

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie



**Příprava 3H-modifikovaných biologicky
aktivních sloučenin**

Diplomová práce

Markéta Komínková

Školitel : doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

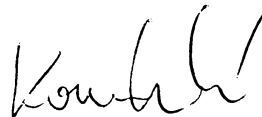
Praha 2006

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc., a že řádně cituji všechna převzatá data a skutečnosti

V Praze dne 1.6.2006

Markéta Komínková



Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli, doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., nejen za odborné vedení, ale i za nekonečnou trpělivost a přátelskou atmosféru, ve které tato práce vznikala. Stejně tak patří můj dík celému osazenstvu laboratoře, jmenovitě Ing. Šárce Pšondrové za poskytnutí mnoha rad a pomoc s praktickou stránkou práce.

Obsah

1	Seznam zkratk	5
2	Úvod	6
3	Cíl práce	8
4	Obecná část	10
4.1	Izotopově značené sloučeniny	10
4.1.1	Značená sloučenina	10
4.1.2	Možnosti značení látek radionuklidy	12
4.1.3	Význam polohy radioaktivní značky v metabolických studiích 13	
4.1.4	Použití izotopů a značených sloučenin v biologii.....	13
4.1.5	Tritiace	14
4.2	Biotransformace xenobiotik	17
4.2.1	Fáze biotransformace	18
4.3	Karcinogenně aktivní sloučeniny.....	19
4.3.1	2-nitroanisol	19
4.3.2	Sanguinarin.....	20
4.3.3	Aristolochová kyselina.....	21
5	Experimentální část	23
5.1	Použité chemikálie a přístroje	23
5.2	Experimenty	25
5.2.1	2-Nitroanisol.....	25
5.2.2	Sanguinarin.....	25
5.2.3	Aristolochová kyselina.....	26
6	Výsledky a diskuse	28
6.1	2-Nitroanisol	28
6.2	Sanguinarin	31
6.3	Aristolochová kyselina.....	34
7	Závěr	45
8	Seznam použité literatury	46
9	Přílohy	49
9.1	Příloha 1	49
9.2	Příloha 2.....	51

1 Seznam zkratek

2-NA	2-nitroanisol
AA	acetanilid
AAI	kyselina aristolochová I
cod	1,5-cyklooktadien
CPC	cetylpyridinium chlorid
Cy	cyklohexyl
DPM	rozpady za minutu (desintegrations per minute)
dppe	bis-1,2-difenylfosfinoethan
GC-MS	plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	p-jodacetanilid
LSC	kapalná scintilace
PCWP	cetylpyridinium peroxofosfowolframat
py	pyridin
QBA	kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy
SA	sanguinarin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě

2 Úvod

Organické sloučeniny značené radionuklidy představují jeden z významných nástrojů, používaných k analýze procesů probíhajících v živých organismech. Jejich široké použití není omezeno jen na oblast rozličných biodistribučních a biotransformačních studií v *in vivo* systémech, používány, a to snad i ve větší míře, jsou v současné době při *in vitro* zkoumání principiálních dějů v živých organismech, jako jsou např. transportní procesy v membránách, receptorové interakce, tvorba a vlastnosti farmakon-receptorového komplexu, procesy související s replikací genetické informace, mechanismy karcinogeneze apod. Významně se rovněž takto značené sloučeniny podílejí na ekologických výzkumech transportu, či dekontaminace ekosystému.

Nádorová onemocnění jsou v ekonomicky vyspělých státech druhou nejčastější příčinou úmrtí. Při vzniku zhoubných nádorů se uplatňují různé vnitřní a vnější faktory, z nichž značně převažují - infekce, chronické záněty, patologické změny, špatná výživa nebo zátěž organismu působením xenobiotik i stresu. Možnost maligní přeměny je u každé tkáně, avšak frekvence této přeměny je u jednotlivých tkání velmi rozdílná. Každá tkáň má jiné histologické složení, různou intenzitu dělení buněk a metabolismu, odlišné regulační mechanismy, některé odlišné enzymové systémy nebo isoenzymy (např. u detoxikačních enzymů), a tím i různou schopnost aktivovat nebo vylučovat karcinogenní látky. Čím složitější organismus je, tím má větší škálu druhů konečně diferenciovaných buněk, a tím více potřebuje genů kódujících různé regulační proteiny, čímž se zvyšuje riziko poškození.

Souhrnný proces vzniku nádorů se nazývá karcinogeneze. Karcinogeneze je způsobena mutacemi genetického materiálu zdravých buněk, což vede k narušení regulačních procesů mezi buněčným dělením (proliferace) a programovanou buněčnou smrtí (apoptóza), což následně vede ke ztrátě schopnosti diferenciaci buněk, ke ztrátě tkáňové celistvosti a nekontrolovatelnému dělení buněk¹. Následkem tohoto procesu vzniká nová tkáň, která se vyznačuje nadměrným autonomním růstem a tím je poškozen

celý organismus. Taková tkáň se nazývá tumor nebo též neoplazma (novotvar).

3 Cíl práce

Cílem diplomového projektu je příprava, čištění a stanovení základních parametrů tritiem značeného 2-nitroanisolu, sanguinarinu a kyseliny aristolochové I.

K vyřešení projektu je nutné:

- a) provést literární rešerši na téma tritiace organických sloučenin, transformace aminoderivátů na nitroderiváty, reduktivní dehalogenace arylhalogenidů, interakce organokovových hydridů s běžnými redukovatelnými funkčními skupinami organických molekul
- b) provést experimentální ověření možnosti oxidace aminoskupiny na nitroskupinu včetně přípravy případných činidel nebo katalyzátorů
- c) provést tritiaci o-anisidinu a oxidovat tritiováný produkt na o-nitroanisol, stanovit parametry připravené značené sloučeniny včetně tvorby protokolu
- d) provést tritiaci sanquinarinu, nalézt podmínky HPLC čištění, provést čištění produktu a charakterizovat výslednou značenou sloučeninu odpovídajícím protokolem
- e) na základě rešerše zvolit vhodný hydrid, který lze připravit snadno v tritiované formě a experimentálně ověřit možnosti jeho přípravy v neaktivní formě
- f) připraveným hydridem provést reduktivní dehalogenaci na modelovém systému p-jodacetanilid/acetanilid za různých podmínek a s použitím katalyzátorů
- g) připravit tritiováný hydrid a provést experiment na výše uvedeném modelovém systému

h) provést jodaci kyseliny aristolochové I v mikrokvantu, ověřit inkorporaci jodu do molekuly

i) provést dehalogenační reakci s připraveným tritidem a pokusit se izolovat tritiovaný analog aristolochové kyseliny I

4 Obecná část

4.1 Izotopově značené sloučeniny

Aplikace izotopově značených sloučenin v přírodních vědách jsou velmi rozsáhlé. Používají se např. ke studiu mechanismů a kinetiky chemických i biochemických reakcí, biogeneze rozličných látek rostlinného a živočišného původu, metabolických procesů, funkce jednotlivých živočišných orgánů atd. Velmi významnou úlohu hrají též v oblasti lékařské diagnostiky a terapie.

Tato diplomová práce se zabývala přípravou a využitím značeného toxikantu při studiu jeho metabolismu v buňce.

4.1.1 Značená sloučenina

Pojmem značená sloučenina obvykle rozumíme takovou látku, která se od ostatních molekul ve vzorku liší jen málo svými vlastnostmi (fyzikálními, chemickými, biologickými), ale lze ji vhodnou analytickou metodou relativně snadno detekovat. V praxi to znamená, že se do molekuly vnese dobře detegovatelná značka, ať už se jedná o modifikaci molekuly vhodným substituentem, či se nahradí některý z atomů původní molekuly jeho dobře detegovatelným analogem. Pomineme-li v prvním případě možnost zavedení fluorescenční či spinové značky, nabízí se možnost modifikace molekuly vhodným radionuklidem, či substituentem obsahujícím radionuklid. V druhém případě zůstává výhradní možnost náhrady atomu jeho izotopem, ať už radioaktivním nebo stabilním. První případ se obvykle nazývá externím značením², což vyjadřuje jakousi modifikaci ve formě připojení radioizotopu či skupiny atomů obsahující radioizotop k základnímu skeletu molekuly. Druhý případ patří mezi izotopicky modifikované sloučeniny³, kdy architektura molekuly zůstává nezměněna.

Do současné doby tak bylo připraveno nesčíslné množství organických sloučenin či biomolekul, do kterých byl inkorporován jeden či

více atomů radionuklidů. Snažení v oblasti přípravy takových sloučenin bylo vyvoláno požadavky výzkumu živé hmoty na stále nižší až molekulární úrovni. V těchto případech, jako například při studiu receptorových interakcí nebo membránových transportů, se obzvláště projeví základní výhoda značení radioaktivním nuklidem, a to bezkonkurenčně mimořádná citlivost detekce použité radioaktivně značené sloučeniny. Další výhodou této metodiky je použití přímo biologicky aktivní sloučeniny, pouze s izotopovou modifikací na jednom či více atomech, čímž nedochází k výraznější změně molekuly, jako je tomu třeba u fluorescenčního značení. Biologická aktivita radioaktivním izotopem značené sloučeniny tak zůstává převážně zachována.

Hlavní význam a přínos indikátorové metody⁴ spočívá v možnosti rozlišit různé atomy stejného druhu. V některých aplikacích je možné indikátorovou metodu nahradit jinými postupy, ale rozlišení atomů stejného druhu, jak je tomu například při studiu mechanismu chemických reakcí, žádná jiná metoda neumožňuje. Metoda vyžaduje mít k dispozici indikátor ve shodné chemické formě jako je zkoumaná látka, aby byl splněn předpoklad stejného chemického chování.

Velký význam má použití indikátorů ve formě izotopicky modifikovaných molekul. Molekuly mohou být značeny jak stabilními, tak i radioaktivními izotopy a pro obě metodiky jsou dostupné finální analytické postupy, ať už hmotnostní spektrometrie pro stabilní nuklidy, či měření radioaktivity pro nuklidy nestabilní. V biochemických aplikacích se používá obou variant.

Použití radioaktivních indikátorů je velmi rozšířené, mezi nejdůležitější oblasti patří studium rovnocennosti vazeb, důkazy existence nestálých sloučenin, průběh chemických reakcí, určování kinetických parametrů chemických reakcí. Především se však metoda používá v biochemických, biologických, fyziologických a farmakologických experimentech. Radioaktivní indikátory jsou připravovány různými metodami radiochemické/organické syntézy a musí mít dostatečnou měrnou aktivitu, aby se měření dalo provést s dostatečnou přesností v přijatelném časovém intervalu.

Organické sloučeniny je vhodné označovat pouze izotopy těch prvků, ze kterých se sloučenina skládá. Náhrada některého z existujících atomů původní struktury odpovídajícím radionuklidem (^3H , ^{14}C , ^{35}S apod.) se nazývá interní značení. V některých případech je taková modifikace velmi obtížná nebo nemožná. Potom se používá takzvané externí značení, jako je třeba značení proteinů na tyrosinovém aromatickém jádře elektrofilní substitucí izotopem jodu, methylace dusíkového atomu přírodních látek ^{14}C nebo ^3H methyljodidem, nebo vnesení snadno jodovatelné struktury do základního skeletu (Bolton-Hunterovo činidlo) apod. Nevýhodou externího značení je modifikace molekuly, která může vést ke změnám nebo až ztrátě testované biologické aktivity.

4.1.2 Možnosti značení látek radionuklidy

Ke značení se používají jak stabilní tak i radioaktivní nuklidy.

Značení stabilními nuklidy je výhodné tím, že syntézu sloučenin i veškeré další operace s nimi lze provádět v normálních laboratořích. Dále je možné pracovat s větším množstvím látky a sloučeniny nepodléhají autoradiolýze. Hlavní nevýhodou je relativně náročné a přístrojově nákladné stanovení jejich koncentrace (převážně hmotnostním spektrometrem)⁵ a v neposlední řadě i finanční náročnost zdrojů stabilních nuklidů.

Radioaktivní nuklidy mají proti stabilním především tu výhodu, že jejich detekce i stanovení koncentrace ve značených sloučeninách je relativně snadné, exkluzivní výhodou je potom citlivost detekce ionizujícího záření. Nevýhodou je, že práce s nimi vyžaduje dodržování přísných bezpečnostních opatření a potřebu speciálně vybudovaných a vybavených laboratoří. Navíc sloučeniny značené radioaktivními nuklidy nelze libovolně dlouho skladovat, skladování je limitováno vlastním poločasem rozpadu radionuklidu a interakcí ionizujícího záření s látkou případně rozpouštědlem, která vede k autoradiolýze⁵.

I když samozřejmě pro výzkum distribuce a ukládání kovů v živočišných či rostlinných organismech byly použity ionty nejrůznějších radionuklidů, v současné době převládá výzkum organických sloučenin či

biomolekul. Z toho také vyplývá výběr vhodných izotopů pro příslušné studie. Nejčastěji používané nuklidy jsou nízkoenergetické beta zářiče. Nejpoužívanější jsou ^{14}C a tritium. ^{14}C je zářič beta s velmi dlouhým poločasem, tritium je rovněž zářičem beta s energií nižší než ^{14}C , jeho poločas (12,3 let) je ještě dostatečně dlouhý, aby nekomplikoval provedení i dlouhodobějších experimentů.

4.1.3 Význam polohy radioaktivní značky v metabolických studiích

Obecně řečeno, při návrhu polohy radioaktivního atomu v organické molekule je třeba důsledně zvážit nejen syntetické možnosti, ale i charakter plánovaného experimentu a možné další reakce značené molekuly jako substrátu. Základem je zcela zřejmý požadavek odstranění tzv. labilní aktivity po tritiaci molekuly tj. odstranění ve vodě či pufrech oddisociovatelných protonů podléhajících rychlé výměně s rozpouštědlem. Je rovněž potřebné si uvědomit, že některé látky se v organismu metabolizují třeba jen jednoduchou biotransformací, případně spojenou s následnou konjugací, jiné však mohou podléhat enzymatickému štěpení na menší fragmenty. U prvního typu je vhodné alespoň odhadnout tzv. metabolicky stabilní polohu, u látek, které podléhají enzymatickému štěpení, je nutné rozhodnout, kterou část molekuly chceme sledovat a v té potom provést izotopickou substituci.

4.1.4 Použití izotopů a značených sloučenin v biologii

Izotopy a značené sloučeniny našly široké uplatnění také v biologických vědách a to ať již v laboratorním výzkumu, tak i v praktickém využití. Široká škála aplikací se dá shrnout do několika skupin využití⁶:

1. sledování pohybu – patří sem sledování pohybu jednotlivých živočichů, cest a dynamiky šíření mikrobů v organismu, pohybu minerálních živin v rostlinách, přechodu produktů asimilace z listů do jiných částí rostlin, přesunu látek mezi buněčnými strukturami, přenosu látek mezi

organismy a přechodu látek membránami. V některých z těchto aplikací není izotopová metoda jediná, např. sledování pohybu živočichů lze studovat barvením nebo přímým pozorováním.

2. sledování chemických změn – jako štěpení a vznik nových chemických vazeb při zániku jedněch a vzniku nových molekul, přesuny skupin atomů. Izotopové značení zde umožňuje určit genetické souvislosti při vzniku nových molekul z původních a zkoumat cesty, směr a následnost těchto změn. Patří sem značná část biochemických izotopových aplikací, jako je biosyntéza složitých molekul, metabolismus složek potravy a jiných látek, jako jsou léčiva, pesticidy aj.

3. studium kinetiky dějů v živých soustavách – jde hlavně o studium metabolického obratu a kinetiky buněčné proliferace (bujení). V živém organismu nepřetržitě dochází k přeměně látek a energie, i když v důsledku vnějších podmínek a mechanismů regulace je koncentrace většiny látek stálá, přesto jde o dynamický proces. Neustále jsou tvořeny nukleové kyseliny, enzymy, sacharidy, tuky atd., zatímco jiné molekuly jsou odbourávány a nahrazovány novými. Jedná se o tzv. metabolický obrat. Pro znalost dynamiky procesů probíhajících v živém organismu má zásadní charakter.

4. studium dějů souvisejících s přenosem informací – patří sem izotopové studium mechanismu přenosu genetických informací na molekulární úrovni a některé další problémy, jako jsou hormonální mechanismy regulace, imunochemické reakce aj.

4.1.5 Tritiace

Pro značení zmíněných sloučenin je nejjednodušší použití izotopu ^3H . Tritium je poměrně levný radioizotop, s poločasem rozpadu 12,3 roku, což je vhodné pro většinu biochemických experimentů. Emituje β -záření s nízkou energií (0,0118 MeV). Lze ho použít v plynné formě nebo jako $^3\text{H}_2\text{O}$ s izotopovým obohacením téměř 100 %. Principiálně se jedná o substituci či adici vodíku. Substituce je často možná s komplikovanými molekulami při zachování uhlíkové kostry.

Pro námi vybrané látky jsou nejvhodnější dvě metody značení tritiem:

A. Izotopová výměna:

Izotopová výměna představuje takovou metodu zavedení radioizotopu do organické molekuly, kdy přítomné atomy jsou v průběhu procesu nahrazovány jejich radioaktivními analogy. Tato metoda se netýká základního uhlíkatého skeletu, ale především vázaných vodíkových atomů resp. halogenových substituentů. Bezkonkurenčně nejčastější použití metody izotopové výměny nalezneme při přípravě tritiovaných analogů organických sloučenin. Atomy vodíku vázané na kyslíku, síře, dusíku, nebo např. fosforu podléhají velmi snadno izotopové výměně s tritiovanou vodou. Vzniklé sloučeniny však velmi rychle podléhají zpětné reakci v protickém prostředí a není tak možné je připravit dostatečně izotopově čisté. Velký význam však mají sloučeniny, kde došlo k výměně vodíkových atomů na C-H vazbách.

Tato metoda dovoluje značení i velmi složitých molekul, které jinak značeny být nemohou, a to dvojitým postupem

- a) *Katalytická výměna v roztoku* : Reakce s tritiovanou vodou se provádí za acidobazické katalýzy⁷
- b) *Výměna s plynným tritiem* : prvně popsána v roce 1956 Wiltzbachem a následně také nazvána jako Wiltzbachovo značení⁸: Metoda spočívá v ponechání sloučeniny v kontaktu s plynným tritiem po několik dnů nebo týdnů. Během této doby radiace vyvolá výměnné reakce mezi atomy vodíku sloučeniny a plynným tritiem. Výsledná sloučenina je poté obvykle čištěna chromatografickými metodami (HPLC, TLC, na iontoměničích atd.)

Jednoduchost metody vedla k mnoha snahám zlepšit efektivitu zabudování tritia a snížit množství vedlejších produktů při tritiačním procesu. Efektivita značení byla značně zlepšena metodou katalyzované výměny s plynným tritiem, kdy se sloučenina hydrogenuje plynným tritiem v roztoku za přítomnosti hydrogenačního katalyzátoru (Pt nebo Pd). Užitím tohoto postupu se dá získat 2-3.000 x vyšší měrná aktivita než u metody bez použití katalyzátoru. Novější metody vyžívají např. organokovových komplexů iridia jako třeba bidentátních fosfinů $[(\text{cod})\text{Ir}(\text{dppe})]\text{BF}_4$ nebo

[(cod)Ir(py)(PCy₃)]BF₄, kdy je v některých případech možná predikce polohy značení⁹.

Reakce s plynným tritiem v přítomnosti hydrogenačního katalyzátoru, kdy se v praxi obvykle používá Pd/C, je však analogií klasické hydrogenační reakce, která způsobí nejen izotopovou výměnu, ale atakuje redukovatelné části tritiované molekuly. Přítomnost redukovatelných funkčních skupin je proto limitujícím faktorem pro použití této metody. Není tak možné označit například molekuly obsahující nitroskupinu, alkoxykarbonylovou skupinu apod., protože získáváme odpovídající redukované funkční skupiny. V případě redukováných nitrolátek je v některých případech možná zpětná oxidace na nitrosloučeninu, pokud je zbytek molekuly k oxidačnímu činidlu dostatečně inertní¹⁰⁻¹².

Dalším problémem je přítomnost atomů halogenů v molekule. Kovalentně vázané halogeny mohou podlehnout snadno dehalogenaci, která degraduje původní strukturu. Na druhé straně však lze s výhodou použít

B. Reduktivní dehalogenace:

Reduktivní dehalogenace v uvažovaném smyslu je reakce, která umožňuje nahrazení halogenu v molekule substrátu atomem vodíku, deuteria resp. tritia.

Pro hydrodehalogenace arylhalogenů je k dispozici řada reakčních činidel. Jednoduchým procesem je například použití alkoxidového aniontu, kdy vodíkový atom na uhlíku vedle alkoxidového kyslíku přechází na molekulu jodaromátu za současného odštěpení halogenidového aniontu¹³.

Při použití alkylamidových aniontů (lithium diethylamid) probíhá dehalogenační reakce přes stadium benzynu¹⁴. Reduktivní dehalogenace tetrahydridohlinitanem lithným (LiAlH₄) probíhá přes stadium organohlinitých sloučenin¹⁵. Použitelný je rovněž tetrahydridoboritan sodný, který v systému acetonitril voda dechloruje 3- a 4-chlorobifenyl¹⁶. Řada halogenovaných benzenů byla úspěšně redukována LiAlH₄ v tetrahydrofuranu za laboratorní teploty¹⁷. Dobře prozkoumaným je systém NaBH₄/Cu₂Cl₂, který byl použit i pro deuteraci vybraných substrátů. Mechanismus reakce zahrnuje tvorbu nestálých hydridů mědi, které slouží jako vlastní redukční činidlo¹⁸. Moderní jsou metody katalytické dehalogenace v systému kov/imidazoliová sůl/báze. Použitý systém 2,4,6-

trimethylfenylimidazolium chlorid/ Pd(dibenzylidenaceton)₂/methoxid draselný poskytly výborné výsledky při dehalogenaci p-chlortoluenu¹⁹. Výrazný je zde vliv báze, která poskytuje potřebný vodíkový atom. Proto také klasické báze typu uhličitan cesný nebo sodný poskytovaly nulové výtěžky. Využití dalších palladiových komplexů za podmínek mikrovlnného ozáření přineslo další zlepšení efektivity reakce - prakticky 100 % výtěžky při reakční době 2 minut²⁰. Vynikající výsledky byly rovněž dosaženy s acetylacetonátem niklu i bez mikrovlnného ataku²¹.

Hydrodehalogenaci lze samozřejmě provést i klasickým způsobem reakcí arylhalogenidu s plynným vodíkem za katalýzy Pd/C v přítomnosti báze. Výtěžek reakce lze ovlivnit modifikací báze nebo přidávkem kvartérní amoniové soli. Uvedenou reakci lze provést dokonce i ve dvoufázovém uspořádání voda/isooktan, kdy lze použít ve vodě rozpustné anorganické báze²².

4.2 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika jsou cizorodé látky mající toxické účinky na organismus. Metabolická přeměna xenobiotik vstupujících do organismu je do určité míry určena jejich rozpustností ve vodě či tucích. Látky lipofilního charakteru, které procházejí membránami a může tedy docházet k jejich kumulaci v organismu, nemohou být vyloučeny z těla přímo, ale musí být nejprve přeměněny na látky s vyšší polaritou²³. Tyto hydrofilnější metabolity v závislosti na jejich chemické struktuře a na enzymovém systému, na něž působí, mohou být dvojího druhu:

- a) látky detoxikované – metabolit je oproti původnímu xenobiotiku již netoxický a biologicky inertní,
- b) látky aktivované – metabolity mohou mít i mnohem výraznější biotoxický účinek než původní sloučenina

Procesy detoxikační a aktivační nelze od sebe vzájemně oddělit neb mezi oběma směry metabolismu existují velice složité vztahy a rovnováhy, které mohou být v důsledku mnoha faktorů snadno vychýleny na tu či onu

stranu²⁴. Např. tentýž enzym může být angažován v detoxikaci jedné chemické látky a přitom zvyšovat toxicitu látky jiné²⁵.

U živočichů dochází k biotransformaci xenobiotik ve dvou fázích²⁶. V první fázi, nazývané derivatizační dochází ke zvýšení polariry především redox a hydrolytickými reakcemi²⁷. Ve druhé fázi dochází ke konjugaci těchto polarizovaných molekul s endogenními látkami.

4.2.1 Fáze biotransformace

1) Derivatizační fáze

V této fázi se většinou polarita xenobiotika zvyšuje zabudováním funkčních skupin do jeho molekuly, nebo demaskováním funkčních skupin již přítomných²⁸. Nejčastější průběh transformace je oxidační (C-hydroxylace, N-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace apod.), některé reakce probíhají hydrolyticky (hydrolyza esterů, amidů), nebo redukčním mechanismem (redukce azo- a nitro- látek). Příkladem karcinogenů aktivovaných redukční cestou je 2-nitroanisol²⁹, sanguinarin nebo kyselina aristolochová^{30-32,34}.

2) Konjugační fáze

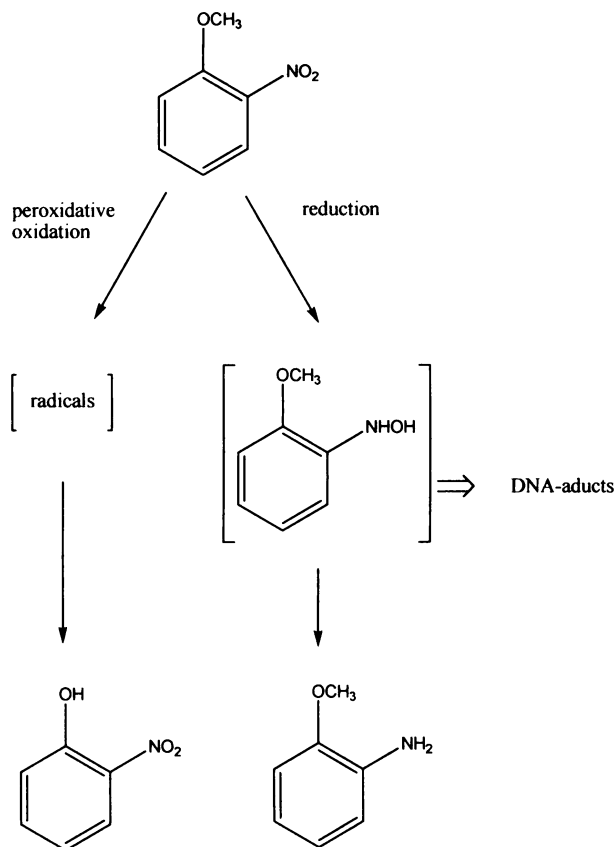
V druhé fázi biotransformace jsou na funkční skupiny vytvořené v derivatizační fázi vázány malé hydrofilní molekuly (např. kyselina glukuronová, glycin, taurin, glutathion atd.)²⁷. Tímto krokem se ještě zvýší polarita původně hydrofobní molekuly a usnadní se tím její vyloučení z organismu. Exkrece nejčastěji probíhá močí a žlučí.

4.3 Karcinogenně aktivní sloučeniny

4.3.1 2-nitroanisol

Aromatické nitrosloučeniny patří mezi potenciálně toxické a karcinogenní sloučeniny. Tyto kontaminanty se vyskytují ve vysokých koncentracích na pracovištích zejména v chemickém průmyslu, v emisích při spalování ropných produktů aj. To je i případ 2-nitroanisolu (2-NA). 2-nitroanisol je toxická sloučenina, způsobující anémii, která se projevuje zvyšováním hladiny methemoglobinu a urychlováním rozpadu erytrocytů.

Hlavní metabolickou cestou 2-NA je oxidativní demethylace na 2-nitrofenol, který se objevuje v moči hlavně jako sulfátový konjugát. Druhým způsobem odbourávání je redukce na 2-anisidin, coby minoritní metabolit vznikající v játrech^{29,34} (obr. 1).



Pro vyhodnocení a studium genotoxického působení 2-NA je třeba připravit a použít tritium-značený 2-NA.

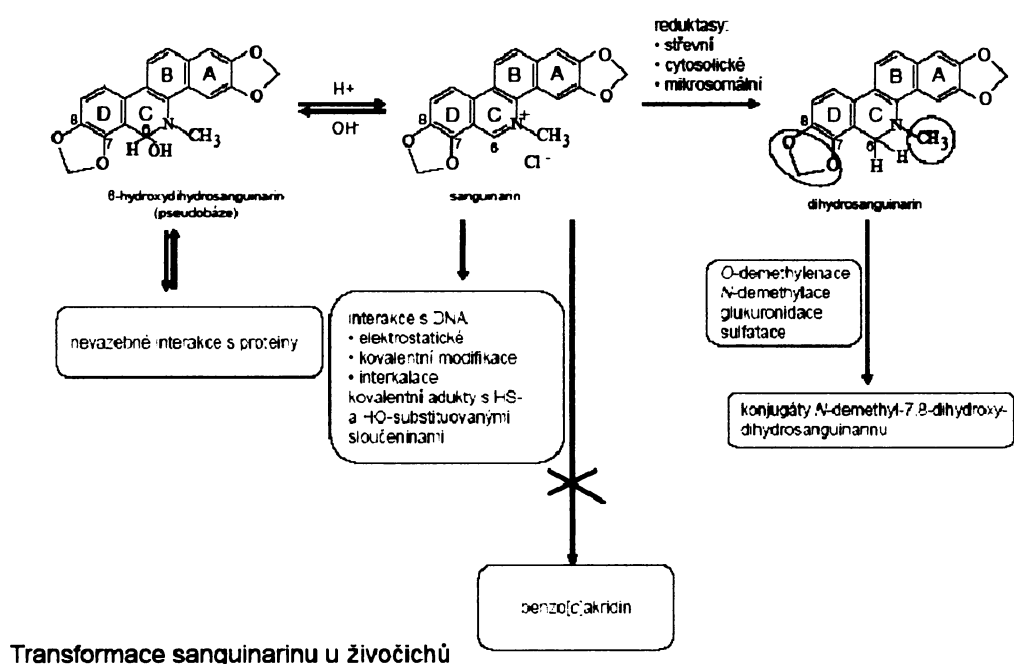
Obr. 1 Metabolismus 2-nitroanisolu v organismu

4.3.2 Sanguinarin

Sanguinarin (SA) patří mezi kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (QBA), které jsou skupinou přírodních produktů. Nachází se v rostlinách čeledi Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae a Rutaceae. Jeho hlavním zdrojem jsou *Sanguinaria canadensis* L. (krevnice kanadská) a *Chelidonium majus* L. (vlastovičnick větší), z nichž byl izolován ve formě kvartérních solí.

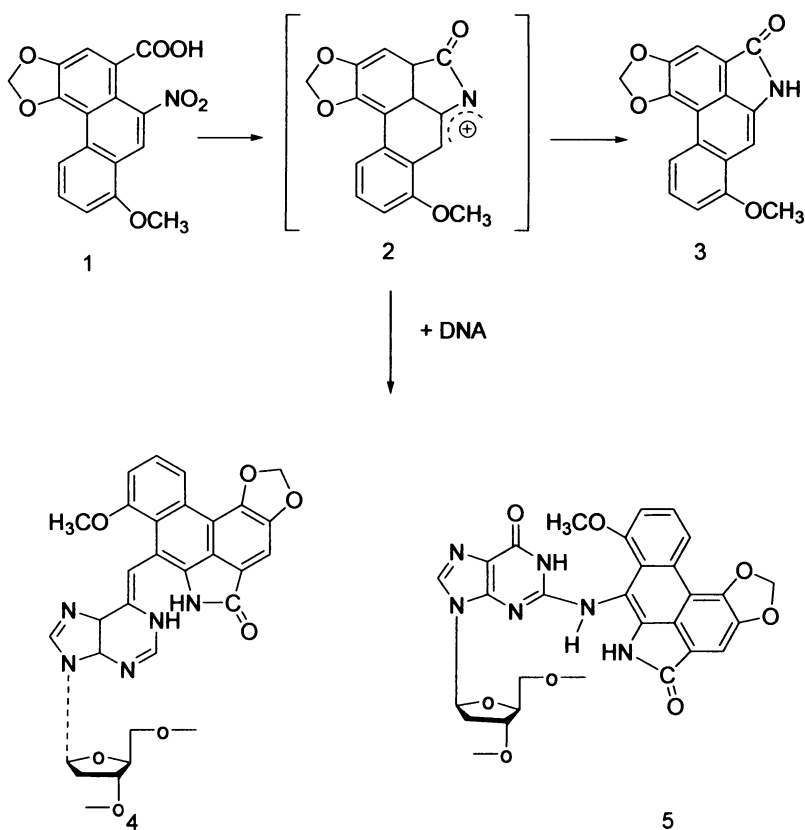
Sanguinarin je řazen mezi fytoalexiny, sekundární metabolity chránící rostlinu před patogenními mikroorganismy³⁵. Má antimikrobiální a fungicidní aktivitu - jeho antimikrobiální účinky jsou využívány v ústní hygieně a to především v zubních pastách, kde působí proti zánětům dásní inhibicí růstu orálních bakterií. Je dokázán jeho ochranný vliv před rakovinou kůže tím, že zlepšuje výrobu bílkovin, které přivodí smrt buněk poškozených UV-B zářením, předpokládají se protinádorové vlastnosti díky schopnosti indukovat apoptózu³⁶. V současné době se intenzivně zkoumá, zda a jaké tvoří interakce s DNA.

Obr.2 Schéma transformace sanguinarinu v organismu



4.3.3 Aristolochová kyselina

Kyselina aristolochová I (AAI) patří mezi látky rostlinného původu nitrofenanthrenového typu. Nachází se v čínských bylinách (čeleď Aristolochiaceae), které jsou používány v lidovém léčitelství a při redukci nadváhy. V pokusech na zvířatech kyselina aristolochová působí nefrotoxicky, karcinogenně a teratogenně^{32,34}, otravy se projevují zvracením, průjmem, zánětem ledvin, krvácením z dělohy, u těhotných může dojít k potratu, smrt je po velkých dávkách způsobena zástavou dechu a srdce. Je jednou z příčin balkánské endemické nefropatie a hlavním



původcem Čínské herbální nefropatie:

Chinese herbs nephropathy³⁷ je poměrně nový druh

subakutní intersticiální nefropatie

vyskytující se u žen, které používaly k zeštíhlovací dietě tzv. Čínské byliny.

Obr.3 Metabolická aktivace a vazba DNA a kyseliny

aristolochové AAI: 1. Aristolochová kyselina, 2. Cyklický dusíkový ion, 3. aristolaktam, 4. 7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolaktam, 5. 7-(deoxyguanosin-N²-yl)aristolaktam

Balkánská endemická nefropatie je choroba rozšířená v populaci žijící podél Dunaje. Charakteristické příznaky jsou anémie, ztráta tělesné hmotnosti, bolesti hlavy a progresivní zánět ledvin vedoucí k jejich úplnému

selhání. Majoritními metabolickými produkty tvořenými *in vitro* a *in vivo* jsou aristolaktamy, jež byly detegovány v moči a výkalech savců včetně člověka. Redukovaný DNA adukt s deoxyadenosinem je zodpovědný za iniciaci karcinogeneze(obr. 3).

5 Experimentální část

5.1 Použité chemikálie a přístroje

Použité chemikálie chlorotributylstannan, tributylstannan, o-anisidin, sanguinarin, kyselina fosfowolframová, cetylpyridinium chlorid, chloramin T, dusitan sodný i uhličitán vápenatý, stejně jako suchý tetrahydrofuran byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich. Peroxid vodíku 30 %, jodid sodný, síran hořečnatý, kyselina chlorovodíková, acetonitril a kyselina octová byly nakoupeny u firmy Lachema. Kyselina aristolochová I byla poskytnuta katedrou biochemie PŘF UK v Praze. Značený Na^{131}I byl získán z ÚJV Řež. Modelové látky p-jodacetanilid a acetanilid byly nezávisle připraveny v laboratoři školitele a přečištěny krystalizací z vody. Pd/C (10 %) bylo zakoupeno od firmy Fluka. Bis(trifenylfosfino)dichloropalladnatý komplex (99,95 %) byl získán od firmy Premion, ostatní kovové komplexy byly získány jako vzorky z Katedry anorganické chemie PŘF UK. Methanol pro přípravu mobilní fáze byl od firmy Lab-Scan v kvalitě pro HPLC, dále byla pro přípravu mobilních fází použita deionizovaná voda (WATEK).

Pro analýzy byl použit kapalinový chromatograf INGOS sestávající z vysokotlakého čerpadla LCP5020, UV detektoru LCD5000, a autosampleru LCS5040 a kapalinový chromatograf Shimadzu - čerpadlo LC20-AD, UV detektor SPD 20A, manuální nástřik 20 μl - Rheodyne.

Podmínky:

Metoda A: (2-nitroanisol, 2-NA) Kolona Supelcosil LC-18-DB, 4,6 x 250 mm, mobilní fáze methanol/voda (9:1), průtok 1 ml/min, doba měření 10 min. Detekce UV 254 nm.

Metoda B: (sanguinarin, SA) Kolona Supelcosil LC-18-DB, 4,6 x 250 mm, mobilní fáze acetonitril/50 mM octan sodný ve vodném roztoku kyseliny octové (40/60, v/v), průtok 1,5 ml/min, 26 °C, detekce UV 284 nm.

Metoda C: (p-jodacetanilid IAA, acetanilid AA), Kolona o rozměrech 4 x 250 mm, sorbent Reprisil 100 (C-18), 5 µm, mobilní fáze methanol/voda (7:3, v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min. Detekce UV 254 a 270 nm.

Metoda D: (kyselina aristolochová I, AAI) Kolona o rozměrech 4 x 250 mm, sorbent Reprisil 100 (C-18), 5 µm, mobilní fáze methanol/voda/kyselina octová (65:34:1, v/v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min. Detekce UV 250 nm. Chromatogramy byly vyhodnoceny programem Clarity (DataApex).

Dále byla k analýze reakčních směsí použita TLC (sorbent SiO₂, Macherey-Nagel), mobilní fáze hexan/chloroform (8:2), detekce UV při λ = 254 nm, resp. hmotnostní spektrometrie (Bruker Esquire 3000, ESI; Shimadzu QP 2010 (GC-MS)).

Pro detekce tritia v radioaktivních experimentech byl použit kapalinový scintilační spektrometr Beckmann 6000 LS (scintilační roztok Rotiszint ecoplus, Roth) a HPLC detektor radioaktivity Flow scintillation analyzer 150TR s měřicí celou plněnou scintilačním sklem (Packard) připojený k výše uvedené HPLC sestavě. Autoradiogramy byly získány na přístroji Instant Imager (Packard).

Příprava [³H]tributylstannanu byla provedena na spolupracujícím pracovišti ÚJV v Řeži podle dodaného návodu. K 100 µl chlorotributylstannanu ve 3 ml suchého tetrahydrofuranu bylo přidáno 100 mg sušeného uhličitanu vápenatého, 5 mg 10 % Pd/C. Reakční směs byla míchána po dobu 5 h při 50° C. Poté bylo odstraněno plynné tritium a reakční směs byla bez dalších úprav použita k hydrodehalogenačním reakcím. Celková aktivita reagentu byla 2,6 GBq v ca. 3 ml objemu.

Tritiace sanquinarinu byla provedena rovněž na ÚJV Řež. Sanquinarin (5,2 mg) byl rozpuštěn ve vodném methanolu (1:1, v/v; 5 ml), přidán katalyzátor (5% Pd/BaSO₄, 21,4 mg) a směs byla tritiována plynným tritiem za laboratorní teploty po dobu 90 min. Po ukončení reakce byla odstraněna labilní aktivita několikanásobným odpařením s methanolem. Odparek byl rozpuštěn v methanolu. Výsledný roztok o objemu 8,1 ml vykazoval aktivitu 264,7 MBq.

Na stejném pracovišti byla rovněž připravena výchozí látka pro tritiaci 2-nitroanisolu. 2-aminoanisol (anisidin) byl rozpuštěn v methanolu, přidán katalyzátor 10 % Pd/C a tritiován plynným tritiem po dobu dvou hodin. Výsledná látka v 3 ml methanolu vykazovala aktivitu 104,4 MBq, dle TLC cca 40 % aktivity bylo vázáno v 2-aminoanisolu.

5.2 Experimenty

5.2.1 2-Nitroanisol

Příprava katalyzátoru PCWP¹¹

Reakcí 1,6 g cetylpyridinium chloridu (CPC) $C_{21}H_{38}NCl \cdot H_2O$, 14,8 ml H_2O a 4,25 g kyseliny fosfowolframové $H_7[P(W_2O_7)_6] \cdot xH_2O$ a přikapáváním 74 ml H_2O_2 30% za laboratorní teploty byl připraven žlutavý komplex PCWP ($[\pi-C_5H_5N^+(CH_2)_{15}CH_3]_3\{PO_4[W(O)(O_2)_2]_4\}^{3-}$).

Oxidace ³H-anisidinu na [³H]2-nitroanisol

V baňce bylo smícháno 50 mg komplexu PCWP, 140 μ l ³H-anisidinu, 0,5 ml H_2O_2 a 3 ml $CHCl_3$. Reakční směs byla míchána magnetickým míchadlem a zahřívána pod refluxem 4 hodiny na cca 70°C. Poté byl celý materiál extrahován do dichlormethanu. Tento byl odstraněn odpařením, odparek byl rozpuštěn v 1 ml methanolu. Čištění a analýza byla provedena HPLC (Metoda A).

5.2.2 Sanguinarin

Reakční směs po tritiaci sanguinarinu byla předčištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (Merck 100, 8 x 150 mm). Jako mobilní fáze byl použit čistý methanol. Byly sbírány frakce po 4 minutách (8 kapek/min) a v jednotlivých frakcích byla stanovena aktivita LSC. Frakce 3 - 6 vykazující aktivitu byly spojeny a analyzovány HPLC (Metoda B). [³H]sanguinarin byl z předčištěného vzorku o objemu 2,5 ml izolován HPLC za výše uvedených podmínek postupným manuálním nástřikem vzorku po 25

μl. Na základě kalibrační závislosti neaktivního preparátu byla stanovena koncentrace sanguinarinu v izolovaném preparátu, měrná aktivita byla stanovena podle LSC měření. Obvyklé parametry udávané pro značené sloučeniny jsou uvedeny v Příloze 1 - Protokolu o přípravě značené sloučeniny.

5.2.3 Aristolochová kyselina

Reduktivní dehalogenace p-jodacetanilidu tributylstannanem.

K roztoku 3 mg (0,011 mmol) p-jodacetanilidu v 3 ml suchého tetrahydrofuranu bylo přidáno 10 μl (0,38 mmol) tributylstannanu. Reakční směs byla za nepřístupu vzduchu míchána magnetickým míchadlem. Reakce byla prováděna při teplotách 25 a 50 °C po dobu 4 hodin. V půlhodinových intervalech byly odebírány vzorky (50 μl) zpracovány přidavkem 300 μl mobilní fáze a analyzovány HPLC (Metoda C). Chromatogramy byly interpretovány vzhledem ke standardům p-iodacetanilidu resp. acetanilidu naměřených za stejných podmínek.

Reakce byla za stejných podmínek provedena s větším přebytkem tributylstannanu (100 μl, 0,38 mmol) a dále v přítomnosti 0,5 mg katalyzátoru.

Příprava tributylstannanu z chlorotributylstannanu

K 100 μl chlorotributylstannanu ve 3 ml suchého tetrahydrofuranu bylo přidáno 100 mg sušeného uhličitanu vápenatého, 5 mg 10 % Pd/C. Reakční směs byla míchána po dobu 4 h. Reakce byla provedena při laboratorní teplotě a při 50° C. Vznik tributylstannanu byl detekován reakcí s p-jodacetanilidem za podmínek reduktivní dehalogenace.

Modelová redukce [³H]tributylstannanem

K roztoku 1 mg (0,004 mmol) p-jodacetanilidu v 1 ml suchého tetrahydrofuranu bylo přidáno 0,5 mg komplexu bis(trifenylfosfino)dichloronikelnatého a 200 μl směsi připravené hydrogenací chlorotributylstannanu za katalýzy Pd/C (viz materiály a

metody). Reakční směs byla za nepřístupu vzduchu míchána magnetickým míchadlem. Reakce probíhala při teplotě 50 °C po dobu 4 hodin. Po uplynutí reakční doby byl odebrán vzorek (100 µl, který byl zpracován přidavkem 200 µl mobilní fáze a centrifugován). Supernatant byl analyzován HPLC s detekcí UV a detekcí radioaktivity.

Jodace kyseliny aristolochové

Vzhledem k nepatrným množstvím dostupného substrátu byla pro jodaci použita chloraminová metoda. K 0,5 mg aristolochové kyseliny I v 1 ml fosfátového pufru (0,05 mol/l, pH 7,5) byl přidán 1 ml roztoku NaI / fosfátový pufr (2 mg/ml) a 1 ml roztoku chloraminu T / fosfátový pufr (0,5 mg/ml). Směs byla za občasného promíchání ponechána reagovat 30 min. Poté byla reakce zastavena přidáním 1 ml 1 % roztoku siřičitanu sodného. Směs byla okyselena roztokem HCl na pH 3 a extrahována chloroformem (3x 3 ml). Chloroformový extrakt byl přes noc sušen síranem hořečnatým, sušidlo bylo odděleno a rozpouštědlo odpařeno. Bylo získáno 2,4 mg jasně žluté pevné látky, která byla bez dalšího čištění použita k hydrodehalogenační reakci.

Stopovací experiment jodace kyseliny aristolochové s přidavkem Na¹³¹I

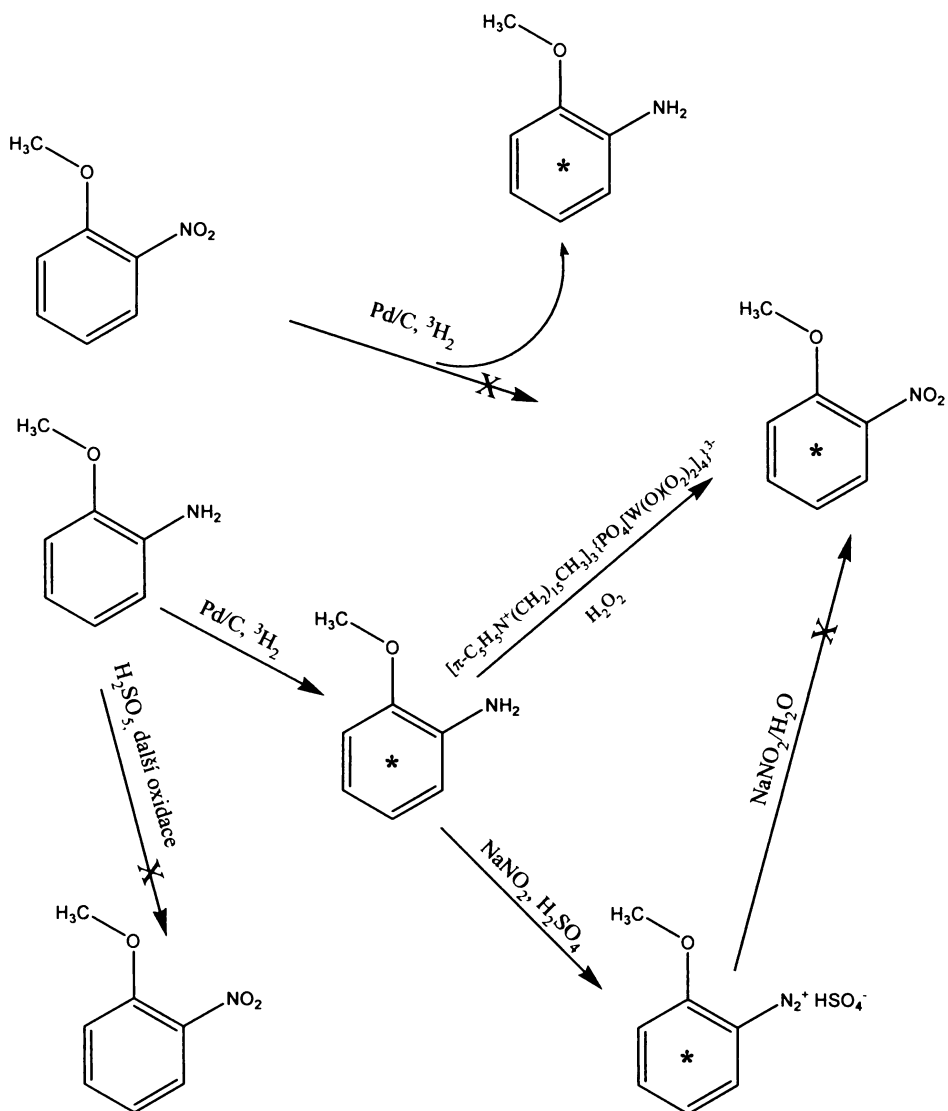
Jodace byla provedena stejným postupem pouze v desetinných navážkách vzhledem k původnímu předpisu. Před přidáním chloraminu T byl do reakční směsi přidán roztok Na¹³¹I (ca. 500 kBq). Chloroformový extrakt byl analyzován TLC a elektronickou autoradiografií.

Hydrodehalogenace kyseliny jodaristolochové připraveným tributylstannanem a [³H]tributylstannanem byla provedena za stejných podmínek jako výše uvedená modelová redukce tritiováním hydridem.

6 Výsledky a diskuse

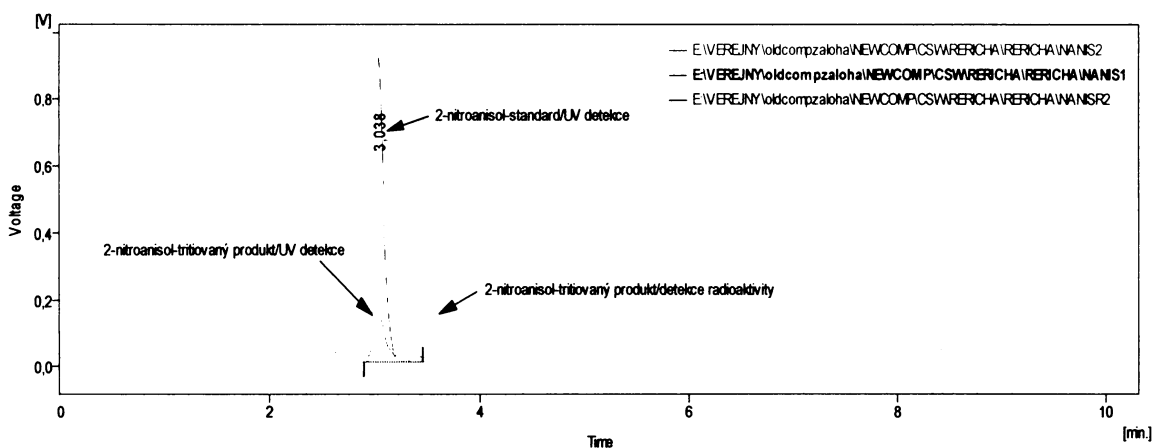
6.1 2-Nitroanisol

Při přípravě tritiovaného 2-nitroanisolu zjevně nelze použít přímé tritiace molekuly, protože by bezpochyby došlo k redukci nitroskupiny na aminovou. Bylo tedy nutné zvolit jiný prekurzor, jímž mohl být buďto fenol či anisol, kde by bylo po tritiaci nutné provést nitraci a separovat příslušný o-izomer. Nebo se naskýtá možnost použít 2-anisidin, tento bez nebezpečí změny v molekule tritiovat a poté převést aminoskupinu na nitrosubstituent. Toto převedení je teoreticky možné provést klasicky přípravou odpovídající diazoniové soli a jejím rozkladem v přítomnosti dusitanu. Přestože se reakce diazoniových solí hojně používají i v radiochemických syntézách jejich výtěžky nejsou příliš exkluzivní. V řešeném případě diazotační metoda prakticky selhávala, pravděpodobně vlivem nestability diazoniové soli. Jako schůdné řešení se nakonec ukázal méně obvyklý syntetický přístup zahrnující oxidaci aminoskupiny tritiovaného 2-anisidinu peroxidem vodíku za katalýzy cetylpyridinium peroxofosfowolframatem PCWP¹¹ ($[\pi\text{-C}_5\text{H}_5\text{N}^+(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3]_3\{\text{PO}_4[\text{W}(\text{O})(\text{O}_2)_2]_4\}^{3-}$). Schéma syntetické rozvahy je na obr. 4.



Obr. 4 Schéma strategické rozvahy při přípravě tritiovaného o-nitroanisolu.
(hvězdičkou v kruhu je značeno tritiované aromatické jádro).

Parametry získaného preparátu jsou uvedeny v následujícím přehledu, celkový protokol je jako Příloha 1, chromatogram s UV detekcí a detekcí radioaktivity je na obrázku 5.



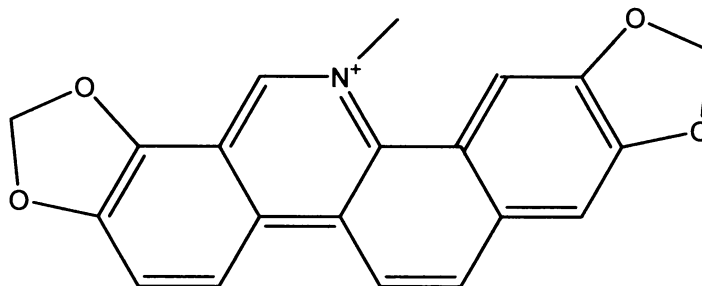
Obr. 5 Chromatogram připraveného [^3H]2-nitroanisolu (HPLC Metoda A, červená – standard, UV detekce, modrá – tritiováný produkt detekce UV, zelená - detekce radioaktivity, posun UV signálu a signálu radioaktivity odpovídá objemu spojovací kapiláry mezi oběma detektory)

Přehled parametrů získaného preparátu.

- ✓ Výtěžek/metoda : 3,2 mg / zvážení produktu
- ✓ Chemická čistota : 88 % / HPLC UV
- ✓ Radiochemická čistota : 95+ %
- ✓ Měrná aktivita : 34,5 MBq/mmol, 0,225 MBq/mg
- ✓ Celková aktivita : 0,72 MBq
- ✓ Objem vzorku : 3 ml
- ✓ Rozpouštědlo : methanol
- ✓ Koncentrace : 3,2 mg/3 ml
- ✓ Objemová aktivita : 0,24 MBq/ml

6.2 Sanguinarin

Pro tritiaci sanguinarinu byla zvolena obvyklá metoda katalytické izotopové výměny s plynným tritiem. Struktura sanguinarinu (obr. 6)



Obr. 6 Struktura sanguinarinu

se zdála být vůči reakci poměrně inertní. Přesto byly zvoleny velmi mírné podmínky a palladium na síranu barnatém jako katalyzátor místo obvyklého palladia na uhlí. Důvodem byla potenciální možnost hydrogenolýzy dioxolanových kruhů.

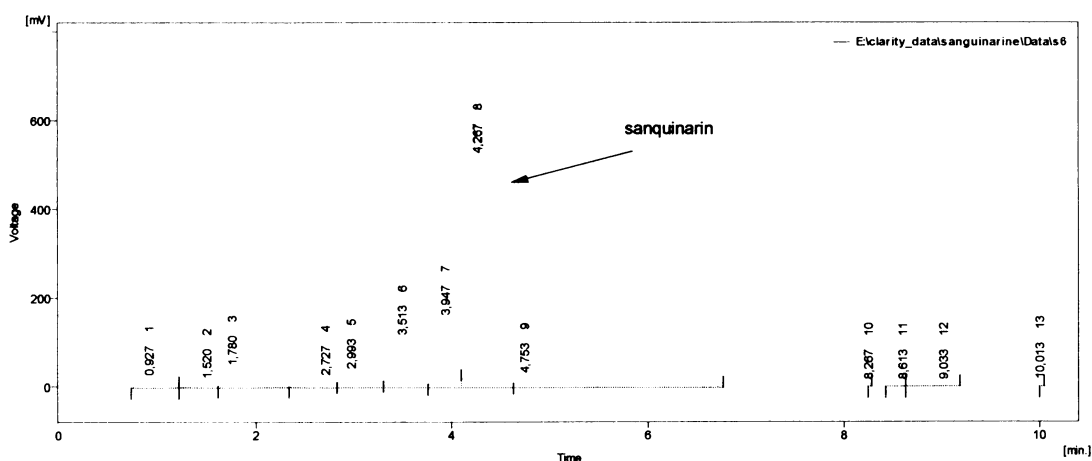
Analýzou neaktivního výchozího vzorku sanguinarinu na tenké vrstvě bylo zjištěno, že již dodaná výchozí látka není chemicky čistá. Došlo k rozdělení na dvě zóny, z nichž jedna zůstávala za daných podmínek na startu. Analýzou extrahovaných skvrn pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že látka pohybující se v použité mobilní fázi je vlastní sanguinarin. Zbylé komponenty vzorku potom již nebyly identifikovány.

Protože se předpokládalo, že výsledný produkt po tritiaci bude kontaminován větším či menším množstvím nově vzniklých nečistot byla k tritiaci použita přímo dodaná substance. Tritiace byla provedena v ÚJV Řež na standartní tritiační aparatuře. Výsledný roztok po odstranění labilní aktivity měl objem 8,1 ml vykazoval aktivitu 264,7 MBq. Izolace [³H]sanguinarinu z reakční směsi byla provedena ve dvou fázích. Pomocí sloupcové chromatografie byla získána předčištěná frakce, která vykazovala mobilitu v daném chromatografickém systému a ta byla následně přečištěna HPLC. Čistota vzorku byla ověřena chromatografií zahuštěných a sebraných frakcí. Důvodem pro dvoufázovou izolaci byl fakt, že nečistoty přítomné v primární reakční směsi prodlužovaly a komplikovaly HPLC separační

proces a po několika nástřících bylo nutné několikahodinové promývání kolony, aby mohly být jednotlivé separace reprodukovatelné. Sebrané frakce byly nařaděny na definovaný objem a na základě UV kalibrace (HPLC) byla stanovena koncentrace látky ve vzorku, aktivita byla stanovena LSC.

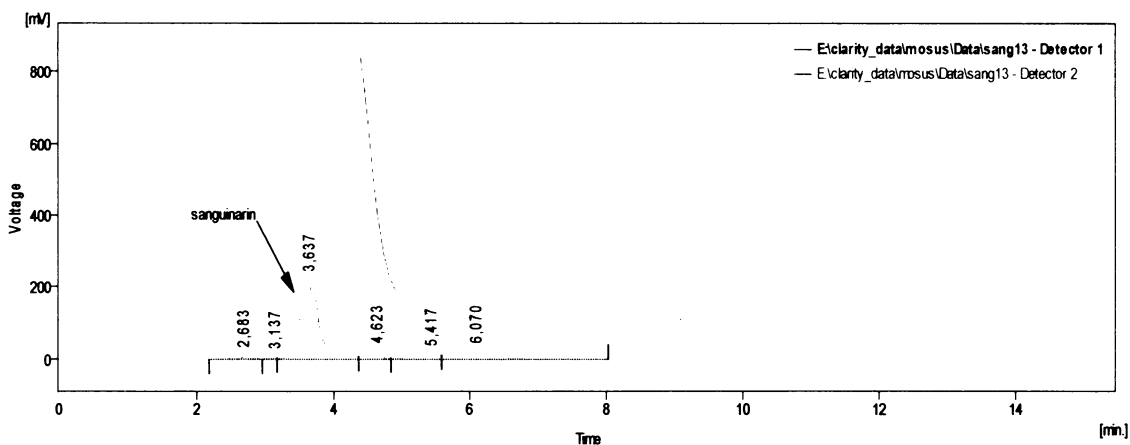
Z praktických důvodů byl v první fázi proveden orientační pokus s malým množstvím (0,5 ml) reakční směsi. Chromatografie na silikagelu/methanol poskytla celkem 9 frakcí v časových úsecích $t = 4$ min při rychlosti $v = 8$ kapek/min. Alikvoty jednotlivých frakcí byly měřeny LSC a bylo zjištěno, že nejvýraznější podíl aktivity se vyskytuje ve frakcích 3-6, což odpovídalo předchozím experimentům s chromatografií neaktivní substance. Spojené frakce 3-6 potom obsahovaly 28 % celkem k separaci použité aktivity (4,66 MBq), chromatogram (UV) je na obrázku 7. Vlastní HPLC separace byla poté provedena postupným nástřikem předčištěné reakční směsi (20 μ l) za podmínek Metody B.

Zbylá reakční směs z tritiae byla zahuštěna za vakua na přibližně 1,5 ml a podrobena stejné proceduře. Celkový objem spojených frakcí byl 4,4 ml. Výsledný objem vzorku byl upraven na 3 ml, z chromatografické analýzy byla stanovena koncentrace a chemická čistota vzorku (UV), stejně tak jako radiochemická čistota (HPLC scintilační detektor).



Obr. 7 Chromatogram předčištěné reakční směsi z tritiae sanguinarinu (HPLC metoda B - viz materiály a metody)

Parametry získaného preparátu jsou uvedeny v následujícím přehledu, celkový protokol je jako Příloha 2, chromatogram výsledného produktu s UV detekcí a detekcí radioaktivity je na obrázku 8.

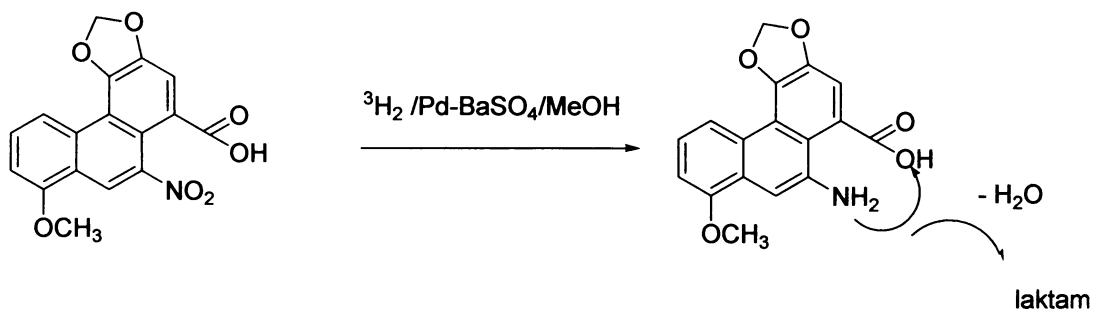


Obr. 8 Chromatogram připraveného [³H]sanguinarinu (HPLC Metoda B, modrá detekce UV, červená - detekce radioaktivity, posun signálů mezi detektory odpovídá objemu spojovací kapiláry)

- ✓ Chemický výtěžek/metoda: izolováno 7,5% původně vnesené substance (HPLC, UV kalibrace)
- ✓ Chemická čistota : > 95% (HPLC)
- ✓ Radiochemická čistota : > 95% (HPLC – detekce radioaktivity)
- ✓ Měrná aktivita produktu : 276 MBq/μmol
- ✓ Celková aktivita produktu : 282 MBq
- ✓ Celkový objem vzorku : 3 ml
- ✓ Rozpouštědlo : H₂O, octan amonný max. 32 mg/ml
- ✓ Hmotnost : 0,375 mg (UV kalibrace)
- ✓ Koncentrace : 0,125 mg/ml
- ✓ Objemová aktivita : 94 MBq/ml

6.3 Aristolochová kyselina

V případě aristolochové kyseliny je metoda přímé tritace prakticky nepoužitelná. Struktura obsahuje nitroskupinu, která je za podmínek tritace redukována na aminoskupinu, která interaguje s volným karboxylem za vzniku aristolaktamu. Této reakci napomáhá i sterické uspořádání, které rezultuje v tvorbu šestičlenného laktamového kruhu (Obr.9)

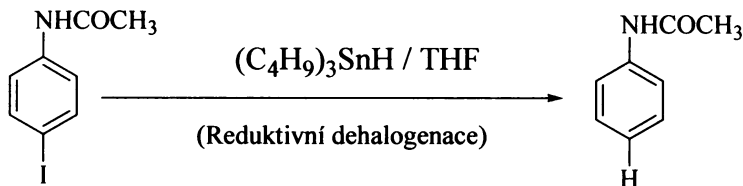


Obr. 9 Schéma spontánní tvorby aristolaktamu

Pro uvedenou látku bylo tedy nutné navrhnout a otestovat metodu značení, která by nemodifikovala uvedenou strukturu a zároveň splňovala požadavky kladené na radiochemické syntézy, jak z hlediska provedení, tak i z hlediska bezpečné manipulace se zdroji ionizujícího záření. Současně by bylo vhodné, aby metoda byla ještě dále použitelná na látky, obsahující redukovatelné fragmenty skeletu. Jedním z možných postupů se ukázalo použití reduktivní dehalogenace aryljodidů vhodným hydridovým činidlem. Klasické metody reduktivní dehalogenace sice poskytují dobré výtěžky, nicméně používají taková činidla, která neřeší problém redukce dalších funkčních skupin. Již dříve byla testována možnost použití silanů³⁸. Atraktivnějším se zdálo použití stannanů, které by mohly splňovat výše uvedené požadavky.

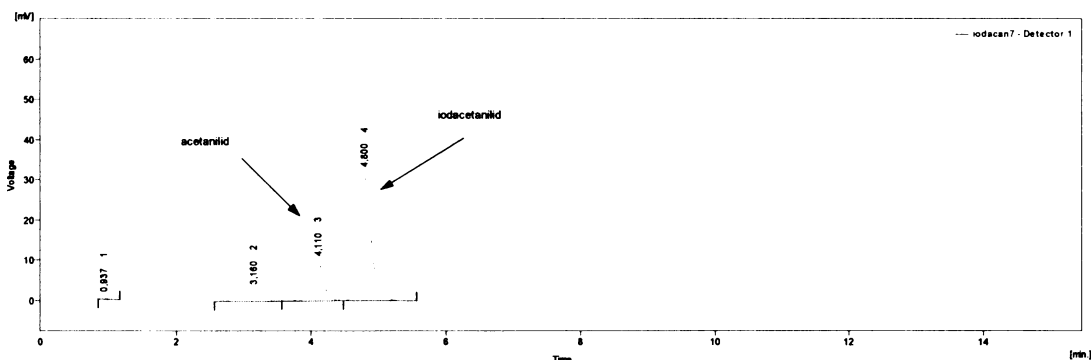
Samotná příprava arylhalogenidů, konkrétně aryljodidů, není principiálně problémem, protože kromě klasických metod jsou k dispozici i metody radiojodace, které dovolují vnášet jod na aromatické jádro chloraminovou, jodogenovou nebo enzymatickou metodou. Jejich použití v neaktivním provedení nic nebrání.

Reakce byla testována na modelovém substrátu p-jodacetanilidu, který reduktivní dehalogenací přechází na acetanilid (obr. 10). Pro testování byl použit komerčně dodávaný tributylstannan



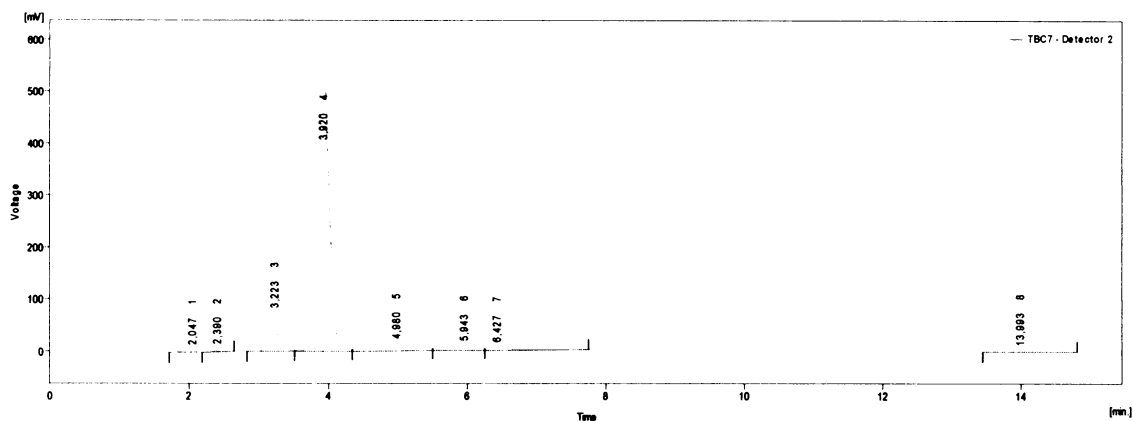
Obr 10 Schéma modelové reakce

V uvedeném reakčním systému bylo nutné nejdříve nalézt podmínky pro provedení vlastní reakce. Reakce byla testována za různých teplot, s rozdílným poměrem substrát/reagent a v přítomnosti různých katalyzátorů. Stupeň konverze výchozí látky byl analyzován HPLC (Metoda C, obr. 11)

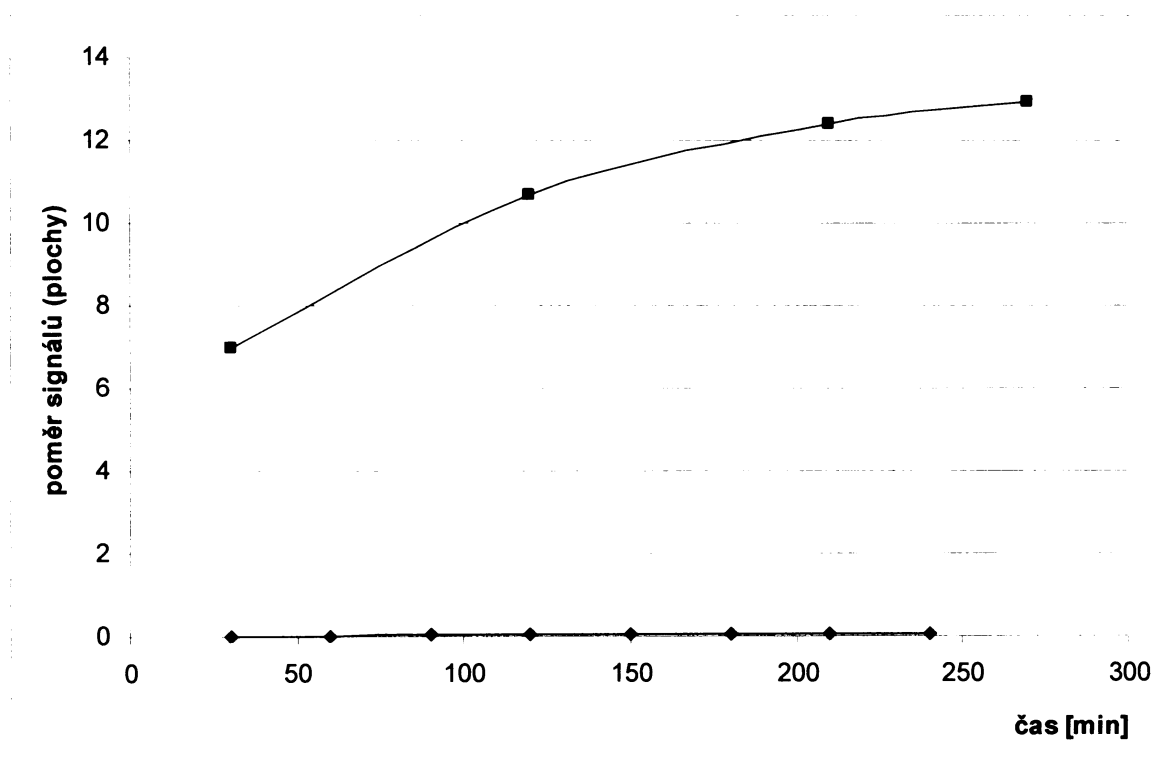


Obr. 11 HPLC separace p-jodacetanilidu a acetanilidu - Metoda C, (modrá pro $\lambda = 254$ nm, červená pro $\lambda = 270$ nm)

Při provedení reakce za laboratorní teploty a zhruba trojnásobném molárním přebytku tributylstannanu probíhá reakce velmi neochotně. Sledovaný poměr signálů výchozí látky a produktu nepřesahuje jednotky procent. Zvýšení reakční teploty na 50 °C rovněž nevedlo k výraznému nárůstu množství produktu v reakční směsi. Přestože sledovaný poměr ploch signálů se se vzrůstajícím časem zvyšuje, výsledná konverze výchozí látky nepřesahuje 10 %. (Obr. 12)



Obr.12 Chromatogram reakční směsi p-jodacetanilidu s tributylstannanem (molární poměr 1:3) po 4 hodinách reakce při 50 °C, HPLC - Metoda C; signál 3,9 min odpovídá výchozímu p-jodacetanilidu, signál při 3,22 min je produkt - acetanilid (8 % plochy vzhledem k výchozí látce).



Obr. 13 Srovnání průběhu reakce tributylstannanu s p-jodacetanilidem v THF při 50 °C. Modrá - trojnásobný molární přebytek stannanu, červená - třicetinásobný molární přebytek stannanu. Analýza HPLC (Metoda C), vynášen poměr ploch pod křivkou pro výchozí p-jodacetanilid ku vznikajícímu acetanilidu.

Zvýšení molárního poměru tributylstannanu k substrátu na 30:1 vedlo k výraznému zlepšení výtěžků, po 4 hodinách reakce byl chromatografickým měřením stanoven výtěžek 93 %. Identita vzniklé substance byla ověřena MS analýzou vzorku mobilní fáze odpovídající elučnímu objemu standardní substance. Časový průběh reakce ukazuje obr. 13.

Vzhledem k tomu, že předpokládaný účel zkoumané reakce je tritiace odpovídajícím stannanem nelze předpokládat výraznou možnost ovlivnění průběhu reakce nadbytkem tritiovaného stannanu, který bude muset být použit bez izolace v reakčním systému ve kterém bude připraven. Použití teploty rovněž nevede v uvedené souvislosti k rozumnému zvýšení výtěžku. Jedinou možností, jak optimalizovat daný systém je použití vhodného katalyzátoru. Jako katalyzátory byly testovány 10% Pd/C a trifenyfosfinové komplexy :

komplex bis(trifenyfosfino)dichloropalladnatý $[\text{PdCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_2]$

komplex tris(trifenyfosfino)chloroměďnatý $[\text{CuCl}(\text{Ph}_3\text{P})_3]$

komplex tris(trifenyfosfino)chlororhodný $[\text{RhCl}(\text{Ph}_3\text{P})_3]$

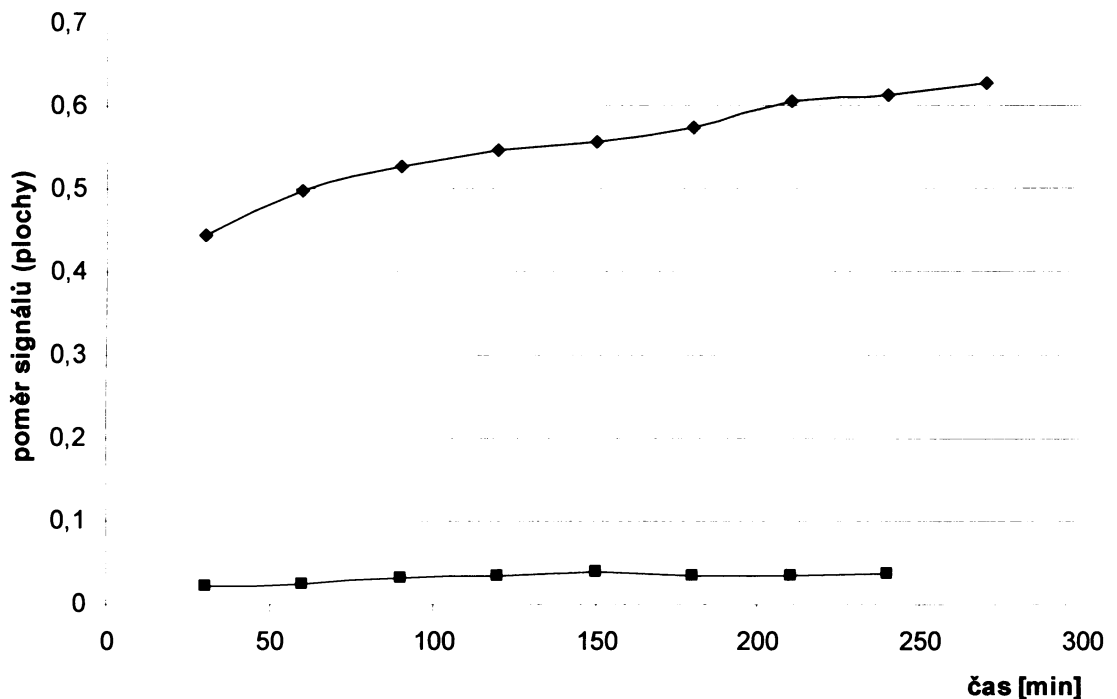
komplex tris(trifenyfosfino)dichlororuthenatý $[\text{RuCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_3]$

komplex bis(trifenyfosfino)dichloroplatnatý $[\text{PtCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_2]$

komplex bis(trifenyfosfino)dichloronikelnatý $[\text{NiCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_2]$

Reakce byly prováděny pouze s trojnásobným molárním přebytkem tributylstannanu. V této souvislosti je potřeba vzít v úvahu, že se jedná o reaktivní hydrid, který je rozkládán vlhkostí jak při manipulaci, tak třeba i zbytkovou vlhkostí reakčního rozpouštědla, či vlhkostí, kterou získá při dávkování. Tyto technické problémy lze sice eliminovat, nicméně vzhledem k předpokládanému použití metodiky pro radiochemickou syntézu byla dána přednost simulaci radiochemických syntetických postupů a tedy předpokládaného pozdějšího reálného provedení, před totální izolací od vlhkosti.

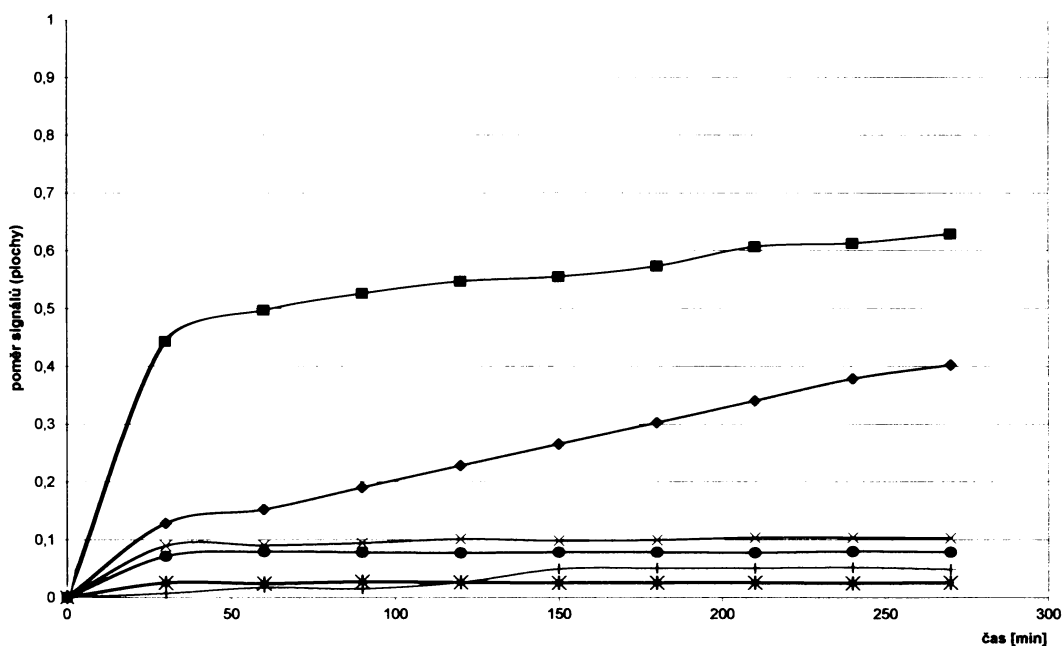
Průběh první testované reakce katalyzované komplexem bis(trifenyfosfino)dichloropalladnatým ve srovnání s nekatalyzovanou reakcí je srovnán na obr.14.



Obr. 14 Srovnání průběhu reakce tributylstannanu s p-jodacetanilidem v THF při 50 °C bez přidavku katalyzátoru (červená) a s přidavkem komplexu bis(trifenylfosfino)dichloropalladnatého. Analýza HPLC (Metoda C), vynášen poměr ploch pod křivkou pro vznikající p-jodacetanilid k acetanilidu.

Z grafického znázornění je zřejmé, že katalyzovaná reakce dosahuje uspokojivých výtěžků. Již po 30 minutách je chromatografický výtěžek okolo 30 %, s prodloužením reakční doby se ještě zvyšuje ke 40 %. Takovýto experimentální systém už umožňuje provedení syntézy v tritiovaném provedení s dostatečnou účinností.

Srovnání účinnosti použitých katalyzátorů je znázorněno na obr. 15.



Obr. 15 Srovnání účinnosti různých katalyzátorů pro reduktivní dehalogenaci p-jodacetanilidu (reakce v THF, 50°C, 0,5 mg katalyzátoru, trojnásobný molární přebytek stannanu vůči substrátu, osa y = poměr ploch chromatografických signálů acetanilidu/p-jodacetanilidu).

Pd/C (modrá)

PdCl₂(Ph₃P)₂ (ružová)

NiCl₂(Ph₃P)₂ (žlutá)

PtCl₂(Ph₃P)₂ (červená)

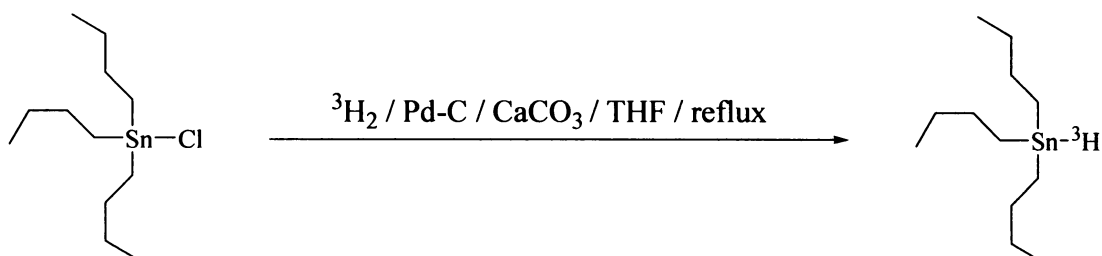
RuCl₂(Ph₃P)₃ (fialová)

RhCl(Ph₃P)₃ (hnědá)

CuCl(Ph₃P)₃ (zelená)

Z naměřených výsledků je zřejmé, že nejaktivnějším katalyzátorem je komplex niklu, který poskytuje jak dobré výtěžky, tak i přijatelnou reakční dobu. Použitelným se zdá i komplex palladia nebo použití Pd/C, které je přítomno přímo v reakční směsi po tritiaci chlorotributylstannanu. Jejich použití by však vyžadovalo podstatně delší reakční doby. Pozitivním je však fakt, že nedokonalé odstranění Pd/C z reakční směsi po přípravě tritidového činidla neovlivní významně reakci katalyzovanou komplexem niklu při krátké reakční době dostatečné pro reakci s tímto katalyzátorem, a pokud ano, tak v pozitivním smyslu.

Příprava [^3H]tributylstannanu z chlorotributylstannanu (Obr. 16) byla experimentálně navržena tak, aby byla proveditelná v standartní tritiační aparatuře.

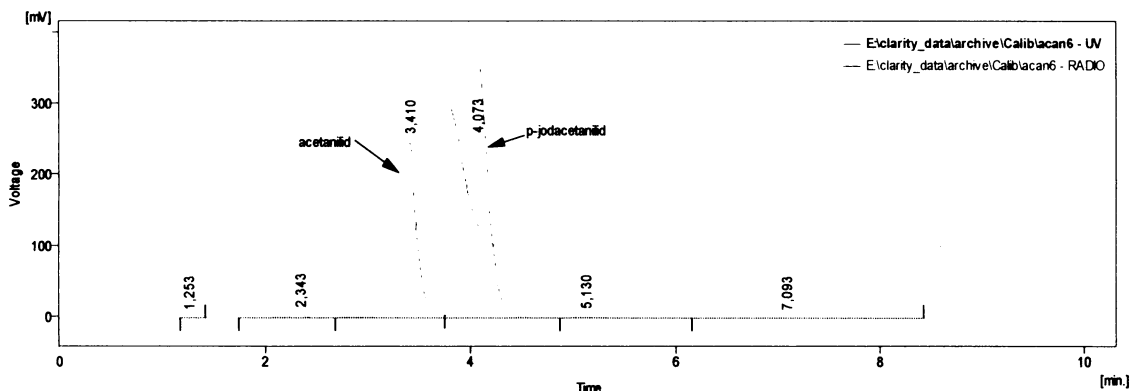


Obr. 16 Příprava [^3H]tributylstannanu

V první fázi byla prováděna v neaktivním provedení s plynným vodíkem a k analytickému vyhodnocení byla použita reakce p-jodacetanilidem, kde bylo analytické vyhodnocení poměrně jednoduché a zároveň simulovalo následné radiochemické využití. Byly prováděny i pokusy s deuterací, kdy deuterium bylo získáváno rozkladem deuterium oxidu sodíkem. Výsledky však nebyly příliš průkazné a proto byly vyhodnoceny pouze experimenty s vodíkem a následně s tritiem.

Katalyzovaná redukční reakce chlorotributylstannanu s plynným vodíkem v tetrahydrofuranu a uhličitánem vápenatým jak bází se ukázala být efektivní za podmínek zahřívání na 50 °C a reakční době 4 h. Výtěžek reakce v tomto případě opět nebyl stanovován přímo, jako optimum byly vybrány podmínky poskytující nejvýhodnější poměr acetanilidu k p-jodacetanilidu ve spřažené reakci použité k detekci vznikajícího hydridu. Tritiační reakce byla provedena za stejných podmínek jako reakce s plynným vodíkem, kdy byl získán roztok reagentu v THF o celkové aktivitě 2,6 GBq/3 ml. Palladiový katalyzátor nebyl ze systému odstraňován, pro vlastní další práci byl opatrně odpipetován roztok nad sedlým katalyzátorem. Z experimentů s katalyzátory při dehalogenační reakci vyplývá, že zbytková přítomnost Pd/C neovlivňuje významně průběh dalších reakcí a může mít maximálně mírně pozitivní vliv.

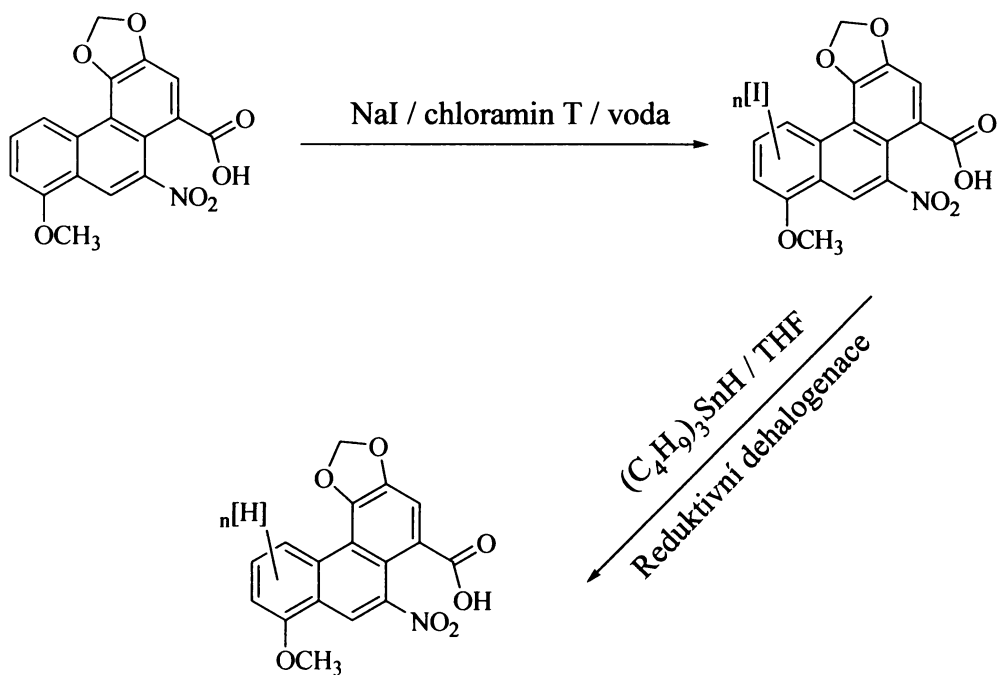
Modelový experiment s p-jodacetanilidem prokázal schopnost připraveného tritiačního činidla hydrodehalogenovat uvedený substrát. Chromatogram reakční směsi je na obrázku 17.



Obr. 17 Chromatografie reakční směsi při reakci p-jodacetanilidu s reakční směsí z přípravy [^3H]tributylstannanu (Metoda C, modrá - detekce UV 254 nm, červená - detekce radioaktivity- posun píku odpovídá objemu spojovací kapiláry mezi detektory)

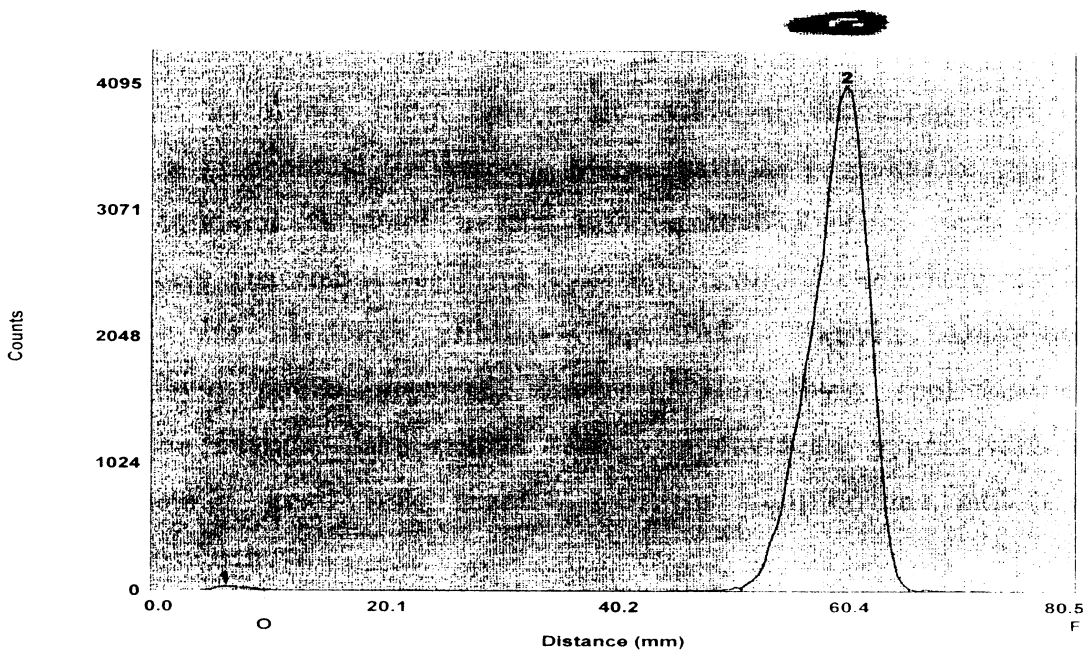
Dále byla testována stabilita připraveného stannanu s cílem ověřit, jak dlouho bude surová reakční směs aktivní pro reduktivní dehalogenaci. Skladování probíhalo za standardních podmínek - uzavřená reakční baňka, ve které byla provedena reakce, běžná teplota v lednici. Testy prokázaly, že i po třech měsících skladování je reakční směs z tritiační reakce schopna dehalogenovat modelový substrát, jak bylo prokázáno měřením radioaktivity. Výtěžky se zdají být nižší, ale vzhledem k vysoké aktivitě činidla přesto dostatečné pro tritiaci substrátů použitelných pro stopovací experimenty.

Příprava [^3H]aristolochové kyseliny, jak vyplývá z předchozího sleduje schéma uvedené na obr. 18



Obr. 18 Návrh syntetického postupu pro modifikaci molekuly aristolochové kyseliny tritiem.

Pro první krok - přípravu jodderivátu byla zvolena metoda jodace chloraminovou metodou. Výhodou je rychlost přípravy a především to, že metoda je použitelná v mikrokvantech, což ji preferuje právě pro substráty, které jsou dostupné pouze v malých množstvích. Pro ověření inkorporace jodu do molekuly byla reakce provedena s přidavkem ^{131}I , která prokázala úspěšnost reakce. Na obr. 19 je autoradiogram TLC analýzy izolovaného produktu a distribuce radioaktivity podle dráhy chromatogramu. Poloha radioaktivní skvrny odpovídá R_F aristolochové kyseliny v chromatografickém systému methanol/toluen (7:3). Rozdělení jodovaného produktu od původní substance se v TLC systému ukázalo jako nereálné.



Obr. 19 Autoradiogram (nahore) a distribuce radioaktivity (dole) v izolovaném produktu po jodaci aristolochové kyseliny.

Z TLC analýz je zřejmé, že izolovaný produkt má v sobě inkorporovaný jod. Vzhledem k obtížím separace výchozí látky a produktu může být sice chromatografická skvrna superpozicí jodované a nejodované látky, což však pro daný účel nevadí, pouze může snížit měrnou aktivitu. V každém případě není v izolovaném produktu další jodovaná látka nebo produkt destrukce molekuly.

Reakce jodaristolochové kyseliny s tritiační směsí obsahující [³H]tributylstannan byla provedena v tetrahydrofuranu za katalýzy NiCl₂(Ph₃P)₂, který se v testovacích experimentech ukázal jako neaktivnější a za podmínek ověřených pro reduktivní dehalogenaci p-jodacetanilidu. Reakční směs byla analyzována HPLC. Při analýze s detekcí radioaktivity se zjistilo že reakční směs obsahuje majoritní podíl aktivity s malým retenčním časem, který neodpovídá retenčnímu času aristolochové kyseliny. V oblasti jejího elučního objemu se vyskytl pouze malý signál aktivity, který byl vyhodnocen na přibližně 1 % celkové aktivity analyzovaného vzorku. Sebraná frakce v retenčním čase odpovídajícím aristolochové kyselině vykazovala aktivitu 1.57·10⁶ DPM. Protože nebylo možné stanovit přesně koncentraci ve finálním vzorku byl výpočet získané měrné aktivity proveden

pouze orientačně na základě vnesené hmotnosti do jodační reakce a separovaného alikvotu reakční směsi (20 μ l obsahujících cca. 0,055 μ g aristolochové kyseliny), které neodporuje získaným chromatografickým výsledkům a předchozím kalibracím. Měrná aktivita produktu je potom $1,6 \cdot 10^5$ MBq/mmol. V rámci tritiace aristolochové kyseliny tedy byla získána tritiem značená látka, která vykazuje identické chromatografické chování a výše uvedenou přibližnou specifickou aktivitu. Izolované substance bylo pouze nepatrné množství, které bylo spotřebováno k analytickým účelům. Jako taková však byla navržena, vypracována a ověřena metoda, která vede úspěšně k tritiem modifikované molekule kyseliny aristolochové.

7 Závěr

Práce je zaměřena na přípravu tritiem modifikovaných biomolekul s poměrně složitou strukturou a přítomností funkčních skupin atakovatelných klasickou výměnnou tritiační reakcí.

[³H]o-nitroanisol byl úspěšně připraven z tritiovaného [³H]o-anisidinu oxidací aminoskupiny peroxokomplexem kyseliny fosfowolframové a cetylpyridinium chloridu.

Přestože u molekuly sanquinarinu vedla katalytická tritiace k částečnému znehodnocení vnesené substance, bylo možné tritiovaný analog izolovat s dostatečnou aktivitou a následně charakterizovat z hlediska značené sloučeniny.

U kyseliny aristolochové vede tritiace k předpokládanému aristolaktamu a reakce je prakticky kompletní, izolace zbytkové koncentrace nedávala smysl. Byla proto vypracována metoda založená na reduktivní dehalogenaci arylhalogenidů, která je použitelná pro uvedený substrát a obecně pro řadu dalších substrátů obsahujících některé redukovatelné funkční skupiny. Metoda byla testována na modelovém systému p-jodacetanilid/acetanilid s použitím široké škály reakčních podmínek. Vlastní kyselina aristolochová byla úspěšně jodována a následně dehalogenována na produkt chromatograficky odpovídající kyselině aristolochové a vykazující radioaktivitu.

Všechny značené substance definované v cíli projektu byly připraveny, stejně tak jako byla úspěšně provedena studie reduktivní dehalogenace arylhalogenidů v neaktivní i radioaktivní formě. Byla tak vypracována metodika vhodná pro vnášení tritia do některých citlivých biomolekul.

8 Seznam použité literatury

- 1 Stiborová M., Mikšanová M.: *Živa* **1999**, 4, 146.
- 2 Lešetický L.: Izotopově značené sloučeniny, Habilitační spis, ČVUT Praha, **2000**.
- 3 Bláha K., Dědek V., Lešetický L., Vereš K.: *Chem. Listy* **1983**, 77, 74.
- 4 Murray III A., Williams D. L.: *Organic Synthesis with Isotopes*, Interscience Publ. Inc., New York, **1958**, str. 893.
- 5 Majer V. a kol. : *Základy jaderné chemie*, str. 503-528, SNTL/ALFA, Praha **1981**..
- 6 Lešetický L. a kol.: *Některé aplikace značených sloučenin*, str. 77-85, UK v Praze **1981**.
- 7 Lešetický L.: *Metody přípravy izotopicky značených sloučenin*, Univerzita Karlova v Praze, SPN Praha **1977**.
- 8 Lind S.C.: *Radiation chemistry*, Reinhold, New York, **1961**.
- 9 Shu A.Y.L., Saunders D., Levinson S.H., Landvatter S.W., Mahoney A., Senderoff S.G., Mack J.F., Heys J.R.: *J. Labelled. Compd. Radiopharm* **1999**, 42, 797 – 807.
- 10 Nielsen A.T., Atkins R.L, Norris W.P.: *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 2341-2347.
- 11 Sakaue S., Tsubakino T., Nishiyama Y., Ishii Y.: *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3633-3638.
- 12 Gilbert K.E., Borden W.T.: *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 659-661.
- 13 Bunnett J. F., Wamser C.C.: *J. Amer. Chem. Soc.* **1967**, 89, 6712.
- 14 Wittig G., Rentzea C. N., Rentzea M.: *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1971**, 744, 8.
- 15 Krishnamurthy S., Brown H.: *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 276.
- 16 Tsujimoto K., Tasak S., Ohashi M.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1975**, 758.
- 17 Brown H.C., Krishnamurthy S.: *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 3918.

- 18 Narisada M., Horibe I., Watanabe F., Takeda K.: *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5308.
- 19 Viciu M.S., Grasa G.A., Nolan S.P.: *Organometallics* **2001**, *20*, 3607.
- 20 Navarro O., Kaur H., Mahjoor P., Nolan S.P.: *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3173.
- 21 Desmartes Ch., Kuhl S., Schneider R., Fort Y.: *Organometallics* **2002**, *21*, 1554.
- 22 Marques C.A., Selva M., Tundo P.: *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3830.
- 23 Menn J.J.: *Environ. Health Persp.* **1987**, *27*, 113.
- 24 Turek B., Hrubý S. a Černá M.: *Nutriční toxikologie*, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno **1994**, str. 18-27.
- 25 Škárka B. a Ferenčík M.: *Biochémiá*, Alfa Bratislava, SNTL Praha **1987**.
- 26 Tomalis L., Aitio A., Wilbourn J. a Shuker L.: *Jpn. J. Cancer Res.* **1989**, *80*, 795.
- 27 Stiborová M.: *Xenobiochemie. Přednáška na PřF UK, katedra Biochemie* **2005**.
- 28 Kasper C.B., Henton D.C., Foureman G.L., Curtis J.F. a Hughes M.F.: *Enzymatic Basis of Detoxication II*, Academic Press, New York **1980**, str. 3.
- 29 Stiborová M., Schmeiser H.H. a Frei E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1997**, *63*, 857.
- 30 Hájek M.: *Diplomová práce, PřFUK, Praha* **2000**.
- 31 Schmeiser H.H., Frei E., Wiessler M. a Stiborová M.: *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 1055.
- 32 Stiborová M., Fernando R.C., Schneider H.H., Frei E., Pfau W. a Wiessler M.: *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 1187.
- 33 Vošmiková H.: *Diplomová práce, PřF UK, Praha* **2000**.
- 34 Mikšanová M.; Šulc M.; Rydlova H.; Schmeiser HH; Frei, E; Stiborova, M : *Chem. Res. Tox.* **2004**, *17*, 5, 663 – 671.
- 35 Chaturvedi, M. M., Kumar, A., Darnay, B. G., Chainy, G. B. N., Agarwal, S., Agarwal, B. B.: *J. Biol. Chem.* **1997**, *48*, 272.
- 36 Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J. a Šimánek V.: *Chemické Listy* **2006**, *100*, 30-41.

- 37 Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet J.P. et al.: Chinese herbs nephropathy: A clue to Balkan endemic nephropathy? *Kidney Int.* **1994**, *45*, 1680-1688.
- 38 Jelínek D.: Diplomová práce, PřF UK v Praze, 1984.

9 Přílohy

9.1 Příloha 1

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy V Praze

Katedra organické a jaderné chemie

Protokol o přípravě izotopicky značené sloučeniny

Požadovaná sloučenina:

[³H]2-nitroanisol

Izotop:

³H

Výchozí látka:

2-aminoanisol, tritiovaný ³H (g)/Pd(C)

Dodavatel:

ing. Hradec

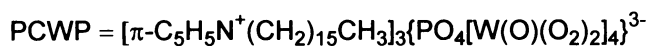
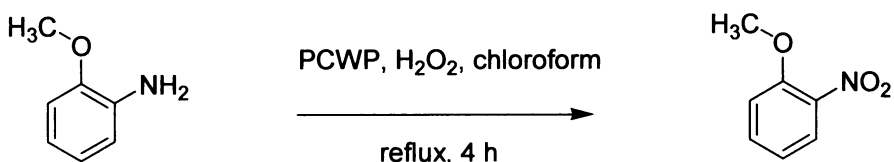
Aktivita:

104.4 MBq v 3 ml MeOH;
dle TLC ca. 40 % aktivity v 2-aminoanisolu

Způsob balení:

lahvička se septem

Reakce:



extrakce do dichlormethanu, LC silikagel/1 % ethylacetát v hexanu

Postup dle:

Sakaue S., Tsubakino T, Nishiyama Y, Ishii Y.: J. Org. Chem. 1993, 58, 3633 – 3638.

Reakce provedena dne: 24. 7. 2002

Výtěžek/metoda: 3.2 mg/ zvážení produktu

Radiochemický výtěžek: nestanoveno

Chemická čistota/metoda: ca. 88 % /HPLC UV

Radiochemická čistota: 95+ %

Měrná aktivita produktu: 34.5 MBq/mmol, 0.225 MBq/mg

Odpady:

Odpady likvidovány v souladu s příslušným předpisem v rámci likvidace radioaktivních odpadů na PřF UK.

Adjustace látky pro expedici:

Balení: lahvička s dvojitým uzávěrem

Celková aktivita: 0.72 MBq

Rozpouštědlo: methanol, 3 ml

Hmotnost látky: 3.2 mg

Koncentrace: 3.2 mg/3 ml

Objem vzorku: 3 ml

Objemová aktivita: 0.24 MBq/ml

Datum měření aktivity: 26.7.2002

Skladovací podmínky: 4 deg C

Poznámky:

Z připraveného roztoku odebráno 50 µl na měření aktivity

Přílohy: HPLC záznam – srovnání standardu , vzorku a HPLC záznam aktivity

HPLC report – tabulka ploch píků v adjustovaném vzorku

Aktivita měřena LSC/ SLT41 jako DPM

Připravil: Markéta Komínková

Expedováno dne : 26.7.2002

9.2 Příloha 2

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy V Praze

Katedra organické a jaderné chemie

Protokol o přípravě izotopicky značené sloučeniny

Požadovaná sloučenina:

	[³ H]sanguinarin
<i>Izotop:</i>	³ H
<i>Výchozí látka:</i>	Sanguinarin
<i>Dodavatel:</i>	Kat. biochemie PŘF UK

Reakce:

tritiumem v MeOH, katalyzátor Pd/BaSO₄, odstranění labilní aktivity, izolace HPLC (Supelcosil C-18, acetonitril/acetátový pufr (50 mM octan amonný + 20 ml kys. octové/l)) 40/60 (v/v)

Postup dle: *originální.*

Reakce provedena dne: 4.12. 2005 - 30. 3. 2006

Chemický výtěžek/metoda: izolováno 7,5 % původně vnesené substance
(HPLC, hmotnostní bilance)

Radiochemický výtěžek: nestanoveno

Chemická čistota/metoda: > 95 % (HPLC)

Radiochemická čistota: > 95 % (HPLC – detekce radioaktivity)

Měrná aktivita produktu: 276 MBq/μmol

Celková aktivita v produktu: 282 MBq

Odpady: Kapalný + pevný odpad uložen ve skladu odpadů PřF UK v Praze ,
likvidace dle platných předpisů

Adjustace látky pro expedici:

Označení vzorku: ^3H sanguinarin
Balení: lékovka, gumové septum
Celkový objem vzorku: 3 ml
Rozpouštědlo: voda, octan amonný max. 32 mg/ml
Hmotnost:
Koncentrace: 0,125 mg/ml
Objemová aktivita: 94 MBq/ml
Datum měření aktivity: 30.3.2006
Skladovací podmínky: 4 °C

Poznámky:

Expedováno dne : 30.3.2006

Připravil: Markéta Komínková, Ing. Šárka Pšondrová, Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.,

Abstrakt

Byly připraveny tritiem značené biologicky aktivní sloučeniny o-nitroanisol, sanquinarin a aristolochová kyselina I. o-nitroanisol nelze tritiovat přímo vzhledem k citlivosti nitroskupiny při katalytické reakci s plynným tritiem, při které dochází k redukci na aminoskupinu. Jako výchozí sloučenina byl použit o-anisidin, který byl tritiován plynným tritiem za katalýzy Pd/C. Tritiovaný anisidin byl převeden na nitrosloučeninu oxidací aminoskupiny peroxokomplexem fosfowolframové kyseliny. Bylo získáno 0,72 MBq čisté (HPLC) látky o měrné aktivitě 34,5 MBq/mmol. Příprava izotopicky modifikovaného sanquinarinu byla provedena přímou tritiací plynem v přítomnosti hydrogenačního katalyzátoru. [³H]Sanquinarin byl izolován dvojnásobnou chromatografií a bylo získáno 282 MBq produktu o měrné aktivitě 276 MBq/mmol. Molekula kyseliny aristolochové I obsahuje nitroskupinu vázanou na aromatické jádro a její tritiace vede ke vzniku aristolaktamu. Proto byla zkoumána nova metoda pro aromatické substráty citlivé k hydrogenačním podmínkám. Postup spočívá v jodaci aromatického jádra a následné reduktivní dehalogenaci tributylstannanem resp. jeho tritiováním analogem. Dehalogenace byla studována na modelu p-jodacetanilid/acetanilid za různých reakčních podmínek a s užitím trifenylofosfinových komplexů Pd, Cu, Rh, Ru, Pt a Ni jako katalyzátorů. [³H]tributylstannan byl připraven reakcí chlorotributylstannanu s plynným tritiem (Pd/C/THF). Vlastní [³H]aristolochová kyselina I byla připravena jodací chloraminovou methodou a následnou redukcí [³H]tributylstannanem. Produkt o aktivitě 26,16 MBq byl izolován pomocí HPLC.

Klíčová slova: o-nitroanisol; sanguinarin, aristolochová kyselina I; značení tritiem; reduktivní dehalogenace; chlorotributylstannan

Abstract

The tritium labelled biologically active compounds, o-nitroanisol, sanguinarin, and aristolochic acid I were prepared. o-Nitroanisol cannot be prepared by direct catalytic isotopic exchange with tritium gas, because the present nitrogroup is spontaneously reduced to aminogroup. The starting material used was o-anisidin, which was tritiated with tritium gas in the presence of Pd/C. The resulting tritiated anisidin was converted to o-nitroanisol by oxidation of aminogroup with peroxocomplex of phosphotungstic acid. The pure (HPLC) obtained product (0,72 MBq) had a specific activity of 34,5 MBq/mmol. The isotopic modification of sanquinarine can be realized by direct catalytic Pd/C-tritium gas reaction. [³H]Sanquinarine was isolated from tritiation mixture by two-fold chromatographic purification and 282 MBq of product with specific activity 276 MBq/mmol was obtained. The molecule of aristolochic acid I contains nitro-group sensitive to the classical catalytic tritiation reaction and aristolactam structure is formed. The new method for tritium modified aristolochic acid and other reduction sensitive aromatic substrates by the way of iodination of aromatic ring and subsequent reductive dehalogenation by [³H]tributyltin hydride was investigated. Reductive dehalogenation was studied in detail on the p-iodoacetanilide/acetanilide system with the variation of reaction conditions and using Pd, Cu, Rh, Ru, Pt, and Ni triphenylphosphine complexes as catalysts. [³H]Tributyltin hydride was prepared by tritiation of tributyltin chloride with tritium gas under catalysis of Pd/C. The aristolochic acid I was iodinated by chloramine method, dehalogenated by tributyltin tritide in the presence of [NiCl₂(Ph₃P)₂] catalyst, and 26,16 MBq of the tritiated product was isolated by HPLC.

Key words: o-nitroanisol; sanguinarin, aristolochic acid I; tritium labeling; reductive dehalogenation; tributyltin tritide