

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra organické a jaderné chemie**



**Příprava radioaktivně značeného galaxolidu  
a tonalidu**

**Diplomová práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza**

Praha 2008

Lubomír Šviantek

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 4.5.2008



.....  
podpis

## **Poděkování:**

Touto cestou bych rád poděkoval svému školiteli, doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., nejen za odborné vedení, ale i za nekonečnou trpělivost a přátelskou atmosféru, ve které tato práce vznikala. Dále děkuji Ing. Šárce Pšondrové a Mgr. Věře Habartové za poskytnutí mnoha rad a pomoc při řešení řady situací.

Nakonec ještě díky všem nejmenovaným, kteří se podíleli na tvorbě této diplomové práce, ať už na pracovišti ÚJV Řež značením vzorků, nebo na katedře organické a jaderné chemie pomocnými měřeními.

## **ABSTRAKT**

V práci byla studována metoda přípravy radioaktivně značených mošusových látek používaných jako součást parfemačních kompozic spotřební chemie a vykazujících průnik do ekosystému s následnou endokrinní aktivitou u vyšších organismů. Byla vypracována metoda přípravy  $^3\text{H}$  značeného tonalidu metodou reduktivní dehalogenace jeho bromderivátu [ $^3\text{H}$ ]tributylstannanem za katalýzy komplexy přechodných kovů. Pro galaxolid byl testován postup izotopové výměny, kdy po modelových pokusech s deuteriem, které prokázaly inkorporaci tří atomů deuteria do molekuly, byla provedena izotopová výměna s plynným tritiem a katalyzátorem Pd/C za vzniku produktu o měrné aktivitě 22,8 MBq/mol.

Práce byla provedena za finanční podpory grantu COST 859 a Výzkumného záměru MSM 0021620857.

# OBSAH

1 ÚVOD .....	6
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1 Izotopově značené sloučeniny .....	8
2.1.1 Značené sloučeniny .....	8
2.1.2 Použití izotopů a značených sloučenin v biologii .....	9
2.1.3 Tritiace .....	10
2.2 Fytoremediace .....	12
2.2.1 Mechanismy fytoremediace .....	14
2.2.2 Faktory ovlivňující úspěšnost metody .....	14
2.3 Mošusové látky .....	15
2.3.1 Polycyklické syntetické mošusy .....	16
2.3.2 Osud mošusových látek v ekosystému .....	18
2.3.3 Estrogenní účinky AHTN a HHCB .....	19
2.3.4 Hodnocení zátěže vodního ekosystému v ČR .....	20
2.3.5 Hodnoty mošusových látek v krvi .....	24
3 CÍL PRÁCE .....	26
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	27
4.1 Použité chemikálie a přístroje .....	27
4.2 Popis experimentů .....	28
4.2.1 Tonalid .....	28
4.2.2 Galaxolid .....	33
5 VÝSLEDKY A DISKUSE .....	36
5.1 Tonalid .....	36
5.2 Galaxolid .....	41
6 ZÁVĚR .....	43
7 SEZNAM ZKRATEK .....	44
8 LITERATURA .....	46

# 1 ÚVOD

Zvyšující se úroveň kvality a komfortu lidského života, která je podporována rychlým rozvojem vědy a techniky, s sebou přináší i řadu negativ. Mezi tyto negativní jevy patří především kontaminace ekosystému jak produkty, tak i odpadními látkami chemického, strojírenského, hutnického, energetického a farmaceutického průmyslu. Častá je i kontaminace půd a vod produkty spotřební chemie. Kontaminace ekosystému již dosáhla takové úrovně, která výrazně zvyšuje zdravotní rizika, kterým je člověk v současné době vystaven. Vlivem neznalosti biologických vlastností nově vyráběných látek dochází k občasnému poškozování životního prostředí. Příčinou nemusí být pouze vyráběná látka, ale i meziprodukty a vedlejší produkty. Situace je o to vážnější, protože pro řadu synteticky vyrobených látek si příroda ještě nestačila vytvořit účinné mechanismy na jejich degradaci.

Syntetické analogy pižma patří mezi látky s rozsáhlým použitím v oblasti aromatizace různých typů detergentů a kosmetických přípravků, které, jak ukázaly studie kontaminace vodního ekosystému realizované v 90. letech, jsou velmi perzistentní a mají schopnost biokoncentrace v různých typech vodních organismů. K průniku těchto látek do životního prostředí dochází především odpadními vodami, neboť při běžných čistírenských úpravách nedochází k dostatečně účinné biodegradaci či sorpci. Toxicita syntetických analogů pižma, stejně jako jejich osud v životním prostředí, je předmětem řady diskusí a je indikována potřeba dalších studií, které by jejich vliv na akvatické ekosystémy (popř. i zdraví člověka) blíže specifikovaly.

Organické sloučeniny značené radioaktivními izotopy jsou často používané k analýzám procesů probíhajících v živých organismech. Jejich široké uplatnění zahrnuje nejen oblast rozličných biodistribučních a biotransformačních studií v *in vitro* systémech, ale v současné době jsou značené sloučeniny úspěšně aplikovány při *in vivo* zkoumání dějů a mechanismů 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.

V současné době, kdy si stále více uvědomujeme ekologické dopady industrializace a konzumního života naší společnosti, je tématu značného rozšíření synteticky připravených látek a kontaminaci ekosystému věnována celosvětově velká pozornost.

Hlavním cílem je snaha vyvinout a používat takové dekontaminační metody, které by byly šetrné k životnímu prostředí a které by nebyly ekonomicky náročné. Existuje řada fyzikálně-chemických metod. Ty jsou však destruktivní ve vztahu k vlastnostem půd a následná rekultivace je jak technologicky, tak i ekonomicky velmi náročná. Jedním ze slibných alternativních způsobů je biologická dekontaminace půd. Při použití biologického procesu je půda zbavena polutantů za současného zachování základních vlastností půdního systému a je možné i nadále využívat dekontaminované plochy například pro zemědělské účely. Další oblastí vhodnou pro uplatnění biologické dekontaminace jsou odpadní vody vytékající z čistíren odpadních vod, které často obsahují zbytky rozličných látek. Pro tyto účely se zdá být vhodné užití vyšších rostlin. Úspěšné využití je však podmíněno podrobnými znalostmi o pochodech, které při těchto procesech v rostlinách a na rozhraní mezi kořeny rostlin a vlastní půdou probíhají.

## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1 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 je zaměřena na přípravu dvou značených ekopolutantů, galaxolidu a tonalidu, využitelných pro studium fytoremediačních experimentů, jako alternativních metod pro dekontaminaci povrchových vod a půd.

#### **2.1.1 Značené sloučeniny**

Termínem izotopicky modifikovaná sloučenina se rozumí taková látka, která se od ostatních molekul ve vzorku jen málo liší svým fyzikálním, chemickým či biologickým chováním, ale lze ji vhodnou analytickou metodou relativně snadno detektovat.

Sloučeniny mohou být značeny fluorescenčně, spinově nebo izotopicky. Velký význam má užití izotopicky značených sloučenin. 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.

Organické sloučeniny je vhodné označovat izotopy prvků, ze kterých se samy skládají. Jako interní značení se nazývá modifikace, při které se nahradí některý atom z původní struktury příslušným radionuklidem ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$  apod.). V některých

případech je takovýto postup obtížný nebo dokonce nemožný. Pak je vhodné použití tzv. externího značení, jako je třeba methylace dusíku [<sup>14</sup>C] nebo [<sup>3</sup>H]methyljodidem nebo elektrofilní substituce jodu na aromatickém jádře. Nevýhodou externího značení je modifikace molekuly, která může vést ke změně vlastností dané látky, a tedy i ke změně nebo až ztrátě testované biologické aktivity. Ke značení se užívají jak stabilní, tak i radioaktivní nuklidy.

Značení radioaktivními nuklidami s sebou přináší řadu komplikací, ať už ve fázi syntézy, nebo poté při manipulaci s touto značenou sloučeninou, a přístroj pro detekci radioaktivity je často dosti nákladný. Uvedené nevýhody jsou však převáženy výbornou citlivostí detekce radioaktivních markerů. Zvláště v biochemických a farmakologických experimentech dovoluje ve spojení s moderními molekulárně-biologickými metodami zkoumat biosystémy až na receptorové úrovni.<sup>1,2</sup>

### **2.1.2 Použití izotopů a značených sloučenin v biologii**

Izotopy a značené sloučeniny se často uplatní při studiu biologických, biochemických nebo fyziologických experimentálních situací a problémů. Široké spektrum aplikací se dá shrnout do čtyř skupin využití.<sup>3</sup>

1. Sledování pohybu - sledování jednotlivých živočichů, cest a dynamiky šíření bakterií v organismu, pohybu buněčných útvarů, plynů, kapalin a minerálních živin v organismu, přechodu asimilace z listů do jiných částí rostlin, přenosu látek mezi organismy a přechodu látek přes membrány. V některých aplikacích, např. sledování živočichů, jsou možné i jiné metody, jako třeba metoda barvením nebo přímým pozorováním.

2. Sledování chemických změn - tímto se rozumí štěpení a vznik chemických vazeb při zániku jedných a vzniku nových molekul, přesuny skupin atomů. Izotopové značení umožňuje sledování souvislostí mezi molekulami při vzniku nových molekul z původních a napomáhá zkoumat cesty, směr a následnost těchto změn. Patří sem značná část biochemických izotopových aplikací, jako je biosyntéza složitých molekul,

metabolismus složek potravin a jiných látek, jako jsou léčiva, pesticidy a jiné ekopolutanty.

3. Studium kinetiky dějů v živých soustavách - jedná se hlavně o studium metabolického obratu. V živém organismu nepřetržitě dochází k přeměně látek a energie. Neustále jsou tvořeny nukleové kyseliny, enzymy, sacharidy, tuky atd., zatímco jiné molekuly jsou odbourávány a nahrazovány novými. Rychlosť tohoto obratu lze sledovat pomocí izotopů.

4. Studium dějů souvisejících s přenosem informací - do poslední skupiny patří izotopové studium mechanismu přenosu genetických informací na molekulární úrovni a některé další problémy, jako jsou hormonální mechanismy regulace a imunochemické reakce.

### **2.1.3 Tritiace**

Tritium je relativně levný, málo toxickej a univerzální radioizotop s poločasem rozpadu 12,4 roku, což je dostačující pro většinu experimentů.  ${}^3\text{H}$  je izotop emitující nízko energetické  $\beta$ -záření (0,0118 MeV). Tritium je komerčně dodáváno buď jako plyn, nebo se oxiduje na  ${}^3\text{H}_2\text{O}$ .

#### **A) Metoda izotopové výměny**

Příprava tritiem značených sloučenin reakcí izotopové výměny patří nepochybně mezi základní techniky pro zavedení tritiového atomu do struktury molekuly. Tato metoda umožňuje tritiaci velmi komplexních sloučenin, které by jinak značeny být nemohly, a to dvojím postupem.

##### **a) Katalytická výměna v roztoku**

Značení organických sloučenin katalyzovanou výměnou v roztoku za použití tritiovaného rozpouštědla nebo plynného tritia jako donoru aktivity je obecným postupem, který poskytuje vysoké radiochemické výtěžky a vysoké molární aktivity.

Produktem jsou většinou selektivně nebo neselektivně, méně často specificky značené sloučeniny.<sup>4</sup>

b) Výměna s plynným tritem

Výměna s plynným tritem je nazývána také jako tzv. Wilzbachova metoda. Metoda spočívá v ponechání sloučeniny v kontaktu s plynným tritem po dobu několika dní až týdnů. Emitované záření během této doby produkuje velmi reaktivní ionizované či excitované částice, které indukují výměnné reakce mezi vodíkovými atomy sloučeniny a plynem.<sup>5</sup>

Jednoduchost metody vedla k mnoha snahám vylepšit efektivitu inkorporace tritia a snížit množství vedlejších produktů. Několikanásobně vyšší účinnosti reakce je možno dosáhnout použitím různých hydrogenačních katalyzátorů obsahujících vzácné kovy, jako je platina, paladium a nikl. Užitím tohoto postupu se dá získat 2000 – 3000-krát vyšší měrná aktivita než u metody bez použití katalyzátoru.<sup>6</sup> Novější metody pak využívají např. organokovových komplexů iridia, jako třeba bidentátních fosfinů  $[(\text{cod})\text{Ir}(\text{dppe})]\text{BF}_4$  nebo  $[(\text{cod})\text{Ir}(\text{py})(\text{PCy}_3)]\text{BF}_4$ , kdy je v některých případech možná predikce polohy značení.<sup>7</sup>

V praxi se obvykle využívá Pd/C, který způsobuje nejen izotopovou výměnu, ale atakuje také 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 redukovaných nitrolátek je v některých případech možná zpětná oxidace na nitrosloučeninu, pokud je zbytek molekuly k oxidačnímu činidlu dostatečně inertní.<sup>8,9,10</sup>

## B) Reduktivní dehalogenace

Reduktivní dehalogenace je další metodou vhodnou pro vnášení atomů tritia do organických molekul. Atomy halogenů v molekule substrátu mohou být snadno vyměněny za vodík, deuterium resp. tritium.

Pro hydrodehalogenaci existuje celá řada reakčních činidel. Oblíbeným činidlem pro reduktivní dehalogenaci je tributylstannan, který byl použit například na

polyhaloflourosloučeninách.<sup>11</sup> Další jednoduchý systém pro eliminaci halogenů je směs  $\text{KHSO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_3$ , použitá na halofenolech v suchém metanolu.<sup>12</sup> Jiným systémem zkoušeným na halofenolech a jeho derivátech je směs silné kyseliny a slabého nukleofilu. Konkrétně se jednalo o  $\text{AlCl}_3$  a  $\text{EtSH}$  resp.  $\text{Et}_2\text{S}$ .<sup>13</sup> Na stejných substrátech byla úspěšně použita také reakční směs zinku ve vodném roztoku amoniaku.<sup>14</sup> Reduktivní dehalogenace tetrahydridohlinitanem lithným ( $\text{LiAlH}_4$ ) probíhá přes stadium organohlinitých sloučenin.<sup>15</sup> Hydrodehalogenaci lze samozřejmě provést i klasickým způsobem reakcí arylhalogenidu s plynným vodíkem za katalýzy  $\text{Pd/C}$  v přítomnosti báze. Výtěžek reakce lze ovlivnit modifikací báze nebo přídavkem kvartérní amoniové soli. Uvedenou reakci lze provést dokonce i ve dvoufázovém uspořádání voda/isooctan, kdy lze použít ve vodě rozpustné anorganické báze.<sup>16</sup>

V mém případě se jednalo reduktivní dehalogenaci na uhlíku v  $\alpha$  poloze vzhledem ke ketonu. Zde je například možné použít organotellurových činidel, které jsou schopné odstranit i jiné substituenty v poloze  $\alpha$  od ketonu.<sup>17</sup> Poměrně dobrých výsledků se dosáhlo při hydrodehalogenaci různých  $\alpha$ -haloketonů s různými thioly (methyl, ethyl a benzylthiol) ve více jak dvojnásobném nadbytku za vzniku dehalogenovaných ketonů a disulfidů, přičemž benzylthiol se ukázal jako slabší redukční činidlo než alkylthioly.<sup>22</sup> Další vhodnou možností se ukázala reakční směs s jodidem sodným a chlortrimethylsilanem v acetonitrilu.<sup>23</sup> Řadu cínyhydridů, mezi nimi již zmínovaný tributylstannan, lze využít i pro uvedené halogenné substituenty. Pořadí reaktivity nejpoužívanějších hydridů je následující:  $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{SnH}_2 \approx n\text{-C}_4\text{H}_9\text{SnH}_3 > (\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{SnH} \approx (n\text{-C}_4\text{H}_9)_2\text{SnH}_2 > (n\text{-C}_4\text{H}_9)_3\text{SnH}$ .<sup>24</sup>

## 2.2 FYTOREMEDIACE

Fytoremediace je metoda definovaná jako technologie využívající rostlin k fixaci, akumulaci a rozkladu nebezpečných kontaminantů, tj. k jejich odstranění z životního prostředí. Metoda zahrnuje využití vegetace pro *in situ* remediaci půdy, sedimentů a vody. Vybrané rostliny se využívají k extrakci iontů toxických kovů, včetně

radioaktivních izotopů, i k odstranění některých organických látek z uvedených abiotických složek. Pro úspěšnou remediaci je nutná biologická přístupnost kontaminantů z vody a půdy do rostliny, která je dána zejména rozpustností látky, typem půdy a stářím kontaminace.

Důvodů pro rozvíjení této technologie je několik. Především lze dosáhnout snížení nákladů při dekontaminačních procesech. Metoda předpokládá využití známých agrotechnických postupů běžně používaných při zemědělském hospodaření. Z toho vyplývá, že finanční vstupy jsou obecně nízké a náklady na průběh remediaci minimální.

Další výhodou fytoremediace je šetrný přístup k prostředí, neboť metoda se vyhýbá odstranění půdy a použití těžké techniky. Z tohoto pohledu je metoda příznivě přijímána veřejným míněním.<sup>18</sup>

Fytoremediační technologie se postupně stává jedním z procesů, který výrazně přispívá k odstranění xenobiotik z životního prostředí. Navíc podobné procesy probíhají v přírodě zcela přirozeně a vzhledem k obrovskému množství rostlinné biomasy není tento přirozený příspěvek k dekontaminaci rozhodně zanedbatelný.

Hodnotíme-li fytoremediační proces, nelze opomenout i určité nevýhody, které tato technologie v sobě skrývá. Především se jedná o dlouhodobý dekontaminační proces, který nelze uskutečnit v průběhu jednoho vegetačního období. Dekontaminace, která je obvykle úměrná množství vyprodukované biomasy, je potom závislá na povaze půdy, obsahu dostupných živin, klimatických podmínkách, ale zároveň i na charakteru polutantu a jeho toxicitě vůči použitému rostlinnému druhu. Kontaminanty se mohou hromadit v listech a mohou být znova uvolňovány (např. při opadávání listů) do prostředí. V některých případech se zvyšuje rozpustnost polutantů a může dojít k jejich rozšíření do okolního prostoru.<sup>19</sup>

## **2.2.1 Mechanismy fytoremediace**

Rostliny při dekontaminaci uplatňují několik mechanismů:

- Přímá absorpce kořeny. Následuje přesun xenobiotik do rostlinné tkáně a akumulace ve formě nefytotoxicických metabolitů. Nerozpustné látky se většinou váží na pevně na povrch kořenů. Látky s vyšší rozpustností jsou transportovány do cílových rostlinných tkání, kde mohou být metabolizovány na nefytotoxicické produkty a ukládány např. do vakuol nebo buněčných stěn.
- Uvolňování enzymů do prostředí. Enzymy podporují mikrobiální aktivitu a biochemickou transformaci v půdě. Mezi hlavní enzymové systémy nalezené v půdě z kontaminovaných míst, které se pravděpodobně podílejí na přeměnu organických látek v životním prostředí, patří dehalogenasy, reduktasy, organických sloučenin, lakasa (fenoloxidasa) a nitrilasy.
- Zvýšená mineralizace látek v rhizosféře, která je typická pro činnost hub a mikrobiálních organismů. Rostliny napomáhají mikrobiální mineralizaci v rhizosféře tím, že uvolňují do půdy látky, které mohou sloužit mikroorganismům jako zdroj uhlíku a energie pro metabolizmus organických polutantů v životním prostředí.<sup>20</sup>

## **2.2.2 Faktory ovlivňující úspěšnost metody**

Faktory ovlivňující úspěšnost použité fytoremediační technologie:

- Přítomnost rostlin, které jsou schopné efektivně degradovat polutant.
- Schopnost rostlin těchto rostlin metabolizovat polutant akceptovatelnou rychlosí na výslednou koncentraci polutantu povolenou zákonem.
- Vznik produktů (meziproduktů), které by v dosažené koncentraci byly toxicke.
- Přítomnost dalších chemických látek či směsí na kontaminované lokalitě, které potlačovaly růst a metabolickou aktivitu degradační flory.
- Dostupnost polutantů rostlinám.

- Zajištění nezbytných podmínek stimulující růst a metabolickou aktivitu použitých rostlin např. anorganické živiny, kyslík nebo vhodné akceptory elektronů, stopové prvky, vlhkost prostředí, teplota, pH, zdroj uhlíku a energie.

Cena technologie musí být nižší než cena jiné technologie schopné destruovat cílový polutant.<sup>21</sup>

## 2.3 MOŠUSOVÉ LÁTKY

Mošusové látky hrají ústřední roli v oblasti kosmetického průmyslu. Tvoří hlavní složku parfémových kompozic. Používání mošusových látek sahá až do antiky a je součástí kulturní historie.

Počátek chemie přírodních pižmových odorantů je spojen s objevením makrocyclických mošusů, ketonů a laktonů, v průběhu první poloviny 20. století, kdy byly izolovány z živočišných a rostlinných zdrojů a následovalo objasnění jejich struktur.

Muskon, civeton a exalton jsou hlavními odoranty získanými z živočišné říše, zatímco lakton exaltolid a (Z)- $\Delta^7$ -ambretolid byly izolovány z rostlin.<sup>25</sup>

Syntetická pižma jsou antropogenní chemikálie, které jsou vyráběny ve velikém množství a jsou široce užívány ve spotřebním zboží jako jsou detergenty, čistící prostředky, osvěžovače vzduchu, parfémy, vody po holení, kosmetika a produkty osobní hygieny. Dnes jsou používány dvě základní skupiny syntetických mošusů: nitro mošusy a polycyklické mošusy.<sup>26</sup>

Skupina nitromošusů byla objevena náhodou v průběhu hledání výbušnin před několika stovkami let, kdy struktura výše uvedených přírodních mošusových látek ještě nebyla známa. Mezi přední zástupce, reprezentující tuto skupinu látek patří mošusový xylen (MX), mošusový keton (MK), mošusový tibeten, mošusový ambret a mosken. Je až pozoruhodná shoda, že tyto penta- a hexa- substituované polynitrobenzenové deriváty vykazují pižmovou vůni. Pro tyto aromatické vlastnosti a jejich velmi příznivou cenu,

hlavně v porovnání s přirozenými a později také syntetickými makrocyklickými mošusovými látkami, se v chemickém průmyslu začaly nitromošusové látky používat ve velkém množství. V průběhu 80. letech začalo jejich užití klesat. Důvody byly částečně toxikologické, částečně praktické<sup>25</sup> (hlavním problémem byla fotochemická reaktivita vedoucí k odbarvení a senzibilizaci kůže)<sup>27</sup>, ale hlavním důvodem bylo uvedení třetí skupiny vysoce účinných mošusových látek na trh.

Tato třetí skupina syntetických mošusových látek se skládá z polycyklických, aromatických sloučenin, především indanových a tetralinových derivátů. K hlavním představitelům této třídy patří fantolid (AHD), celestolid (ADBI), traseolid (ATII), fixolide neboli tonalid (AHTN) a galaxolid (HHCB). V dnešní době jsou nejvíce využívané poslední dvě jmenované látky. Polycyklické mošusy jsou dnes ve stejné cenové kategorii jako nitro mošusy, nebo jsou dokonce levnější, tj. 15-20\$ za kilogram a ročně jich je celosvětově vyrobeno několik tisíc tun. Pro nízkou biodegradabilitu a tendenci akumulovat se jsou tyto látky středem zájmu některých studií.<sup>25</sup>

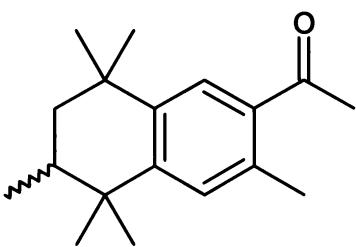
Od roku 1995 do roku 2000 byla celosvětová produkce dvou nejhojněji užívaných nitro mošusů (MK a MX) snížena z 300 t/rok na 200 t/rok. V roce 2000 bylo celosvětově vyrobeno přibližně 4000 tun polycyklických analogů pižma. Evropská produkce těchto dvou látek byla v roce 2000 okolo 1800 t, přičemž produkce ostatních polycyklických mošusů nepřesáhla 20 tun.<sup>26</sup>

### **2.3.1 Polycyklické syntetické mošusy**

#### *Tonalid*

Synonyma (CAS: 21145-77-7):

7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaftalen; AHTN  
1-(5,6,7,8-tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naftalenyl)ethanon  
1-(5,6,7,8-tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-nafty)ethan-1-on  
fixolid, tetralid, extralid, tentarom



Tonalid je bílá krystalická látka s teplotou tání 53°C a teplotou varu 109°C. Voní sladce po květinách a dřevu. Je to polycyklická velmi persistentní látka ( $\log K_{ow} = 5,7$ ). Akumuluje se v organismech. Užívá se do šamponů, mýdel, čistících prostředků, antiperspirantů, voňavek. Druh vůně je sladce čistý, mírný. Mošusové látky jsou nejproslulejší ze všech esenciálních kategorií, protože jsou obecně zahrnutы ve vůni exotického původu, a to v pižmu některé vysoké zvěře (např. jelen).<sup>29,30,31</sup>

V molekule tonalidu je jeden stereogenní uhlík. Pouze (S)-izomer je zodpovědný za jeho vonné účinky.

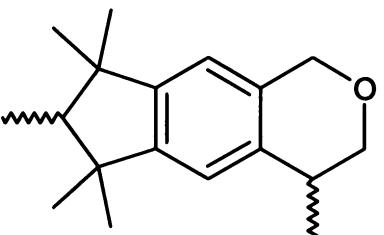
### *Galaxolid*

Synonyma (CAS: 1222-05-5):

1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyklopenta[g]-2-benzopyran; HHCB

1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylindeno(5,6-c)pyran

abalid, musk 50, pearlid



Galaxolid je významný mošusový odorant a je v parfumerii nejvíce užívanou látkou s roční produkcí okolo 3800 tun.<sup>27</sup>

Sloučenina je mírně viskózní, bezbarvá, stabilní kapalina. Je to polycyklická, velmi persistentní látka ( $\log K_{ow} = 5,9$ ). Akumuluje se v organismech. Užívá se do šamponů, mýdel, čistících prostředků, antiperspirantů, voňavek, vonných olejů apod. Dodává se ve formě 50 % roztoku v diethylftalátu.<sup>30,31,32</sup>

V molekule galaxolidu jsou dvě stereogenní centra, a to na C-2 a C-8. Bylo určeno, že výrazné mošusové aroma je způsobeno (8S,2S)- a (8S,2R)-diastereoisomery a zbylé dva izomery, tedy (8R,2S)- a (8R,2R)-izomery, jsou téměř bez vůně.<sup>28</sup>

### 2.3.2 Osud mošusových látek v ekosystému

Jedním z majoritních celosvětových problémů je omezené množství dosud neznečištěné vody, která je vhodná pro výrobu potravin a pro zásoby pitné vody. Opětovné užívání přečištěné odpadní vody může vést ke zvýšení vodních zásob v oblastech, ve kterých poptávka po vodě, zpravidla urbanizovanou populací, přesahuje možnosti poskytované přírodními vodními zdroji. To se stává limitujícím faktorem pro ekonomické požadavky.

V Evropské unii je dnes používáno přibližně 3000 rozdílných lékových příslad, obsahující hlavně léky tišící bolest, antibiotika, antidiabetika, beta-blokátory, kontraceptiva, regulátory lipidů, antidepresiva, trankvilizéry a cytostatika. Tyto látky jsou mnohdy biotransformovány a kombinace těchto nezměněných léčiv a metabolitů je organismy vylučována. Tato farmaka se zpravidla dostávají, ať z privátních obydlí nebo nemocnic, do čistěn odpadních vod. Polycyklické mošusové látky jsou ve velkých množstvích využívány v kosmetickém průmyslu. Na rozdíl od léčiv komponenty produktů osobní hygieny, jako právě polycyklické mošusové látky, ve větší míře neprocházejí skrz lidský organismus. Do odpadních vod se však dostávají prostřednictvím jejich pravidelného užívání v průběhu sprchování nebo koupání. Protože léčiva ani mošusové látky nejsou v průběhu procesu čištění odpadních vod zcela odstraněny, tak čistírnami odpadních vod tyto látky pronikají ve značných množstvích do povrchových vod.<sup>32</sup>

První zpráva o výskytu syntetických mošusových látek v povrchových vodách a zde žijících organismech byla zveřejněna v roce 1981. V tomto případě se jednalo

o mošusový xylen a mošusový keton v lokalitě tokijského zálivu a řeky Tama. První zmínka o výskytu polycyklických mošusových látkách v různých environmentálních kompartmentech byla publikována roku 1994. V současnosti byly polycyklické mošusy detekovány téměř ve všech oblastech životního prostředí včetně povrchových vod, sedimentu, vzduchu, odpadních vodách a kalech, garnátů, měkkýšů a ryb, dokonce i v mateřském mléce a v lidské tukové tkáni. Tyto výsledky ukazují, že polycyklické mošusy mají široký vliv na životní prostředí a jsou bioakumulovány ve vodním systému a i v lidském těle.<sup>33</sup>

### **2.3.3 Estrogenní účinky AHTN a HHCB**

Estrogeny hrají rozhodující roli při růstu, vývoji a řízení celé řady tkání. Jejich fyziologické účinky jsou zprostředkovány prostřednictvím estrogenních receptorů, jež přísluší superrodině jaderných hormonálních receptorů. Tyto receptory jsou ligandem aktivované transkripční faktory, které mohou indukovat transkripci genů obsahujících specifické elementy pro hormonální odezvu. Estrogenní receptory se skládají ze šesti funkčních domén, včetně DNA vázající domény a ligand vázající domény. Rozeznáváme tři subtypy těchto receptorů - ER $\alpha$ , ER $\beta$  a u některých živočichů i ER $\gamma$ .

Na estrogenní receptor se s různým stupněm afinity a účinností může vázat mnoho strukturálně odlišných sloučenin. Mnoho z těchto látek, jako například hlavní přirozený ligand estrogenního receptoru 17 $\beta$ -estradiol, vystupuje výhradně jako agonisté, zatímco ostatní látky fungují čistě jako antagonisté. Selektivní modulátory estrogenních receptorů pak mají schopnost vystupovat jako agonisté, tak i jako antagonisté. To závisí na faktorech jako je typ buňky nebo na subtypu receptoru, na který se ligand naváže. Selektivní modulátory estrogenních receptorů, jako je relofixen a tamofixen, jsou klinicky používané v léčbě osteoporózy a při karcinomu prsu.<sup>39</sup>

V současnosti bylo prokázáno, že velké množství antropogenních substancí vyskytujících se v životním prostředí vykazují endokrinní a určitou estrogenní aktivitu. Estrogenně aktivní látky mohou negativně ovlivňovat reprodukční systém organismu.

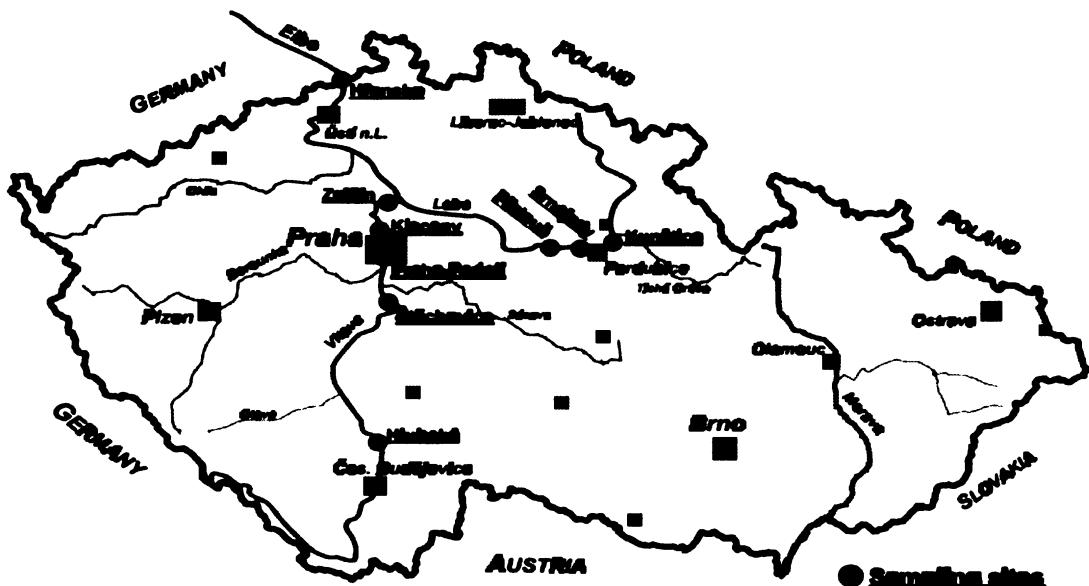
Navíc se diskutuje ohledně souvislosti mezi xenoestrogeny a rakovinou indukovanou hormony.<sup>40</sup>

Ohledně estrogenní aktivity polycyklických mošusových látek není mnoho známo. Bylo však provedeno několik studií. Jednalo se většinou o *in vitro* experimenty, které byly provedeny na několika různých buněčných kulturách. Pro AHTN a HHCB byla povětšinou zjištěna mírná estrogenní aktivita. S porovnáním s přirozeným ligandem estradiolem byla jejich afinita k ER $\alpha$  přibližně o šest řádu nižší. K ER $\beta$  pak nebyla nalezena žádná aktivita.<sup>41</sup>

### 2.3.4 Hodnocení zátěže vodního ekosystému v ČR

V rámci studie vzorků ryb a dalších složek vodního ekosystému v ČR v letech 1997 – 2000 byla vyvinuta a validována metoda pro stanovení pěti zástupců polycyklických sloučenin (celestolid, fantolid, traseolit, galaxolid a tonalid) a dvou zástupců nitrovaných sloučenin (mošusový xylen a mošusový keton).<sup>36</sup>

V těchto letech byla realizována vyšetření více jak 650 vzorků ryb a sedimentů získaných v 11 lokalitách na Labi, Vltavě a Tiché Orlici (Obr. 1).



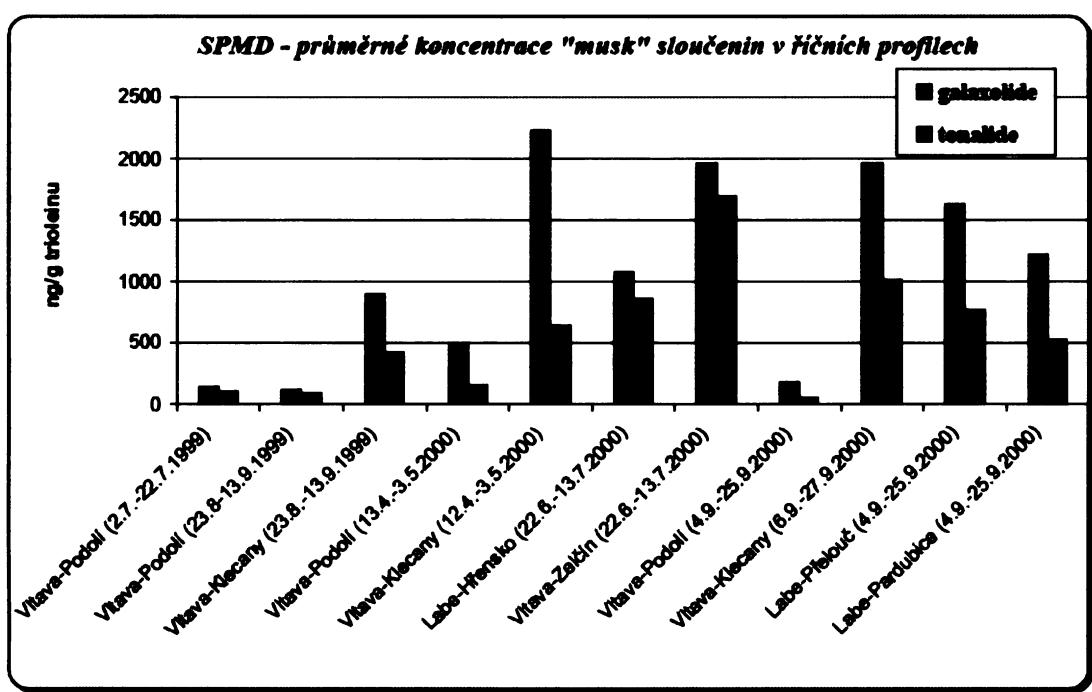
Obr. 1: Místa odběru vzorků (SPDM, ryby, sedimenty) pro stanovení přítomnosti kontaminantů ve vodách

Vyšetření ryb jako bioindikátorů zátěže vodního ekosystému přináší řadu cenných informací, ale také řadu limitujících faktorů, které za určitých okolností ztěžují interpretaci obdržených výsledků. Hlavním z takovýchto faktorů je obtížně kontrolovatelná přirozená migrace těchto organismů. Významnou roli pak hraje také věk vyšetřovaných ryb.

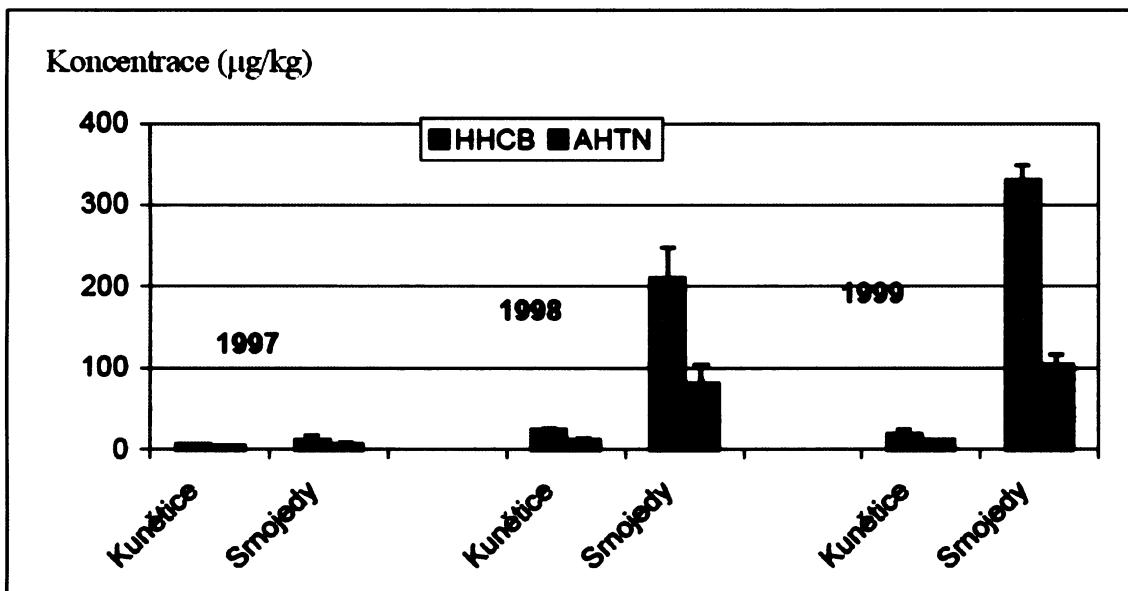
Z uvedených důvodů byla použita technika využívající semipermeabilní vzorkovací membrány naplněné trioleinem (SPDM), které simulují proces biokoncentrace kontaminantů bioty z vodního prostředí. Použití techniky SPDM spočívá v ponoření příslušné membrány do říčního toku většinou po dobu dvou až tří týdnů při průběžném sledování teploty a po skončení expozice v analýze trioleinu na obsah sledovaných kontaminantů. Předběžné výsledky potvrdily mimořádnou vhodnost SPMD pro monitorování znečistění povrchových vod syntetickými analogy pižma, ale i dalšími kontaminanty, v relativně krátkých časových úsecích.<sup>37</sup>

Z hlediska hodnocení zátěže vodního ekosystému ČR mošusovými sloučeninami lze za nejvíce kontaminované označit lokality, kde řeky opouštějí velké městské aglomerace, jedná se zejména o Klecany na řece Vltavě a Srnojedy na řece Labi. V obou těchto lokalitách byly zjištěny výrazně vyšší nálezy především polycyklických sloučenin (Graf 1; Graf 2).

Tento fakt potvrzuje, že primárním zdrojem těchto sloučenin je komunální odpad. V porovnání se zahraničními studiemi jsou koncentrace mošusových sloučenin (zejména polycyklických - galaxolidu a tonalidu) relativně velmi vysoké, což může souviset s rozdíly v technologiích využívaných při čištění odpadních vod.<sup>36</sup>

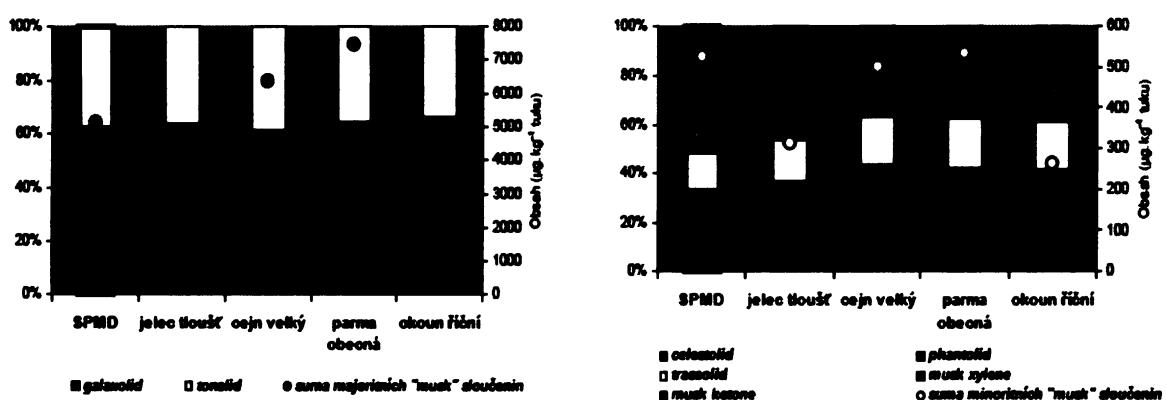


**Graf 1:** Průměrné koncentrace AHTN a HHCB naměřené v trioleinu standardních SPDM exponovaných ve vybraných profilech Vltavy a Labe.<sup>37</sup>



**Graf 2:** Časový vývoj koncentrací AHTN a HHCB; využití ryb (jelec tloušť) jako bioindikátorů přítomnosti odpadních vod.<sup>37</sup>

Obsah reprezentantů mošusových sloučenin byl zjištován ve svalovině, játrech a gonádách ryb odlovených v různých lokalitách České republiky, přičemž mošusové sloučeniny byly dosud nalezeny ve všech sledovaných vzorcích. Nálezy v rybách prakticky bez výjimky klesají v pořadí: galaxolid > tonalid >> muskxylen > muskketon = fantolid > celestolid = traseolid. Nejvyšší koncentrace v loňském roce byly zjištěny tradičně ve svalovině parmy obecné v lokalitě Labe-Valy (až 3300 µg/kg rybích lipidů pro galaxolid), ale i v ostatních lokalitách byly nálezy ve svalovině parmy obecné poměrně vysoké (Graf 3).<sup>38</sup>



Graf 3: Nálezy a relativní zastoupení mošusových sloučenin v rybách a SPMD v lokalitě Klecany na řece Vltavě v roce 2001.<sup>36</sup>

Vysoké nálezy souvisí s poměrně velkou tučností svaloviny této ryby v porovnání s ostatními sledovanými druhy. Naopak nejnižší obsahy byly nalezeny ve vzorcích okouna říčního, který je zástupcem dravých ryb s relativně nízkým obsahem lipidů. Obecně bylo zaznamenáno, že se vzrůstajícím obsahem tuků v sledovaných druzích ryb vzrůstá i rozsah kumulace těchto sledovaných perzistentních organických kontaminantů.

### **2.3.5 Hodnoty mošusových láték v krvi**

Kontaminace lidského organismu, hlavně mateřského mléka a tukových tkání, polycyklickými mošusy je nepochybně způsobena bioakumulací ve vodních organismech a následně prostřednictvím potravního řetězce. Tento jev je ale také důsledkem dermální absorpce, která je způsobena běžným užíváním kosmetických přípravků. Koncentrace tonalidu v tukové tkáni dosahuje hodnot od 8 do 33 µg/kg tuku. Koncentrace galaxolidu v mateřském mléce pak bývá vyšší než 360 µg/kg a koncentrace tonalidu vyšší než 72 µg/kg tuků v mateřském mléce. V roce 1999 byl denní příjem AHTN odhadnut na 1,6 µg/kg a HHCB na 0,6 µg/kg. Dnes budou tyto hodnoty s velkou pravděpodobností vyšší.<sup>34</sup>

V roce 2004 byla ve Vídni provedena studie, ve které se monitoroval výskyt tonalidu a galaxolidu v krvi, respektive v plazmě. Ze sta vybraných studentů bylo 55 žen a 45 mužů. Věkové rozmezí bylo od 19 do 43 let, přičemž průměrný věk byl 23 let. Galaxolid byl prokázán ve vysokém procentu (91%) analyzovaných vzorků. Tonalid byl nalezen v 17%.

Z výsledků je jasné patrné, že hladina koncentrace HHCB v krvi žen je výrazně vyšší. To může být vysvětlováno faktem, že ženy používají mnohem více krémů, pleťových vod a parfému než muži a poukazuje to na skutečnost, že dochází k dermální absorpci polycyklických mošusových láttek.<sup>35</sup> Výsledky studie jsou v tabulce 1.

**Tab. 1:** Průměrná plazmatická koncentrace galaxolidu v souvislosti s různými faktory: pohlaví, věk, užívání pleťové vody, parfémů a konzumace ryb; n – počet vzorků; Md – medián; Q1 a Q3 – nejnižší a nejvyšší naměřená hodnota

náhodná proměnná	n	plazmatická koncentrace (ng/l)
		Md [Q1-Q3]
<i>pohlaví</i>		
Muži	45	260 [98-540]
Ženy	55	580 [590-885]
<i>Věk</i>		
19-25	67	450 [250-805]
26-43	33	340 [130-670]
<i>Užívání tělového mléka</i>		
Nikdy	26	235 [94-615]
1/měsíc	12	200 [95-650]
1/týden	13	420 [330-470]
2-4/týden	32	390 [260-885]
Denně	14	715 [457-887]
Vícekrát denně	3	1100 [880-1150]
<i>Užívání parfémů</i>		
Nikdy	10	114 [93-397]
1/měsíc	10	245 [175-898]
1/týden	8	270 [173-438]
2-4/týden	18	445 [295-620]
Denně	50	440 [263-855]
Vícekrát denně	4	1500 [858-2575]
<i>Konzumace ryb</i>		
Nikdy	9	330 [190-390]
1/měsíc	41	450 [159-765]
1/týden	39	390 [230-770]
>1/týden	11	630 [190-930]

## **3 CÍL PRÁCE**

Cílem projektu byl návrh metodiky přípravy tritiem modifikovaných molekul galaxolidu a tonalidu.

K řešení zadaného úkolu je nutné:

- provést literární rešerši na případné známé postupy přípravy  $^3\text{H}$  značeného galoxolidu a tonalidu
- provést kritické zhodnocení možnosti zavedení tritia do vytýčených substrátů na základě studia možností  $^3\text{H}$  organických sloučenin
- provést jodaci obou substrátů s předpokladem následné transformace na  $^3\text{H}$  derivát metodou reduktivní dehalogenace [ $^3\text{H}$ ]tributylstannanem
- studium reduktivní dehalogenace v aromatické a alifatické části studovaných molekul
- studium katalytické izotopové výměny s plynným tritiem
- vyhodnocení experimentů a orientační příprava cílových molekul

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE**

Zkoumané látky tonalid a galaxolid byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Od společnosti Sigma-Aldrich byly ještě pořízeny peroxodisíran draselný, uhličitan draselný, bromid měďnatý, suchý tetrahydrofuran, oxid manganičitý, deuterovaná voda a katalyzátor (1,5 – cyklooktadien)(pyridin)(tricyklohexyfosfin) iridium(I). Práškový jod, acetanhydrid, kyselina sírová, síričitan sodný, tetrachlormethan, chloroform, síran hořečnatý, trihydrát octanu sodného, peroxid vodíku (30 %), diethyleter a hexan byly zakoupeny od firmy Lach-Ner s.r.o. Kyselina octová a tributylstannan byly pořízeny od společnosti Fluka. Acetonitril byl pořízen od společnosti Lab-Scan. Bis(trifenylfosfino)dichloronikelnatý a bis(trifenylfosfino)dichlorokobaltnatý komplex byl poskytnut docentem Lešetickým, stejně tak  $\text{Me}_4\text{NiCl}_2$  byl připraven v laboratoři docenta Lešetického. Katalyzátor 10 % Pd/C a silikagel byly zakoupeny od firmy Merck.  $[^3\text{H}]$ tributylstannan byl připraven na pracovišti ÚJV v Řeži. Methanol pro přípravu mobilní fáze byl od firmy Lab-Scan v kvalitě pro HPLC. Vodík byl od společnosti Linde.

Při analýzách byl použit kapalinový chromatograf s UV detekcí a scintilačním detektorem, který se skládal z vysokotlakého čerpadla Watrex SDS 150, manuálního nástřiku (Rheodyne), UV detektoru Watrex UVD 150 a detektoru radioaktivity Canberra-Packard. K analýzám byla použita kolona Reprosil 100 C-18, 250 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ . Chromatogramy byly vyhodnoceny programem Clarity (DataApex).

K orientačním analýzám reakčních směsí a ověřování čistoty produktů byla používána tenkovrstevná chromatografie (TLC) na komerčních deskách  $\text{SiO}_2$ -TLC/UV254 (Macherey-Nagel, SRN). Jako mobilní fáze byl použit chloroform. K vyhodnocení chromatogramů byla využívána UV-lampa Camag (254 nm).

Hmotnostní spektra k ověření identity produktů byla naměřena na hmotnostním spektrometru Bruker-Esquire 3000 (ESI). Pro GC-MS byl použit přístroj Shimadzu QP2010 (kolona DB5, ID 0,25 mm, film 0,25 $\mu$ m, 30 m; splitless nástřik, elektronová ionizace (70 eV)).

$^1\text{H}$  NMR (400) a  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz) spektra byla zaznamenaná spektrometrem Varian Unity Inova 400 nebo Varian 300 s užitím tetramethylsilanu jako vnitřního standardu.

K odpařování rozpouštědel byla použita rotační vakuová odparka od společnosti Heidolph laborota digital 3000.

Tritium v radioaktivních experimentech bylo detekováno kapalinovým scintilačním spektrometrem (Beckmann 6000 SE, Brayův scintilátor, korekce na DPM dle zhášecí křivky).

Destilovaná voda připravena pomocí aparatury Watek Demia 3-roi.

## **4.2 POPIS EXPERIMENTŮ**

### **4.2.1 Tonalid**

#### **Pokus o přípravu jodtonalidu**

##### *Jodace za přítomnosti oxidu manganičitého*

Pro experiment byl použit postup dle lit.<sup>42</sup> Jod (5,08 g (0,02 mol)) a 2,78 g (0,03 mol) MnO<sub>2</sub> bylo za stálého míchání přidáno do směsi 40 ml kyseliny octové a 10 ml acetanhydridu, která byla chlazena na 5 – 10 °C. Potom bylo do směsi pomalu přikapáno 5 ml konc. kyseliny sírové. Směs byla stále chlazena na 5 – 10 °C. Tonalid byl přidán ve dvojnásobném nadbytku (10,34 g, 0,04 mol) oproti jodu a směs byla za míchání zahřívána na 70 °C po dobu 2 hodin. Poté byla směs nalita na směs vody s ledem (200 ml) s rozpuštěným Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (1,0 g, 7,94 mmol). Po půl hodině byl produkt

extrahován do chloroformu. Reakce byla sledována pomocí TLC a GC/MS. Izolovaný produkt obsahoval pouze výchozí látku.

#### *Jodace s použitím peroxydisíranu draselného*

Postup je převzat z lit.<sup>43</sup> Tonalid (3 g, 11,6 mmol) byl rozpuštěn v 11,6 ml kyseliny octové a roztok byl zahřát na 80 °C. Poté bylo přidáno 2,9 ml destilované vody, 1,47 g jodu (5,79 mmol), 1,45 g peroxydisíranu draselného a 0,9 ml tetrachlormethanu. Reakční směs byla míchána při 80 °C a v průběhu 4 hodin byla sledována pomocí TLC. Vzhledem k tomu, že nebyl pozorován vznik produktu byly do reakční směsi ještě jednou přidány všechny reaktanty (kromě tonalidu) a směs byla míchána při teplotě 80 °C další tři hodiny. Bylo přidáno 70 ml vody a směs byla ponechána vychladnout. Vyloučila se pevná hmota, která byla extrahována chloroformem. Chloroformové extrakty byly spojeny a vytřepány roztokem siřičitanu sodného do odbarvení. Čirý nažloutlý roztok byl dále přes noc sušen síranem hořečnatým.

Roztok, zbylý po odsátí produktu, byl neutralizován K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a poté byl extrahován chloroformem (3 x 25 ml). Chloroformový extrakt byl dvakrát protřepán s 25 ml vodným roztokem Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Poté byl do něj přidán MgSO<sub>4</sub> a roztok byl ponechán sušit přes noc. HPLC analýza prokázala přítomnost výchozí sloučeniny v nadbytku oproti dvěma minoritním produktům, které se sice nepodařilo identifikovat, nicméně žádný z nich dle MS neodpovídal očekávanému jodderivátu.

#### *Jodace jodidem sodným v přítomnosti peroxidu vodíku*

Tonalid (3 g, 11,6 mmol) byl rozpuštěn v 60 ml 40 % ethanolu a k vzniklému roztoku bylo přidáno 6,95 g NaI (46,36 mmol). Směs byla na 10 minut umístěna do lázně s ultrazvukem. Potom byla směs ohřáta na 60 °C, bylo přidáno 2,9 ml CH<sub>3</sub>COOH, 2,2 g CH<sub>3</sub>COONa · 3H<sub>2</sub>O a 1,46 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reakční směs byla dále míchána při teplotě 60 °C po dobu jedné hodiny. Poté bylo do reakční směsi přidáno dalších 5 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a reakční směs byla míchána další hodinu při stejně teplotě. Reakce byla sledována pomocí TLC. Podařilo se identifikovat pouze výchozí látku, další dvě látky dle TLC a dle MS spekter neodpovídaly jodderivátům.

### *Jodace Me<sub>4</sub>NICl<sub>2</sub>*

Postup je převzat z lit.<sup>44</sup> Bylo smícháno 0,5 g Me<sub>4</sub>NICl<sub>2</sub> (1,84 mmol) s 0,43 g tonalidu (1,66 mmol) a rozetřeno v třecí misce. Směs byla ponechána stát přes noc. Směs byla extrahována diethyléterem (3 x 3 ml). Rozpouštědlo bylo odpařeno a byla provedena analýza TLC.

Stejná metodika byla použita i v dalších experimentech, kdy byla směs jodačního činidla a substrátu ponechána v baňce po dobu 1 týdne respektive 2 měsíců.

Ve všech experimentech byla v téměř kvantitativním výtěžku izolována pouze výchozí substance.

### *Jodace Me<sub>4</sub>NICl<sub>2</sub> s přídavkem acetonitrilu*

Směs 0,5 g tonalidu (19,35 mmol) s 0,58 g Me<sub>4</sub>NICl<sub>2</sub> (2,14 mmol) byla rozpuštěna v CH<sub>3</sub>CN a míchána pod zpětným chladičem při teplotě 70 °C po dobu 3 – 4 hodin. Acetonitril byl odpařen a směs byla rozpuštěna v chloroformu a vytřepána s roztokem Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Ze vzorků z chloroformové frakce bylo provedeno několik TLC s různými mobilními fázemi. Extrakty z TLC byly analyzovány MS. Jedinou identifikovatelnou sloučeninou (MS) byla opět výchozí látka.

### **2-Brom-1-(3,5,5,6,8,8-hexamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-naphthalen-2-yl)-ethanon (bromtonalid; TBr)**

Příprava byla provedena modifikovaným postupem podle lit.<sup>45</sup> Do reakční baňky bylo vneseno 0,5 g CuBr<sub>2</sub> (2,24 mmol) a 1,1 ml ethyl-acetátu. Do směsi bylo za míchání magnetickým míchadlem přidán roztok 0,36 g tonalidu (1,39 mmol) v 1,1 ml chloroformu. Směs byla zahřívána na 50 °C za intenzivního míchání pod zpětným chladičem do doby, kdy byla pozorována změna barvy reakční směsi ze zelené na žlutou a změna barvy černého CuBr<sub>2</sub> na bílý CuBr. Reakční směs byla poté zředěna 10 ml chloroformu, pevná fáze odfiltrována a následně bylo rozpouštědlo odpařeno za vakua. Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 20 g silikagelu v soustavě hexan:CHCl<sub>3</sub> (2:1, v/v). Separace byla sledována pomocí TLC s UV detekcí o vlnové

délce 254 nm (mobilní fáze - chloroform). Spojením odpovídajících frakcí a odpařením rozpouštědla za vakua byl izolován produkt s výtěžkem 20,6 %.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.99 (d, J = 6.71, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.40 (dd, J = 2.45, 13.43, 1H), 1.63 (t, J = 13.12, 1H), 1.84-1.90 (m, 1H), 2.49 (s, 3H), 4.42 (s, 2H), 7.23 (s, H), 7.66 (s, 1H)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 16.73; 21.52; 24.67; 28.30; 29.31; 31.93; 32.42; 34.00; 34.40; 37.86; 43.42; 128.18; 130.60; 135.04; 135.30; 142.19; 150.14; 201.29

MS (ESI), m/z M<sup>+</sup> Na 359

### **2,2-dibrom-1-(3,5,5,6,8,8-hexamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-naphthalen-2-yl)-ethanon (dibromtonalid)**

Do reakční baňky bylo vneseno 0,52 g CuBr<sub>2</sub> (2,33 mmol) a 1,2 ml ethyl-acetátu. Poté byl přidán roztok 0,2 g tonalidu (0,77 mmol) v 0,7 ml chloroformu. Reakce probíhala za podmínek popsaných pro přípravu bromtonalidu. Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexan:chloroform (4:1, v/v). Odpařením odpovídajících frakcí dle TLC bylo získáno 0,127 g produktu (výtěžek 4,33 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.93 (d, J = 8.81, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.35 (dd, J = 3.64, 12.00, 1H), 1.57 (t, J = 17.63, 1H), 1.84-1.90 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 6.57 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.70 (s, 1H)

MS (ESI), m/z M<sup>+</sup> Na 439

### **Hydrogenace tonalidu**

V 1 ml methanolu bylo rozpuštěno 7 mg tonalidu (27,08 µmol) a do roztoku bylo přidáno 7,5 mg katalyzátoru 10 % Pd/C. Směs byla míchána 2 hodiny v atmosféře vodíku. Reakční směs byla poté zředěna 3 ml chloroformu, katalyzátor byl odfiltrován a rozpouštědlo z filtrátu odstraněno za vakua. GC/MS analýza prokázala vznik 6-ethyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydro-naftalenu.

GC/MS (EI), m/z M<sup>+</sup> 244

## **Studium reduktivní dehalogenace bromtonalidu**

### *Reduktivní dehalogenace tributylstannanem bez katalyzátoru*

V 1 ml suchého tetrahydrofuranu byly rozpuštěny 3 mg bromtonalidu (8,8  $\mu\text{mol}$ ) a následně bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  (0,38 mmol) tributylstannanu. Reakční směs byla míchána hodinu za nepřístupu vzdušné vlhkosti při teplotě 25 °C a dále další 2 hodiny při teplotě 50°C. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (silikagel, mobilní fáze chloroform, detekce UV 254 nm). Dle TLC vzniknul tonalid a další neidentifikovaná látka, v reakční směsi však nebyl pozorován významný úbytek výchozí látky.

### *Reduktivní dehalogenace tributylstannanem za přítomnosti katalyzátoru $(Ph_3P)_3NiCl_2$*

V reakční baňce byly rozpuštěny 3 mg bromtonalidu (8,8  $\mu\text{mol}$ ) v 1 ml suchého THF. Do roztoku byl přidán bis(trifenylfosfino)dichloronikelnatý komplex (0,5 mg) a dále 10  $\mu\text{l}$  (0,38 mmol) tributylstannanu. Reakční směs byla míchána 4 hodiny za nepřístupu vzdušné vlhkosti při teplotě 50 °C. THF byl poté odpařen za vakua a odpárek byl extrahován 3 ml chloroformu a extrakt filtrován přes vrstvu silikagelu. Rozpouštědlo bylo odpařeno za vakua a odpárek byl analyzován GC/MS. Ve směsi byl jako produkt identifikován tonalid ve směsi s organocíničitými sloučeninami.

### *Reduktivní dehalogenace tributylstannanem za přítomnosti katalyzátorů komplexu $(Ph_3P)_3CoCl_2$ a komplexu (1,5 – cyklooktadien)(pyridin)(tricyklohexylfosfin) iridium(I)*

V 1 ml suchého THF byly rozpuštěny 3,5 mg bromtonalidu (10,26  $\mu\text{mol}$ ), bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  (0,38 mmol) tributylstannanu a katalyzátor 1)  $(Ph_3P)_3CoCl_2$  2) (1,5 – cyklooktadien)(pyridin)(tricyklohexylfosfin)iridium(I). Směsi byly míchány za nepřístupu vzduchu a vzdušné vlhkosti při teplotě 50 °C po dobu 3 hodin. Vzhledem k tomu, že TLC analýzy ukázaly stejnou distribuci produktů byly obě reakční směsi spojeny a rozděleny na TLC (SiO<sub>2</sub>, chloroform). Frakce odpovídající tonalidu a TBr byly extrahovány chloroformem (3x10 ml). Ověření identity tonalidu a bromtonalidu bylo provedeno pomocí MS.

### *Příprava [<sup>3</sup>H]tributylstannanu*

Příprava byla provedena na spolupracujícím pracovišti ÚJV v Řeži podle dodaného návodu. K 100 µl chlortributylstannanu ve 2 ml suchého tetrahydrofuranu bylo přidáno 100 mg sušeného uhličitanu vápenatého a 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 112 GBq v 2 ml roztoku.

### *Příprava [<sup>3</sup>H]tonalidu*

K surovému roztoku [<sup>3</sup>H]tributylstannanu z předchozího experimentu bylo přidáno 10 µl neaktivního tributylstannanu a reakční směs byla míchána při 50 °C 2 hod. Poté bylo přidáno 0,5 mg pevného bromtonalidu a směs byla ponechána reagovat další 2 hodiny za míchání při 50 °C. Po uplynutí reakční doby bylo odebráno 150 µl reakční směsi do 0,5 ml chloroformu. K chloroformovému roztoku bylo přidáno 50 µl ethanolu a celý objem byl zfiltrován přes vatu. Získaný čirý filtrát byl analyzován HPLC s UV detekcí a detekcí radioaktivity (kolona 4x250 mm, Reprosil 100, C18, 5 µm, mobilní fáze methanol, průtok 0,5 ml/min, detekce UV 260 nm, detekce radioaktivity nastavena na <sup>3</sup>H). HPLC analýzou byl prokázán průběh hydrodehalogenační reakce, množství radioaktivity nebylo možné vzhledem k interferencím s radioaktivními nečistotami tritiačního činidla stanovit.

## **4.2.2 Galaxolid**

### *Jodace pomocí Me<sub>4</sub>NCl<sub>2</sub>*

Byl smíchán 1 ml galaxolidu s 0,59 g Me<sub>4</sub>NCl<sub>2</sub>. Byl rozetřen v třecí misce a ponechán přes noc. Směs byla extrahována etherem (3 x 3 ml), spojené extrakty byly odpařeny a analyzovány TLC, kde byla nalezena pouze výchozí látka.

### *Hydrogenace galaxolidu*

Bylo rozpuštěno 7,5 mg galaxolidu (29,02 µmol) v 1 ml metanolu a bylo přidáno 8 mg katalyzátoru 10 % Pd/C. Směs byla míchána v atmosféře vodíku po dobu 2 hodin za laboratorní teploty. Po odstranění katalyzátoru a odpaření rozpouštědla byla provedena TLC analýza, která prokázala, že látka se za použitých hydrogennačních podmínek nemění.

### *Bromace galaxolidu pomocí CuBr<sub>2</sub>*

Podle stejného postupu jako při bromaci tonalidu byl proveden i pokus o bromaci galaxolidu. Bromace za těchto podmínek neproběhla a byla izolována pouze výchozí látka v kvantitativním výtěžku.

### *Deuterace galaxolidu (katalyzátor 10 % Pd/C)*

Galaxolid (7,5 mg, 29,02 µmol) bylo rozpuštěn v 1 ml methanolu. Ke směsi bylo přidáno 7,5 mg 10 % Pd/C a na baňku byl nasazen balónek s plynným deuteriem, které bylo získáno reakcí <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O se sodíkem. Deuterace probíhala po dobu 2,5 hodin za laboratorní teploty. Po ukončení reakce byla směs zředěna chloroformem, přefiltrována a rozpouštědla byla odpařena. Bylo získáno 6 mg látky, která byla dle MS analýzy identifikována jako deuterovaný produkt s obsahem tří atomů <sup>2</sup>H. (M<sup>+</sup> + 3 vzhledem k výchozímu galaxolidu).

### *Deuterace galaxolidu (katalyzátor (1,5 – cyklooktadien)(pyridin)(tricyklohexylfosfin) iridium(I))*

Postup byl proveden stejně jako u předchozí deuterace. Namísto katalyzátoru Pd/C byl ke směsi přidán katalyzátor (1,5 – cyklooktadien)(pyridin)(tricyklohexylfosfin) iridium(I). MS analýza neprokázala přítomnost deuterovaného produktu.

### *Příprava [<sup>3</sup>H]galaxolidu*

Tritiace galaxolidu byla provedena rovněž na ÚJV Řež. Galaxolid (2,2 mg) byl rozpuštěn ve vodném methanolu (1:1, v/v; 5 ml), přidán katalyzátor (5% Pd/BaSO<sub>4</sub>, 21,4 mg) a směs byla tritiována plynným tritem za laboratorní teploty po dobu 120 min.

Po ukončení reakce byla odstraněna labilní aktivita několikanásobným odpařením s methanolem. Odperek byl rozpuštěn v methanolu. Výsledný roztok o objemu 5,0 ml vykazoval aktivitu 148 MBq. Separace produktu byla provedena HPLC (kolona 4x250 mm, ReproSil 100, C18, 5 µm, mobilní fáze methanol, průtok 0,5 ml/min, detekce UV 210 nm, detekce radioaktivity nastavena na  $^3\text{H}$ ) z 30 µl alikvotu směsi po hydrogenaci, kdy bylo získáno 0,68 MBq čisté substance o měrné aktivitě 22,8 MBq/mol. Množství aktivity odpovídající [ $^3\text{H}$ ] galaxolidu v celém objemu tritiační směsi je 113 MBq (76 %).

## **5 VÝSLEDKY A DISKUSE**

Cílem diplomového projektu byla příprava izotopově modifikovaných molekul syntetických mošusových látek, tonalidu a galaxolidu, používaných především do parfemačních kompozic pracích prášků. Tyto radioaktivní analogy jsou cíleny pro další využití ve fytoextračních a fytotransformačních studiích, které mají objasnit možnost technologické aplikace rostlinných biotechnologií v dočišťování vod vypouštěných z čistíren komunálních odpadních vod. Stávající technologie nejsou totiž schopny efektivně odstranit řadu kontaminantů, které jsou velmi odolné vůči mikrobiálnímu rozkladu a které mohou negativně působit na endokrinní systém živočichů. Z uvedeného hlediska by bylo zjevně nevhodnější značení uhlíkem  $^{14}\text{C}$ . Konstrukce takové značené molekuly by však evidentně znamenala totální syntézu celého skeletu, což se neukázalo jako efektivní. Proto bylo zvoleno značení tritiem, které sice má v biologických experimentech určitá omezení – především je nutné počítat s určitou labilitou vázaných atomů tritia a tedy s možností izotopové výměny s vodním prostředím při provádění experimentů. Syntetická dostupnost však vyvažuje některé nevýhody, které lze eliminovat vhodným, byť poněkud pracnějším vyhodnocením biologických (kultivačních) experimentů.

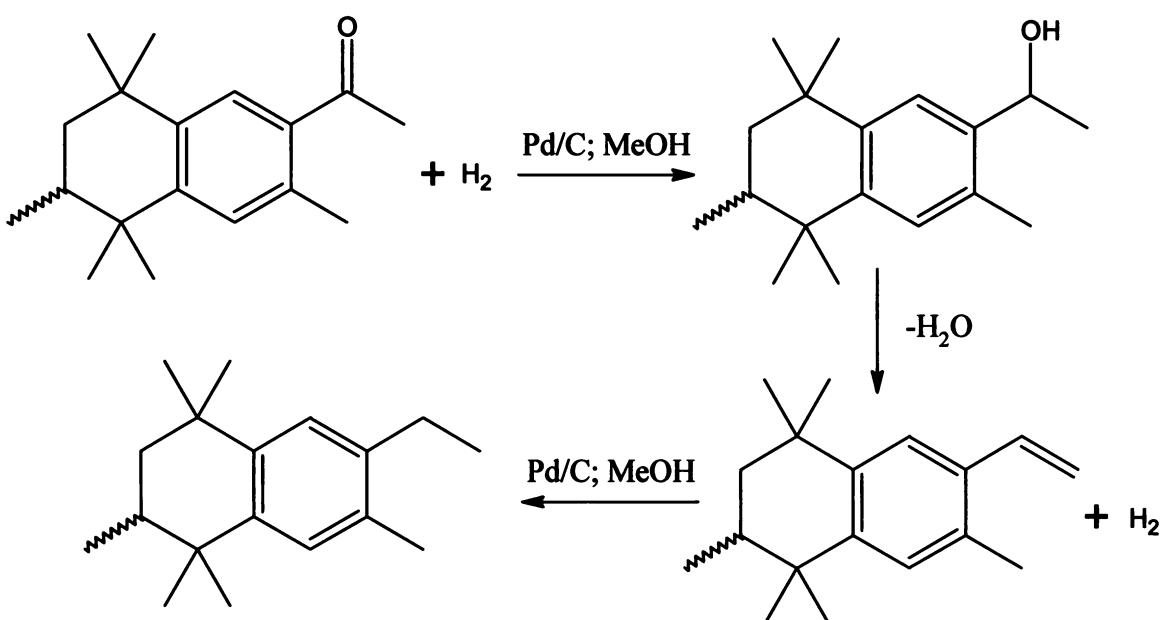
### **5.1 TONALID**

Příprava tritiem modifikovaného tonalidu může vycházet z několika základních úvah. Klasická metoda izotopové výměny s plynným tritiem za podmínek hydrogenace je při pohledu na strukturu látky zjevně prakticky nepoužitelná, neboť přítomnost karbonylové skupiny acetylku představuje za obvyklých tritiačních podmínek ( $^2\text{H}_2$ , Pd/C) snadno redukovatelnou skupinu. Vzniklý alkohol by však vzhledem k inertnosti zbylého skeletu bylo zřejmě možné zpětně oxidovat na karbonylovou skupinu výchozí molekuly. Došlo-li by k podstatné výměně vodíkových atomů za atomy tritia na zbytku molekuly,

měl by takový postup smysl. V některých případech lze rovněž provést tritiaci nestabilního substrátu vůči redukčnímu prostředí a izolovat pouze neredučované zbytky, na kterých došlo k izotopové výměně. Vzhledem k tomu, že při radiochemických syntézách nejde o hmotnost produktu, ale o získané množství radioaktivity ve značeném substrátu, resp. o měrnou aktivitu produktu, má i takový postup svoje opodstatnění.

Právě proto byly provedeny modelové pokusy hydrogenace tonalidu s cílem získat odpovídající redukovanou formu – alkohol, případně prokázat, že alespoň nepatrná část výchozího substrátu nepodlehne za daných podmínek hydrogenaci. Experimentální provedení však z hlediska syntetického záměru prokázalo ten nepříjemný fakt, že dochází nejen k prakticky kvantitativní redukci substrátu, ale že izolovaným produktem není očekávaný alkohol, ale produkt totální redukce acetylové skupiny, skupina ethylová.

Tento fakt není z druhého pohledu až tak překvapivý. Redukcí acetylového karbonylu skutečně v prvním kroku vzniká alkohol (1-(3,5,5,6,8,8-hexamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-naftalen-2-yl)-ethanol). Ten spontánně podléhá dehydrataci za vzniku alkenu (1,1,2,4,4,7-hexamethyl-6-vinyl-1,2,3,4-tetrahydro-naftalen), přičemž vznik je podpořen konjugací dvojné vazby alkenu s aromatickou strukturou molekuly. Vzniklý alken je okamžitě katalyticky hydrogenován na nasycený útvar – ethyl za vzniku 6-ethyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydro-naftalenu. Průběh procesu je znázorněn na obr. 2.



Obr. 2: Schéma degradace tonalidu při hydrogenaci

Z výsledů je zřejmé, že finální molekula již není vhodná k jakékoliv radiochemické transformaci na kýžený produkt. Proto byly hledány jiné cesty, jakým způsobem vnést tritiové atomy do molekuly tonalidu. S využitím výsledků předchozích diplomových prací<sup>1,2</sup>, které zpracovaly metodiku reduktivní dehalogenace jodaromátů tritiovaným tributylstannanem bylo možné předpokládat, že zavedením jednoho či dvou atomů jodu na aromatické jádro v molekule substrátu vznikne jodderivát, který bude možné dehalogenovat za vzniku tritiované molekuly a to zřejmě ještě se známou polohou radioaktivní značky.

Pro získání jodderivátu aromatickou elektrofilní substitucí byla provedena řada experimentů jak s klasickými, tak i některými novými netradičními činidly. Reakce substrátu s jodem za přítomnosti kyseliny dusičné, oxidu manganičitého, peroxodisíranu draselného a peroxidu vodíku, či použití činidla  $\text{Me}_4\text{NCl}_2$  neposkytly dle MS analýz reakční směsi ani stopy jodovaného produktu. Obzvláště překvapivé to bylo v případě  $\text{Me}_4\text{NCl}_2$ , kdy jodace i u deaktivovaných substrátů probíhá i v pevné fázi rozetřením substrátu a činidla. Kvalita činidla byla ověřena v několika experimentech s nitroaromáty, kdy bylo dosaženo pozitivních výsledků. Stejně tak ani metodika radiojodace chloraminovou metodou neposkytla jodovaný produkt. Zdroj inertnosti vůči

jodační reakci lze zřejmě u studovaného substrátu hledat ve sterických faktorech, jak bylo prokázáno na modelu. Možné polohy aromatické substituce jsou tak stericky bráněny, že ani razantní jodační činidla nejsou schopna efektivní reakce. Nakonec ani pokus o přípravu nitroderivátu nitrační směsi nevedl k úspěchu a možná cesta vedoucí přes nitroderivát jeho redukcí a diazotací k halogenderivátu, tak nebyla proveditelná.

Z toho důvodu byla navržena další možnost – substituce na methylové skupině acetylu, kterou lze efektivně modifikovat bromem. Byla použita jednoduchá metoda za použití bromidu měďnatého a tato reakce poskytla jak monobrom tak dibromderivát v závislosti na vzájemném poměru substrátu a regentu.

Vzhledem ke zcela odlišné charakteristice halogenderivátu, tj. substituce na methylové skupině místo aromaticky vázaného halogenu a samotné změně halogenového atomu, bylo nutné ověřit, zda navrhovaná metodika reduktivní dehalogenace bude použitelná i v případě halogenderivátu s halogenem vázaným na alifatický uhlík v alfa poloze ke karbonylové skupině. Vlastní záměna halogenu nepředstavovala tak kritickou změnu, nicméně rozdíl v charakteru aromatického a alifatického halogenderivátu je značný.

Proto byly provedeny experimenty s reduktivní dehalogenací tributylstannanem, které prokázaly vznik cílové látky tonalidu byť ve směsi s produktem redukce tonalidu – alkoholem a produktem jeho dehydratace - alkenem, tak jak bylo navrženo v případě produktů katalytické hydrogenace tonalidu. Přeměna na alkan v tomto případě již není vzhledem k charakteru redukčního činidla možná. Vzhledem k nepatrné konverzi monobromovaného tonalidu v nekatalyzovaném modu byly pro dehalogenační reakci testovány katalyzátory bis(trifenylfosfino)dichloronikelnatý komplex a komplex (1,5 – cyklooktadien)(pyridin)(tricyklohexylfosfin)iridium(I). Oba katalyzátory poskytly srovnatelné výhody a vzniklé reakční směsi s obsahem vzniklého tonalidu byly použity k vypracování podmínek pro HPLC separaci tritiovaného tonalidu.

V tomto ohledu se podařilo nalézt takovou kombinaci podmínek chromatografické separace, kdy jako mobilní fáze plně vyhovuje čistý methanol bez přídavku vody, což je pro následnou izolaci a stanovení radiochemických charakteristik připraveného produktu mnohem výhodnější než obvykle používané směsi methanolu s vodou resp. pufrem.

Tímto byla ověřena možnost přípravy a izolace  $^3\text{H}$  značeného tonalidu. Vzhledem k tomu, že pracoviště nedisponuje tritiační aparaturou byla vlastní příprava [ $^3\text{H}$ ]tributylstannanu z chlortributylstannanu provedena na pracovišti ÚJV v Řeži dle dodaných podmínek a chemikálií, které vycházely z práce.<sup>1,2</sup> Po provedení reakce bylo dodáno 2 ml roztoku surové reakční směsi v tetrahydrofuranu o aktivitě 112 GBq. Se vzorky tohoto roztoku byly provedeny reakce analogické předchozím neradioaktivním experimentům. Ukázalo se, že dodaný roztok obsahuje pouze minimální množství tritiovaného stannanu. Aby bylo možné získat maximální množství tritiovaného produktu a izolovat alespoň stopy radioaktivně značeného tonalidu byla redukční směs obohacena o neaktivní tributylstannan a redukce bromtonalidu byla provedena i za cenu dramatického snížení měrné aktivity. V této reakční směsi již byl při HPLC analýze patrný UV signál redukované látky a bylo možné provést separaci. Výsledný produkt však při HPLC analýze s detekcí radioaktivity vykazoval v oblasti retenčního času tonalidu pouze nepatrné hodnoty radioaktivity. Lze tedy konstatovat, že produkt byl připraven pouze v nepatrém množství, nicméně v rámci řešení projektu byla jednoznačně prokázána možnost přípravy vypracovanou metodou. Důvod neúspěchu v konečné fázi lze spatřovat v připraveném tritiovaném tributylstannanu, kdy tritiaci chlortributylstannanu v přítomnosti palladiového katalyzátoru (Pd/C), uhličitanu vápenatého a v rozpouštědle tetrahydrofuranu vzniká potřebný tritid. Faktorů, které mohou ovlivnit úspěch této reakce je několik, zásadním však bývá minimální přítomnost stop vlhkosti jak v činidlech tak i vyloučení kontaminace vzdušnou vlhkostí během manipulace, adjustace a transportu z ÚJV v Řeži. Přítomnost stop vody účinně rozkládá značený stannan, stejně tak jako jej může rozložit v průběhu reakce vznikající chlorovodík, pokud by nebyl dostatečně neutralizován reakcí s uhličitanem vápenatým. Z chromatografických profilů se zdá, že právě k takovému rozkladu vznikajícího činidla došlo a většina naměřené radioaktivity je přítomna v reakčním rozpouštědle.

## **5.2 GALAXOLID**

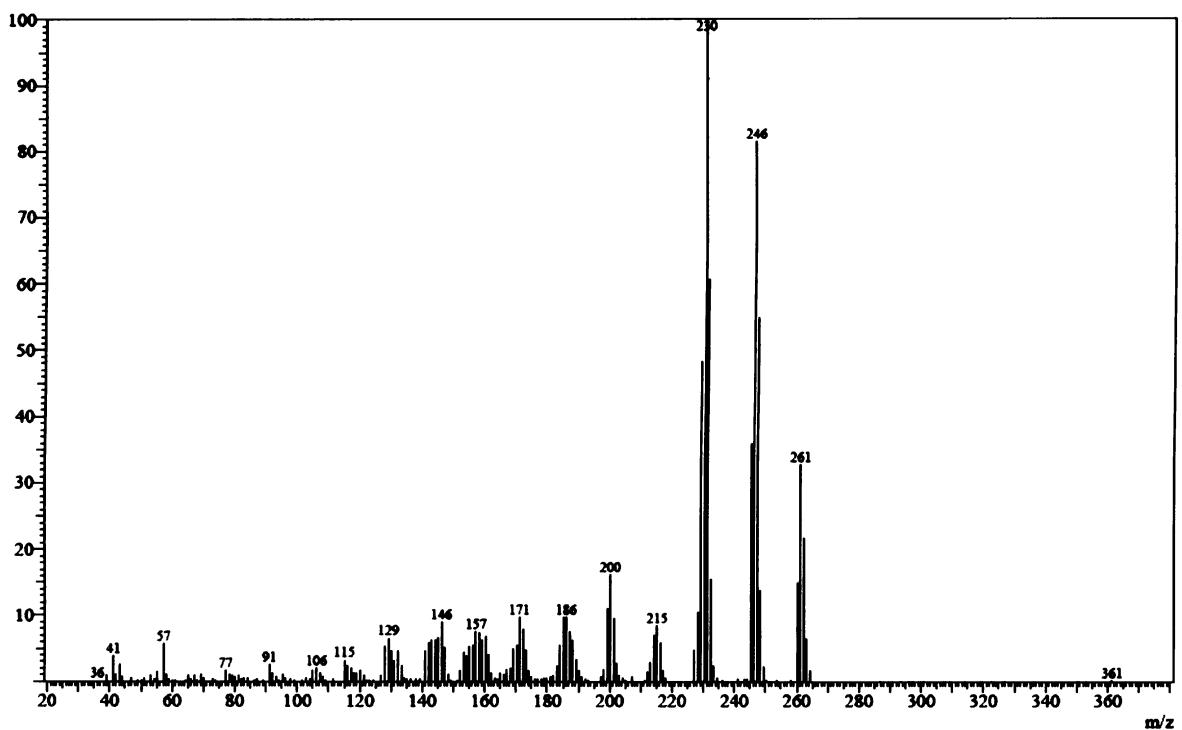
V případě galaxolidu se příprava tritiovaného analogu jeví poměrně jednoduše neboť se nabízí možnost běžné tritiace plynem v přítomnosti Pd/C. Možné nebezpečí v sobě skrývá přítomnost seskupení typu cyklického etheru, který by mohl podlehnout hydrogenolýze.

Z hlediska metabolických studií bývá výhodné, když je známa poloha radioaktivní značky. Takové molekuly však většinou nemohou být získány běžnou tritiaci, nýbrž musí být připraveny výměnou tritia za definovaný atom, většinou halogenu. Výhodou bývá i vazba tritia k aromatickému kruhu, kdy tritiový atom nemá velkou tendenci se vyměňovat s rozpouštědlem. Pokusy o zavedení halogenu na aromatický kruh však nebyly úspěšné. Použití jodačního činidla pro jodaci v pevné fázi zřejmě nebylo úspěšné ze sterických důvodů stejně jako u tonalidu. Bromace za stejných podmínek jako u tonalidu byla spíše experimentem, který prokázal, že reakce s bromidem měďnatým je omezena na uhlíkové atomy v alfa poloze ke karbonylu.

Proto byla přednostně sledována možnost tritiace izotopovou výměnou s plynem, které byly podřízeny další experimenty.

Modelová hydrogenace galaxolidu prokázala, že látka je z podmínek tritiace stabilní a je tedy možné použít izotopovou výměnu. Vzhledem k tomu, že finální tritiace měla být provedena na ÚJV v Řeži, byly ještě ověřeny podmínky tritiace v modelovém experimentu s deuteriem generovaným reakcí sodíku s D<sub>2</sub>O. Hmotnostní spektrum produktu ukazuje na přítomnost tří atomů deuteria v molekule.

V hmotnostním spektru původního galaxolidu jsou dominantní dva píky, molekulární pík 258 m/z a nejintenzivnější pík 243 m/z náležící zbytku galaxolidu po odštěpení postranního řetězce. Na spektru (obr. 3) galaxolidu po katalytické deuteraci je patrný posun píků na hodnoty 246 resp. 261 m/z. To dokazuje substituci tří atomů vodíku a za deuterium na struktuře molekuly.



Obr. 3: MS spektrum galaxolidu po deuteraci

Tímto byla prokázána možnost katalytické izotopové výměny vodíkových atomů za atom tritia v molekule galaxolidu.

Vlastní tritiace poskytla 5 ml roztoku galaxolidu o celkové aktivitě 148 MBq po odstranění labilní radioaktivity. Izolací látky z 30 µl reakční směsi pomocí HPLC bylo získáno 0,68 MBq [<sup>3</sup>H]galaxolidu. Celkově ze 148 MBq dodané aktivity přináleží 113 MBq značenému galaxolidu, zbytek je vázán v nečistotách výchozí látky, která je technickým produktem dodávaným jako 50 % roztok v diethylftalátu. Galaxolid byl sice z dodané směsi izolován, diethylftalát byl chromatograficky odstraněn, nicméně látka je provázena homologem o 12 hmotnostních jednotek vyšším (dle MS analýzy), který má velmi podobné chromatografické chování jako studovaná látka a nelze jej sloupcovou chromatografií ve větším měřítku účinně odstranit tak jako na HPLC. Tritiovaný produkt izolovaný vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií za vypracovaných podmínek je však chromatograficky čistý a vykazuje měrnou aktivitu o hodnotě 22,8 MBq/mol. Dle HPLC analýz vykazuje radiochemickou i chemickou čistotu větší než 95 %.

## **6 ZÁVĚR**

Diplomová práce byla zaměřena na přípravu tritiem modifikovaných polycyklických ekopolutantů typu mošusových látek - galaxolidu a tonalidu.

V případě tonalidu byly testovány možnosti zavedení tritia metodou reduktivní dehalogenace jodovaného substrátu [ $^3\text{H}$ ]tributylstannanem. Zásadní se však ukázala nemožnost zavedení jodu na aromatické jádro substrátu. Přestože byla testována řada jodačních postupů, nepodařilo se získat cílový jodderivát, zřejmě ze sterických důvodů. Alternativní cesta bromace acetylóvého methylu poskytla monobrom a dibromderivát a umožnila testovat metodu reduktivní dehalogenace v neaktivním provedení na alifatickém systému. Výsledky jednoznačně prokázaly možnost reduktivní dehalogenace tributylstannanem u halogenované acetylóvé methylskupiny. Dehalogenace v radioaktivním provedení poskytla sice jen minimální množství produktu, nicméně její průběh byl limitován kvalitou dodaného [ $^3\text{H}$ ]tributylstannanu. Vypracovaná metoda v neaktivním provedení však jednoznačně ukazuje na reálnou možnost přípravy tritiovaného analogu tonalidu.

V případě galaxolidu byly opět pokusy o jodaci aromatické části molekuly neúspěšné a pro vlastní značení tritiem byly navržena metoda katalytické izotopové výměny s plynným tritiem. Postup byl modelován jak s vodíkem, tak i deuteriem a za použitých podmínek byla prokázána inkorporace tří atomů deuteria do molekuly galaxolidu. Ve finální fázi byla provedena tritiace substrátu a izolace čistého produktu pomocí HPLC, kdy byl získán produkt o měrné aktivitě 22,8 MBq/mol.

## 7 SEZNAM ZKRATEK

ADBI	celestolid
AHDI	fantolid
AHTN	tonalid
ATII	traseolid
CAS	Chemical Abstracts
DNA	deoxyribonukloevá kyselina
DPM	dezintegrace za minutu
EI	elektronová ionizace
ER	estrogenní receptory
ER $\alpha$	estrogenní receptory alfa
ER $\beta$	estrogenní receptory beta
ER $\gamma$	estrogenní receptory gama
ESI	ionizace elektrosprejem
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HHCB	galaxolid
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
K <sub>ow</sub>	distribuční koeficient pro soustavu oktanol/voda
M <sub>w</sub>	molekulová hmotnost
Md	medián
MeV	megaelektronvolt
MF	mobilní fáze
MK	mošusový keton
MX	mošusový xylen
Q1	nejnižší naměřená hodnota
Q3	nejvyšší naměřená hodnota
SPDM	semipermeabilní membránové zařízení (semipermeable membrane device)

TBr	<b>7-(2-bromacetyl) -1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaftalen</b>
THF	<b>tetrahydrofuran</b>
TLC	<b>tenkovrstevná chromatografie</b>

## 8 LITERATURA

- 1) Hřebíčková M.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha 2006.
- 2) Komínková M.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha 2006.
- 3) Lešetický, L. a kol.: *Některé aplikace značených sloučenin*, UK v Praze 1981.
- 4) Lešetický, L.: *Metody přípravy izotopicky značených sloučenin*, UK v Praze 1978.
- 5) Wilzbach, K. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1013 (1957).
- 6) Meshi, T.; Sato, Y.: *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **37**, 683 (1964).
- 7) Shu, A.Y.L.; Saunders, D.; Levinson, S.H.; Landavatter, S.W.; Mahoney, A.; Senderoff, S.G.; Mack, J.F.; Heys, J.R.: *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **42**, 797 (1999).
- 8) Nielsen, A.T.; Atkins, R.L.; Norris, W.P.: *J. Org. Chem.*, **45**, 2341 (1980).
- 9) Sakaue, S.; Tsubakino, T.; Nishiyama, Y.; Ishii, Y.: *J. Org. Chem.*, **58**, 3633 (1993).
- 10) Gilbert, K.E.; Borden, W.T.: *J. Org. Chem.*, **44**, 659 (1979).
- 11) Van Der Puy, M.; Belter, R.K.; Borowski, R.J.; Ellis, L.A.S.; Persichini, P.J.III.; Poss, A.J.; Rygas, T.P.; Tung, H.S.: *J. Fluorine Chem.*, **71**, 59 (1995).
- 12) Adimurthy, S.; Ramachandraiah, G.: *Tetrahedron Lett.*, **45**, 5251 (2004).
- 13) Nobe, M.; Nishide, K.; Kawabata, T.; Ohta, K.; Watanabe, K.; Fuji, K.; Fujita, E.: *J. Org. Chem.*, **49**, 3641 (1984).
- 14) Laev, S.S.; Shteingarts, V.D.: *J. Fluorine Chem.*, **96**, 175 (1999).
- 15) Krishnamurthy, S.; Brown, H.: *J. Org. Chem.*, **47**, 276 (1982).
- 16) Marques, C.A.; Selva, M.; Tundo, P.: *J. Org. Chem.*, **59**, 3830 (1994).
- 17) Engman, L.; Cava, M.P.: *J. Org. Chem.*, **47**, 3949 (1982).
- 18) Vaněk, T., Soudek, P., Tykva, R., Kališová, I.: Možnosti využití fytořemediace pro odstranění kontaminace způsobené toxickými kovy a radionuklidů UOCHB  
[http://www.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/Zahlazovani/Z07/P\\_07.htm](http://www.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/Zahlazovani/Z07/P_07.htm), 3.5.2006.

- 19) Cunningham, S.D.; Berti, W.R.; Huang, J.W.: *Trends Biotechnol.*, **13**, 393, (1995).
- 20) Kučerová, P.; Macková, M.; Macek, T.: *Chem. Listy*, **93**, 19 (1999).
- 21) Národní inventura persistentních organických polutantů v české republice, Verze 2003, doplněna 2005, část VII, 16  
[www.recetox.muni.cz/sources/unido\\_narodni\\_inventura\\_03/POPsINV\\_cast\\_VII\\_Kapitola\\_16\\_Biodegradace\\_PCBs.pdf](http://www.recetox.muni.cz/sources/unido_narodni_inventura_03/POPsINV_cast_VII_Kapitola_16_Biodegradace_PCBs.pdf), 21.3.2008.
- 22) Oki, M.; Funakoshi, W.; Nakamura, A.; *Bull. Chem. Soc. Japan*, **44**, 828 (1971).
- 23) Olah, G.A.; Arvanaghi, M.; Vankar, Y.D.: *J. Org. Chem.*, **45**, 3531 (1980).
- 24) Kuivila, H.G.; Menapace, L.W.: *J. Org. Chem.*, **28**, 2165 (1963).
- 25) Fráter, G.; Bajgrowicz, J.A.; Kraft, F.: *Tetrahedron*, **54**, 7633 (1998).
- 26) WWF –  
([http://www.wwf.org.uk/filelibrary/pdf/factsheet\\_synthetic\\_musks\\_food.pdf](http://www.wwf.org.uk/filelibrary/pdf/factsheet_synthetic_musks_food.pdf)),  
27.2.2008.
- 27) Fráter , G.; Müller, U.; Kraft, P.: *Helv. Chim. Acta*, **82**, 1656 (1999).
- 28) Ciappa, A.; Matteoli, U.; Scrivanti, A.: *Tetrahedron: Asymmetry*, **13**, 2193 (2002).
- 29) <http://voda.chmi.cz/ojv2/htm/pasporty/moschus/Tonalide.htm>, 6.3.2008.
- 30) Vonášek, F.; Trepková, E.; Novotný, L.; *Látky vonné a chutové*, Praha 1987.
- 31) <http://voda.chmi.cz/ojv2/htm/pasporty/moschus/Galaxolide.htm>, 6.3.2008.
- 32) Ternes, T.A.; Bonery, M.; Herrmann, N.; Teiser, B.; Andersen,H.R.:  
*Chemosphere*, **66** 894 (2007) .
- 33) Chen, D.; Yeng, X.; Sheng, Y.; Bi, X.; Gui, H.; Sheng, G.; Fu, J.: *Chemosphere*, **66** 252 (2007) .
- 34) Seinen, W.; Lemmen, J.G.; Pieters, R.H.H.; Verbruggen, E.M.J.; van der Burg B.: *Toxicol. Lett.*, **111**, 161 (1999) .
- 35) Hutter, H.-P.; Walner, P.; Moshammer, H.; Hartl, W.; Sattelberger, R.; Lorbeer, G.; Kundi, M.: *Chemosphere*, **59**, 487 (2005).
- 36) Národní inventura persistentních organických polutantů v České Republice, verze 2003, doplněna 2005, část V, 10

[www.recetox.muni.cz/sources/unido\\_narodni\\_inventura\\_03/POPsINV\\_cast\\_V\\_Kapitola\\_10\\_Biodegradace\\_PCBs.pdf](http://www.recetox.muni.cz/sources/unido_narodni_inventura_03/POPsINV_cast_V_Kapitola_10_Biodegradace_PCBs.pdf), 21.3.2008.

- 37) Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách a ekosystémech, VŠCHT a ČSCH, Praha 12. – 14. 9. 2001

[http://www.vscht.cz/zkp/ustav/Sbornik\\_kontaminanty.pdf](http://www.vscht.cz/zkp/ustav/Sbornik_kontaminanty.pdf), 21.3.2008.

- 38) Velišek, J.: *Zlepšování kvality potravin a zajištění optimální výživy obyvatelstva*, VŠCHT 2003

[http://www.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/dokumenty/granty/VZ04\\_03.pdf](http://www.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/dokumenty/granty/VZ04_03.pdf), 21.3.2008.

- 39) Schreurs, R.H.M.M.; Quaedackers, M.O.; Seinen, W.; van der Burg B.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **183**, 1 (2002).

- 40) Bitsch, N.; Dudas, C.; Körner, W.; Failing, K.; Biselli, S.; Rimkus, G.; Brunn, H.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **43**, 257 (2002).

- 41) Gomez, E.; Pillon, A.; Fenet, H.; Rosain, D.; Duchesne, M.J.; Nicolas, J.C.; Balaguer, P.; Casellas, C.: *J. Toxicol. Environ. Health Part A.*, **68**, 239 (2005).

- 42) Lulinski, P.; Krassowska-Swiebocka, B.; Skulski, L.: *Molecules*, **9**, 595, (2004).

- 43) Wirth, H.O.; Königstein, O.; Kern, W.: *Liebigs Ann. Chem.*, **634**, 96 (1960).

- 44) Hajipour, R. A.; Arbabian, M.; Ruoho, E. A.: *J. Org. Chem.*, **67**, 8622, (2002).

- 45) King, L. C., Ostrum G. K: *J. Org. Chem.*, **42**, 3459 (1964).