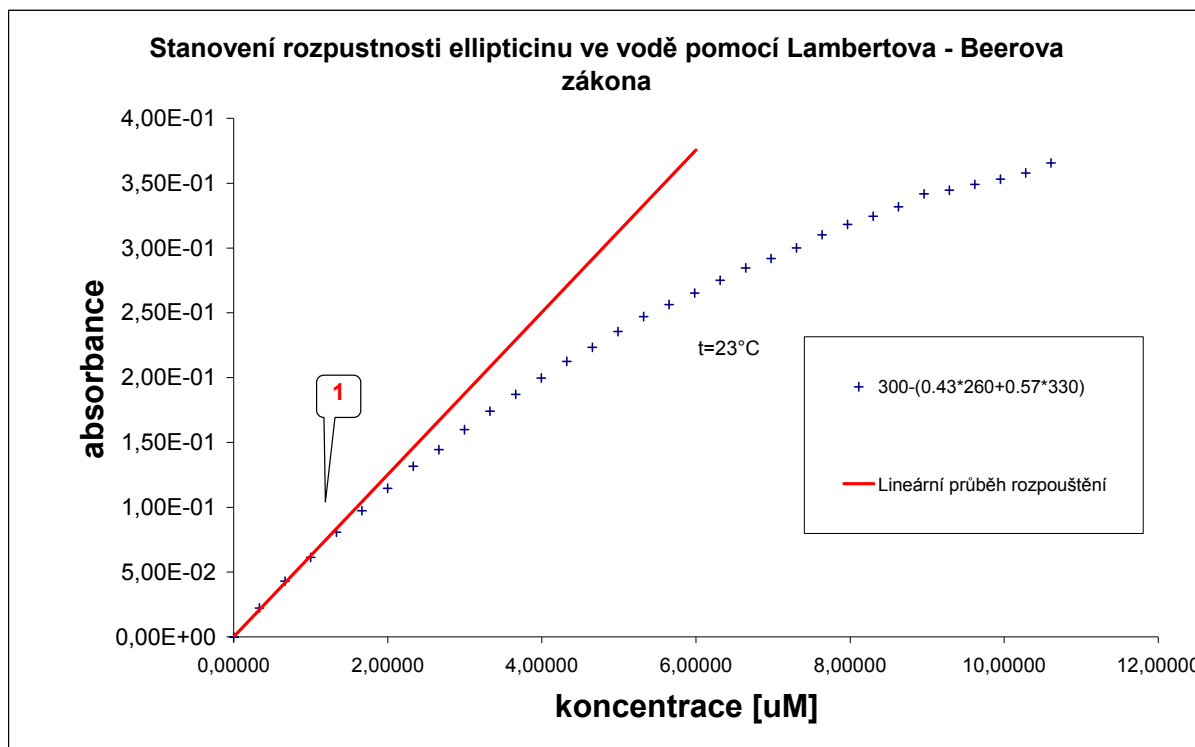
Tabulka 9: Stanovení rozpustnosti 2-NBA ve vodě

Velikost přídávku/objem rozpouštědla (μl)	Odklon od linearity [$\mu\text{mol/l}$]	T ($^{\circ}\text{C}$)
0,5/500 000	0,0038	26
1/500 000	0,0016	24,5
1/500 000	0,0054	27,5
0,5/500 000	0,006	24
0,5/500 000	0,0032	24,5
Výsledná koncentrace:	0,004\pm0,002	

Ellipticin:

Do vody byl přidáván roztok Ellipticinu v metanolu. A byl sledován nárůst absorbance odpovídající absorpčnímu maximu zvolenému pro Ellipticin ve vodě (300 nm) korigovanému

na případný zákal (Tabulka 2). Ze získaných dat pro korigovanou vlnovou délku byl sestrojen graf závislosti korigované vlnové délky na celkové koncentraci v roztoku (rozpuštěný i vysrážený) (Obrázek 1).



Obrázek 22: Graf závislosti koncentrace na absorbanci korigované vlnové délky pro ellipticin. „Bod 1“ odklon od Lambertova -Beerova zákona.

Na grafu (Obrázek 22) je vidět, že k odchylce od Lambertova - Beerova zákona dochází již při hodnotě 1,33 $\mu\text{mol/l}$. Bohužel nemůžeme zjistit, jestli dochází k nárůstu šumu v předchozích hodnotách, protože nebyl pořízen dostačující počet hodnot pro každý přídavek zásobního roztoku. Doba od přídavku do změření byla 5 minut v zájmu difúze do celého objemu a zamezení tvorby koncentračních fluktuací. Výsledná koncentrace pak byla změřena z následujících hodnot (Tabulka 10) a výsledná rozpustnost byla stanovena jako $1,2 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$.

Tabulka 10: Stanovení rozpustnosti ellipticinu ve vodě

Velikost přídávku/objem kyvety (μl)	Odklon od linearity [μmol/l]	T (°C)
0,5/3000	1,23	23
1/3000	1,33	23,5
0,5/3000	0,99	23
0,3/3000	1,19	23,5
Průměr:	1,2±0,1	

4.2.2 Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly Sudanu I

Hodnoty koncentrace nad krystaly byly měřeny při korigované vlnové délce pro Sudan I ve vodných roztocích. Byly stanoveny 5 dní (22°C) po rozpuštění a po 21 dnech (21°C), a také po 25 dnech (22°C). Při teplotě roztoku 22°C bylo pH = 6,56. Výslednou koncentraci Sudanu I nad krystaly měřenou touto metodou jsem nakonec stanovil z dat zjištěných pro 21. a 25. den. A výsledná hodnota byla $0,16 \pm 0,01$ μmol/l.

Tabulka 11: přehled výpočtu koncentrací roztoků nad krystaly Sudanu I

číslo měření	A_{484kor}^*	extinkční koeficient [l* μ mol ⁻¹ *cm ⁻¹]	délka kyvety [cm]	Koncentrace [μ mol/l]
Po 5 dnech				
1.	$9,60 \cdot 10^{-3}$	0,013	3	0,246
2.	$9,07 \cdot 10^{-3}$	0,013	3	0,233
Po 21 dnech				
1.	$5,66 \cdot 10^{-3}$	0,013	3	0,145
2.	$6,35 \cdot 10^{-3}$	0,013	3	0,163
3.	$7,26 \cdot 10^{-3}$	0,013	3	0,186
4.	$5,69 \cdot 10^{-3}$	0,013	3	0,145
Po 25 dnech				
1.	$6,80 \cdot 10^{-3}$	0,013	3	0,174
2.	$6,53 \cdot 10^{-3}$	0,013	3	0,167
3.	$6,46 \cdot 10^{-3}$	0,013	3	0,166

* korigovaná $A_{484} - (0.46 \cdot A_{350} + 0.54 \cdot A_{600})$

4.2.3 Stanovení koncentrace roztoku nad sraženinou elliptcinu ve vodě.

Koncentrace nad sraženinou byla stanovena pomocí již známého extinkčního koeficientu pro korigovanou vlnovou délku maximální absorpce (kapitola 4.1.2). Pomocí této hodnoty byla pak maximální rozpustnost dopočtena. Pro hodnoty získané změřením připravených roztoků (kapitola 3.2.10). Výsledná koncentrace byla stanovena následovně.

Tabulka 12: Znázornění výpočtu koncentrace nad sraženinou ellipticinu ve vodě.

číslo měření	A_{300kor}	extinkční koeficient [l* μ mol ⁻¹ *cm ⁻¹]	délka kyvety [cm]	Koncentrace [μ mol/l]
1.	0,0820	0,062	1	1,32
2.	0,0788	0,062	1	1,27
Po centrifugaci				
1.		0,062	1	0,898

* korigovaná $A_{300}-(0.43*A_{260}+0.57*A_{330})$

** A_{300} bez korekce

4.2.4 Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly Sudanu I v metanolu.

Z kalibrační přímky byl získán extinkční koeficient pro výpočet koncentrace Sudanu I v metanolu. Rozpustnost následně byla stanovena z korigované absorbance roztoku nad sraženinou. Tento roztok se proměřoval naředěn v křemenné kyvetě (1 cm) a objemu metanolu 3 ml. Přídavek roztoku byl pouhých 0,5 μ l a teplota po celou dobu měření nepřesáhla 22 °C

Tabulka 13: Stanovení rozpustnosti Sudanu I v metanolu při 22°C

číslo měření	A_{kor}^*	extinkční koeficient [l* μ mol ⁻¹ *cm ⁻¹]	délka kyvety [cm]	Koncentrace v kyvetě [μ mol/l]	Maximální rozpustnost [mmol/l]
1.	0,1691	0,014	1	12,08	12,153
2.	0,1726	0,014	1	12,329	12,403
3.	0,1652	0,014	1	11,807	11,878
4.	0,1757	0,014	1	12,553	12,954

* korigovaná $A_{481}-(0.48*A_{350}+0.52*A_{600})$

Výsledná koncentrace pak byla získána výpočtem ze 4 měření přídávku nad sraženinou Sudanu I. Maximální rozpustnost Sudanu I v metanolu pak byla stanovena jako $12,3 \pm 0,4$ mmol/l.

4.2.5 Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly ellipticinu v metanolu.

Ke stanovení byl použit extinkční koeficient pro korigovanou vlnovou délku (Tabulka 2). Výsledná hodnota směrnice metanolu byla stanovena ze tří přímek. Ta pak byla použita k výpočtu maximální koncentrace. Roztok ellipticinu byl ředěn, aby byla koncentrace v rozmezí kalibrační přímky. Výsledná koncentrace byla určena jako $4,23 \pm 3 \cdot 10^{-3}$ mmol/l.

Tabulka 14: Znázornění výpočtu koncentrace nad krystaly ellipticinu

číslo měření	A_{kor}	extinkční koeficient [$l \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	délka kyvety [cm]	Koncentrace v kyvetě [$\mu\text{mol/l}$]	Maximální koncentrace [mmol/l]
1.	0,4803	0,114	1	4,204	4,225
2.	0,4813	0,114	1	4,213	4,234
3.	0,4808	0,114	1	4,208	4,229
4.	0,4807	0,114	1	4,207	4,232

* korigovaná $A_{285} - (0.5 \cdot A_{250} + 0.5 \cdot A_{320})$

** A_{285} bez korekce

5 Diskuze

Pro spektrofotometrická stanovení byla zvolena absorpční maxima, která se v daném úseku spektra jevila jako nejintenzivnější. Zatímco ve viditelné oblasti byla intenzita maximálně v setinách, v blízké ultrafialové oblasti byla absorbance výrazně intenzivnější (desetiny). Metody, kterými byl měřen Sudan I ve vodě, využívaly vlnové délky v oblasti VIS spektra, speciálně vlnovou délku 484 nm, i když tato látka vykazuje absorpční maximum při cca 490 nm. Tato vlnová délka byla zvolena, i když se nejedná o absolutní maximum, kvůli výskytu několika vadných pixelů na detektoru v oblasti maxima (490 nm). Proto byla zvolena nejvyšší hodnota ještě před touto chybou. Výhodou volby měření VIS oblasti byla větší variabilita při výběru kyvet, protože jsem mohl měřit v kyvetě s delší optickou dráhou (3 cm) a také ve větších objemech (25 ml).

Pro stanovení rozpustnosti Sudanu I v metanolu byla použita vlnová délka 228 nm. Zde bylo zvoleno intenzivnější spektrum, na úkor objemu a optické dráhy, protože metoda vykazovala dostatečně reprodukovatelné výsledky.

Rozpustnost elliptycinu byla proměřovaná při vlnových délkách 300 nm pro vodu a 285 nm pro metanol. Obě tyto hodnoty byly měřeny v kyvetě o optické dráze 1 cm. A data byla reprodukovatelná.

Pro 2-NBA bylo provedeno jen stanovení při 404 nm. Ve skleněné kyvetě o optické dráze 9 cm. Teprve toto uspořádání poskytlo dostatečně vysokou citlivost, aby mohla být takto nízká hodnota rozpustnosti reprodukovatelně odečtena.

Ke stanovení rozpustností těchto látek byl používán jednopaprskový spektrofotometr s detektorem typu „diode array“. Jednopaprskové přístroje více „trpí“ kolísáním nulové linie, také proto byly zavedeny korekce na pozadí před i za absorpčním pásem (kapitola 3.2.3 str. 36). Tyto korekce také částečně mírnily vliv zákalu a nečistot, které by jinak znesnadňovaly měření velmi nízkých absorbancí, a tak přispěly k lepší reprodukovatelnosti výsledků. V případě stanovení extinkčního koeficientu Sudanu I ve vodě tak došlo k poklesu směrodatné odchylky stanovené pro 16 hodnot o více jako polovinu (Tabulka 3). U stejného stanovení pro Ellipticin došlo k podobnému jevu (Tabulka 4). Na chybu stanovení v metanolu korekce významnější vliv neměla. Protože absorpce u zvolených vlnových délek byla silná (v desetinách) a nárůst v jiných úsecích spektra minimální (tisíciny).

Opačný extrém je stanovení 2-NBA ve vodě, kde i v kyvetě s optickou dráhou 9 cm se absorbance v okamžiku srážení pohybuje kolem 0,001. Zde korekce očistila vybrané vlnové délky od vlivu zákalu a stínění a zvýraznila zvolené absorpční maximum (404 nm),

dostatečně natolik, že bylo možno stanovit extinkční koeficient a dokonce i rozpustnost 2-NBA.

Při porovnání extinkčních koeficientů vyšel s nejvyšší hodnotou pro vodné roztoky ellipticin, dále se umístil 2-NBA a extinkční koeficient pro Sudan I byl téměř 5x nižší. Porovnání metanolových koeficientů ukazuje, že v případě Sudanu I je extinkční koeficient podobný, zatímco u ellipticinu je takřka dvojnásobný.

Pro stanovení rozpustnosti jednotlivých sloučenin ve vodě bylo použito dvou metod. První využívala odchylky od Lambertova - Beerova zákona a druhá zjišťovala přímo koncentraci rozpuštěné látky nad sraženinou. Vypočtené koncentrace byly zhruba podobné pro obě metody. Výhodou obou metod je nenáročnost na instrumentaci, spektrofotometr nalezneme v každé laboratoři. Nicméně nevýhodou byla práce ve skle, protože látky jsou nepolární a v zásobních roztocích (hlavně Sudanu I) uchovávaných v plastu, nebo dávkovaných plastovou špičkou pipety docházelo k poklesu koncentrací a k sorpci do plastů. Další nevýhodou byla náročnost na čistotu rozpouštědel, kdy u vody velice záleželo na čistotě jí samotné, ale i použitého laboratorního nádobí, protože sebemenší obsah prachu nebo jiných nečistot mohl výrazně snížit citlivost. S tím je spojena nevýhoda u metody pomocí Lambertova - Beerova zákona, kdy mohlo dojít k znečištění roztoku prachem nebo jednotlivé pipety či míchadla v průběhu delšího měření.

Rozpustnost je u všech zkoumaných látek vyšší v metanolu než ve vodě, což není vzhledem k jejich hydrofobní povaze příliš překvapující. Zajímavé ale je, že zatímco rozpustnost Sudanu I a ellipticinu ve vodě je přibližně podobná a pohybuje se okolo 1 $\mu\text{mol/l}$ pro Sudan I a 1,2 $\mu\text{mol/l}$ pro ellipticin. Rozpustnost v metanolu se pro tyto dvě látky liší přibližně 3x. Roztok Sudanu I měl rozpustnost až 12,3 mmol/l , zatímco ellipticin, který byl ve vodě rozpustnější, měl rozpustnost jen kolem 4,2 mmol/l . Takto zjištěná hodnota rozpustnosti Sudanu I byla o něco nižší než hodnota uvedená v literatuře (17 mmol/l) [18], tento publikovaný údaj byl však také zaznamenán při teplotě vyšší o 3 $^{\circ}\text{C}$ než při které byl zjišťován v této mé práci.

Stanovení měřením koncentrace nad sraženinou potvrdilo rozpustnost ellipticinu v blízkosti hodnoty získané pomocí odchylky od Lambertova - Beerova zákona. Tedy kolem hodnoty (1,2 $\mu\text{mol/l}$). U Sudanu I však byla výsledná hodnota rozpustnosti stanovena nad sraženinou nereprodukovatelná, protože se nikdy zcela nepodařilo odstranit lehkou plovoucí sraženinu ze směsi. Filtrace se také neukázala jako vhodná, jelikož docházelo k sorpci Sudanu I na filtry a také k dalšímu znečišťování roztoku (hodnoty velmi kolísaly, proto tato data

v práci nejsou uvedena). Proto byla k tomuto experimentu využita krystalická pevná fáze Sudanu I, v tomto případě však byla výsledná hodnota rozpustnosti 6x menší než u metody vycházející z odchýlení od Lambertova - Beerova zákona. Rozdíl by mohl být vysvětlen právě krystalickou formou Sudanu I použitou pro tento experiment. Tento experiment byl prováděn dostatečně dlouho, aby byl systém blízko rovnováhy, protože při prodloužení rozpouštění o 4 dny vzrostla koncentrace Sudanu I jen nesignifikantně (o 6 %). Hodnota rozpustnosti Sudanu I ve vodě mohla být také srovnatelná s údaji v literatuře ($0,1 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$) [18]. V uvedené práci použili ne příliš vhodnou klasickou metodu měření koncentrace nad pevnou fází s následnou filtrací, což se pravděpodobně odrazilo ve vysokém rozptylu jejich výsledků v rozmezí $0,02 - 0,26 \mu\text{mol/l}$!

Rozdíl mezi hodnotami rozpustnosti Sudanu I nad čerstvou voluminosní sraženinou oproti sraženině krystalické by mohly být způsobeny jinou povahou pevné fáze. Mohlo by se například jednat o přítomnost amorfni formy pevného Sudanu I s nízkou hustotou oproti formě krystalické. Na což ostatně ukazují i markantní rozdíly v rychlosti sedimentace ve vodě zmiňované výše.

2-NBA má proti ostatním studovaným sloučeninám rozpustnost výrazně nižší (4 nmol/l). V porovnání s rozpustností jeho izomeru derivátu 3-NBA, kterou jsem stanovoval v bakalářské práci, je tato hodnota 1000x menší. Hodnota rozpustnosti 3-NBA ve vodě byla $3,8 \mu\text{mol/l}$ [67]. Takto nízká hodnota rozpustnosti by mohla mít významný vliv na biologickou dostupnost 2-NBA, např. při interakci s enzymy s obvyklou afinitou. Toto by mohlo zdůvodňovat fakt, proč je 2-NBA tak málo karcinogenní, i když jeho zastoupení v životním prostředí je 70x větší než koncentrace 3-NBA [41]. Také by to mohlo přispět k vysvětlení, proč redukce chinon:oxidoreduktasou *in vitro* prakticky neprobíhá, i když podle výsledků modelování je jeho vazba do vazebného místa této reduktasy rozdílná jen minimálně [39,40].

6 Závěr

Předkládaná práce se zabývala stanovením rozpustnosti jednotlivých modelových karcinogenů, studovaných v laboratoři jako možného faktoru ovlivňujícího jejich biologickou dostupnost. Podařilo se stanovit rozpustnost Sudanu I, ellipticinu a 2-nitrobenzanthronu ve vodném prostředí i metanolu. K tomu byly částečně použity spektrofotometrické metody již dříve vypracované v mé bakalářské práci, tyto metody ale byly dále vylepšeny, především z hlediska zvýšení citlivosti. Díky tomu se podařilo stanovit rozpustnost i velmi málo rozpustné zájmové sloučeniny – 2-NBA.

V prvním bodě bylo ověřeno, že dříve zavedené spektrofotometrické techniky pro stanovení rozpustnosti dokážou poměrně přesně a reprodukovatelně stanovit rozpustnosti jednotlivých málo rozpustných látek a získat extinkční koeficienty pro jednotlivé látky ve vodě i v metanolu. Stanovení bylo úspěšné po zavedení korekcí, které očišťovaly hodnoty absorbance od rušivých vlivů kolísání základní linie a částečně i zákalu. Extinkční koeficienty byly stanoveny pro všechny látky v obou rozpouštědlech jak s korekcí, tak bez korekce. Všechny jsou přehledně uvedeny v tabulce (Tabulka 15).

Dále byla stanovena rozpustnost ellipticinu, Sudanu I i 2-NBA pomocí metody, která využívala odchylky od Lambertova - Beerova zákona. Rozpustnost ellipticinu a Sudanu I ve vodě byla potvrzena metodou stanovení rozpustnosti nad sraženinou. Rozpustnost v metanolu byla stanovena metodou nad krystaly, ta v případě Sudanu I mohla být porovnána s hodnotou uvedenou v literatuře. Rozpustnosti všech látek uvádím v souhrnné tabulce (Tabulka 16). Bylo zjištěno, že na rozdíl od ostatních sloučenin je rozpustnost 2-NBA ve vodě až 1000x nižší, což může částečně vysvětlit jeho výrazně sníženou mutagenitu např. ve srovnání s jeho izomerem 3-NBA.

Tabulka 15: Přehled extinkčních koeficientů pro všechny látky ve vodě a v metanolu

Látka/ rozpouštědlo	extinkční koeficient [l.μmol-1.cm-1] vlnová délka	korigovaný extinkční koeficient [l.μmol-1.cm-1] vlnová délka
Sudan I/ voda	0,016 ± 0,006 A ₄₈₄	0,013 ± 0,002 A ₄₈₄ -(0.46*A ₃₅₀ +0.54*A ₆₀₀)
ellipticin/ voda	0,073 ± 0,005 A ₃₀₀	0,062 ± 0,003 A ₃₀₀ -(0.43*A ₂₆₀ +0.57*A ₃₃₀)
2-NBA/voda	0,07 ± 0,02 A ₄₀₄	0,049 ± 0,008 A ₄₀₄ -(0.77*A ₃₄₅ +0.23*A ₆₀₀)
Sudan I/ metanol	0,016 ± 0,0002 A ₄₈₁	0,014 ± 0,0001 A ₄₈₁ -(0.48*A ₃₅₀ +0.52*A ₆₀₀)
ellipticin/ metanol	0,135 ± 0,0021 A ₂₈₅	0,114 ± 0,0004 A ₂₈₅ -(0.5*A ₂₅₀ +0.5*A ₃₂₀)

Tabulka 16: Přehled stanovených rozpustností všech sledovaných látek ve vodě a v metanolu.

Látka	Rozpustnost ve vodě [μmol/l]	Rozpustnost ve metanolu [mmol/l]
Sudan I	1,1 ± 0,1*	12,3 ± 0,4
ellipticin	1,2 ± 0,1	4,23 ± 0,003
3-NBA	3,8**	13 ± 0,6**
2-NBA	0,004 ± 0,002	0,84 ± 0,02**

* v roztoku rovnováže s krystalickou fází je rozpustnost 0,16 ± 0,01 μmol/l

** Data převzata z [67]

7 Citovaná literatura

1. Zhoubné nádory v roce 2010 | ÚZIS ČR URL: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/zhoubne-nadory-roce-2010> [Accessed April 27, 2013].
2. Stiborova, M. (2005) Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace. URL: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf> [Accessed May 12, 2013].
3. Stiborova, M., Miksanova, M. (1999) Molekulární mechanismus kancerogeneze. *Živa*.
4. Voet, D., Voet, J.G. (2004) *Biochemistry (BIOCHEMISTRY)* (Wiley). 4th Ed.
5. Stiborova, M. (2010) *Xenobiochemie* (Přednáška na UK).
6. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2009) *Essential Cell Biology* (Garland Science). 3rd Ed.
7. Hynie, S., Univerzita, K. (2003) *Speciální farmakologie* (Karolinum, Praha)2. přeprac. vyd.
8. Stiborova, M. (2010) *Biochemie jako teoretický základ biomedicíny* (Přednáška na UK).
9. P. Stratil, V. Kuban (2004) Princip Karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chem. Listy*. **98**, 379–384.
10. Knejzlik, Z., Kaš, J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy.*, 913–918.
11. Stiborova, M., Martinek, V., Páca, J., Hudecek, J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí.
12. Wirth, H.L.K.M.L.H.J., Wirth, J. (2007) *Barevný atlas farmakologie - překlad 5. přepracovaného a rozšířeného vydání* (Grada Publishing a.s.).
13. Stiborova, M. (2002) Aromatické nitrosloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chem. Listy*. **98**.
14. Chroma, L., Macková, M., Macek, T., Martinek, V. (2001) Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem. Listy.*, 212–222.
15. Øllgaard, H., Frost, L., Galster, J., Hansen, O. (1999) *Survey of Azo-colorants in Denmark: Consumption, Use, Health and Environmental Aspects* (Danish Environmental Protection Agency).
16. Chung, K.T., Cerniglia, C.E. (1992) Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships. *Mutat. Res.* **277**, 201–220.

17. Xu, H., Heinze, T.M., Chen, S., Cerniglia, C.E., Chen, H. (2007) Anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes (Sudan dyes) by human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7759–7762.
18. Abraham, M.H., Amin, M., Zissimos, A.M. (2002) The lipophilicity of Sudan I and its tautomeric forms. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **4**, 5748–5752.
19. Stiborova, M., Martinek, V., Semanska, M., Hodek, P., Dracinsky, M., Cvacka, J., Schmeiser, H.H., Frei, E. (2009) Oxidation of the carcinogenic non-aminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxy-naphthalene (Sudan I) by cytochromes P450 and peroxidases: a comparative study. *Interdiscip Toxicol.* **2**, 195–200.
20. Stiborova, M., Martinek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E. (2002) Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Res.* **62**, 5678–5684.
21. Dracinsky, M., Cvacka, J., Semanska, M., Martinek, V., Frei, E., Stiborova, M. (2009) Mechanism of Formation of (Deoxy)guanosine Adducts Derived from Peroxidase-Catalyzed Oxidation of the Carcinogenic Nonaminoazo Dye 1-Phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I). *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1765–1773.
22. Stiborova, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, H.H., Wiessler, M. (1995) Benzenediazonium ion derived from Sudan I forms an 8-(phenylazo)guanine adduct in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 489–498.
23. Mathe, G., Triana, K., Pontiggia, P., Blanquet, D., Hallard, M., Morette, C. (1998) Data of pre-clinical and early clinical trials of acriflavine and hydroxy-methyl-ellipticine reviewed, enriched by the experience of their use for 18 months to 6 years in combinations with other HIV1 virostatics. *Biomed. Pharmacother.* **52**, 391–396.
24. Stiborova, M., Frei, E. (2001) Targeting of ellipticine drugs on tumor cells. **95**, 549–555.
25. Stiborova, M., Poljakova, J., Martinkova, E., Borek-Dohalska, L., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E. (2011) Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines -- a comparative study. *Interdiscip Toxicol.* **4**, 98–105.
26. Vranová, I., Univerzita, K. (2012) Mechanismus působení protinádorového léčiva ellipticinu v cílových tkáních jeho účinku. URL: .
27. Stiborova, M., Sejbál, J., Borek-Dohalska, L., Aimova, D., Poljakova, J., Forsterova, K., Rupertova, M., Wiesner, J., Hudecek, J., Wiessler, M., Frei, E. (2004) The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N-2-oxide. *Cancer Res.* **64**, 8374–8380.
28. Poljakova, J., Sulc, M., Forsterova, K. (2005) Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia.*
29. Stiborova, M., Poljakova, J., Ryslava, H., Dracinsky, M., Eckschlager, T., Frei, E. (2007) Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates

forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *Int. J. Cancer*. **120**, 243–251.

30. Stiborova, M., Arlt, V.M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Kotrbova, V., Moserova, M., Hudecek, J., Phillips, D.H., Frei, E. (2008) Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: Studies with the hepatic NADPH: Cytochrome P450 reductase null mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **226**, 318–327.
31. Stiborova, M., Bieler, C.A., Wiessler, M., Frei, E. (2001) The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1675–1684.
32. Poljakova, J., Eckschlager, T., Hrabeta, J., Hrebackova, J., Smutny, S., Frei, E., Martinek, V., Kizek, R., Stiborova, M. (2009) The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1466–1479.
33. Stiborova, M., Stiborova-Rupertova, M., Borek-Dohalska, L., Wiessler, M., Frei, E. (2003) Rat microsomes activating the anticancer drug ellipticine to species covalently binding to deoxyguanosine in DNA are a suitable model mimicking ellipticine bioactivation in humans. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 38–47.
34. Arlt, V.M., Glatt, H., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B.L., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2002) Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. *Carcinogenesis*. **23**, 1937–1945.
35. Enya, T., Suzuki, H., Watanabe, T., Hirayama, T., Hisamatsu, Y. (1997) 3-Nitrobenzanthrone, a Powerful Bacterial Mutagen and Suspected Human Carcinogen Found in Diesel Exhaust and Airborne Particulates. *Environmental Science & Technology*. **31**, 2772–2776.
36. Takamura-Enya, T., Suzuki, H., Hisamatsu, Y. (2006) Mutagenic activities and physicochemical properties of selected nitrobenzanthrones. *Mutagenesis*. **21**, 399–404.
37. Arlt, V.M. (2005) 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence. *Mutagenesis*. **20**, 399–410.
38. Bhat, K.L., Garg, A., Bock, C.W. (2002) Calculated values of the octanol–water partition coefficient and aqueous solubility for aminoazobenzene dyes and related structures. *Dyes and Pigments*. **52**, 145–159.
39. Reynisson, J., Stiborová, M., Martínek, V., Gamboa da Costa, G., Phillips, D.H., Arlt, V.M. (2008) Mutagenic potential of nitrenium ions of nitrobenzanthrones: correlation between theory and experiment. *Environ. Mol. Mutagen.* **49**, 659–667.
40. Stiborova, M., Martinek, V., Svobodova, M., Sistkova, J., Dvorak, Z., Ulrichova, J., Simanek, V., Frei, E., Schmeiser, H., Phillips, D., Arlt, V. (2010) Mechanisms of the Different DNA Adduct Forming Potentials of the Urban Air Pollutants 2-Nitrobenzanthrone and Carcinogenic 3-Nitrobenzanthrone. *CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY*. **23**, 1192–1201.

41. Arlt, V.M., Glatt, H., Gamboa da Costa, G., Reynisson, J., Takamura-Enya, T., Phillips, D.H. (2007) Mutagenicity and DNA adduct formation by the urban air pollutant 2-nitrobenzanthrone. *Toxicol. Sci.* **98**, 445–457.
42. Nagy, E., Zeisig, M., Kawamura, K., Hisamatsu, Y., Sugeta, A., Adachi, S., Möller, L. (2005) DNA adduct and tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Carcinogenesis*. **26**, 1821–1828.
43. Arlt, V.M., Stiborova, M., Hewer, A., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2003) Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: evidence for reductive activation by human NADPH:cytochrome p450 reductase. *Cancer Res.* **63**, 2752–2761.
44. Bieler, C.A., Cornelius, M.G., Stiborova, M., Arlt, V.M., Wiessler, M., Phillips, D.H., Schmeiser, H.H. (2007) Formation and persistence of DNA adducts formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in target and non-target organs after intratracheal instillation in rats. *Carcinogenesis*. **28**, 1117–1121.
45. Arlt, V.M., Gingerich, J., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H., Douglas, G.R., White, P.A. (2008) Genotoxicity of 3-nitrobenzanthrone and 3-aminobenzanthrone in MutaMouse and lung epithelial cells derived from MutaMouse. *Mutagenesis*. **23**, 483–490.
46. Arlt, V.M., Stiborova, M., Henderson, C.J., Osborne, M.R., Bieler, C.A., Frei, E., Martinek, V., Sopko, B., Wolf, C.R., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2005) Environmental pollutant and potent mutagen 3-nitrobenzanthrone forms DNA adducts after reduction by NAD(P)H:quinone oxidoreductase and conjugation by acetyltransferases and sulfotransferases in human hepatic cytosols. *Cancer Res.* **65**, 2644–2652.
47. Vom Brocke, J., Krais, A., Whibley, C., Hollstein, M.C., Schmeiser, H.H. (2009) The carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone induces GC to TA transversion mutations in human p53 sequences. *Mutagenesis*. **24**, 17–23.
48. Seidel, A., Dahmann, D., Krekeler, H., Jacob, J. (2002) Biomonitoring of polycyclic aromatic compounds in the urine of mining workers occupationally exposed to diesel exhaust. *Int J Hyg Environ Health*. **204**, 333–338.
49. Phousongphouang, P.T., Arey, J. (2003) Sources of the atmospheric contaminants, 2-nitrobenzanthrone and 3-nitrobenzanthrone. *Atmos. Environ.* **37**, 3189–3199.
50. Nagy, E., Adachi, S., Takamura-Enya, T., Zeisig, M., Möller, L. (2007) DNA adduct formation and oxidative stress from the carcinogenic urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone and its isomer 2-nitrobenzanthrone, in vitro and in vivo. *Mutagenesis*. **22**, 135–145.
51. Arlt, V.M., Cole, K.J., Phillips, D.H. (2004) Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites to DNA-damaging species in human B lymphoblastoid MCL-5 cells. *Mutagenesis*. **19**, 149–156.
52. Stiborova, M., Arlt, V.M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Frei, E., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2005) Molecular mechanism of genotoxicity of the environmental

- pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **149**, 191–197.
53. Stiborova, M., Dracinska, H., Hajkova, J., Kaderabkova, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Soucek, P., Phillips, D.H., Arlt, V.M. (2006) The environmental pollutant and carcinogen 3-nitrobenzanthrone and its human metabolite 3-aminobenzanthrone are potent inducers of rat hepatic cytochromes P450 1A1 and -1A2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 1398–1405.
 54. Linhart, I., Mráz, J., Hanzlíková, I., Silhánková, A., Frantík, E., Himl, M. (2012) Carcinogenic 3-nitrobenzanthrone but not 2-nitrobenzanthrone is metabolised to an unusual mercapturic acid in rats. *Toxicol. Lett.* **208**, 246–253.
 55. Stiborova, M., Cechova, T., Borek-Dohalska, L., Moserova, M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Paca, J., Arlt, V.M. (2012) Activation and detoxification metabolism of urban air pollutants 2-nitrobenzanthrone and carcinogenic 3-nitrobenzanthrone by rat and mouse hepatic microsomes. *Neuro Endocrinol. Lett.* **33 Suppl 3**, 8–15.
 56. Cechova, T. (2012) Studium metabolismu vzdušných polutantů a mutagenů 3-nitrobenzanthronu a 2-nitrobenzanthronu. URL: .
 57. Omura, T. (2010) Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J. Biochem.* **147**, 297–306.
 58. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* **6**, 1–42.
 59. Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737–747.
 60. Gutierrez, P.L. (2000) The role of NAD(P)H oxidoreductase (DT-Diaphorase) in the bioactivation of quinone-containing antitumor agents: a review. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 263–275.
 61. Belinsky, M., Jaiswal, A.K. (1993) NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev.* **12**, 103–117.
 62. McMurry, J., Vysoké, učení technické v B. (2007) *Organická chemie* (VUTIUM ; Vysoká škola chemicko-technologická, V Brně : V Praze)Vyd. 1.
 63. Kodicek, M. (2000) *Biofyzikální chemie* (Academia, Praha)2., přeprac. a dopl. vyd.
 64. Obsil, T. (2012) Biofyzikální chemie I. URL: .
 65. Agilent (2000) Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System. URL: <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G1103-90004.pdf>, 27.5.2011.
 66. Nápověda pro Microsoft Exel 2003 URL: <http://office.microsoft.com/cs-cz/excel-help/interaktivni-referencni-prirucka-prikazu-aplikaci-excel-2003-az-excel-2007-HA010149151.aspx> [Accessed December 5, 2013].

67. Reboun, M. (2011) Vztah mezi mutagenitou a rozpustností nitrobenzanthronů ve vodných i nevodných rozpouštědlech. URL: .