

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

**Ing. Karel Bednařík**

**TOXICITA TRINITROTOLUENŮ A PRODUKTŮ  
JEJICH BIOTRANSFORMACÍ**

TOXICITY OF TRINITROTOLUENES AND  
PRODUCTS OF THEIR BIOTRANSFORMATIONS

ZKRÁCENÁ VERZE PH.D. THESIS

**Obor:** Chemie životního prostředí

**Školitel:** Prof. RNDr. Zdeněk Friedl, CSc.

**Oponenti:** Prof. Ing. Jiří Matoušek, DrSc.

Doc. RNDr. Miroslava Beklová, CSc.

**Datum obhajoby:** 8. 12. 2004

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

testy toxicity, *Vibrio fischeri*, trinitrotolueny, aminodinitrotolueny, diaminonitrotolueny, dinitrotolueny, aminonitrotolueny, diaminotolueny

## **KEY WORDS**

toxicity tests, *Vibrio fischeri*, trinitrotoluenes, aminodinitrotoluenes, diaminonitrotoluenes, dinitrotoluenes, aminonitrotoluenes, diaminotoluenes

## **MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE**

Areálová knihovna FCH VUT, Purkyňova 118, Brno

© Karel Bednařík, 2005

ISBN 80-214-2844-9

ISSN 1213-4198

# OBSAH

Seznam zkratk	4
1 ÚVOD	5
2 TEORETICKÁ ČÁST	5
2.1 TNT a produkty jeho transformace	5
2.2 Metody syntéz	6
2.3 Hodnocení toxicit	8
2.4 QSAR	9
3 CÍL PRÁCE	10
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	10
4.1 Přístrojové vybavení	10
4.2 Použité chemikálie	11
4.3 Stanovení toxicit	11
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	12
5.1 Syntézy	12
5.2 Stanovení toxicit	13
5.3 QSAR analýza	16
6 ZÁVĚR	24
7 LITERATURA	25
8 ABSTRACT	28
PŘÍLOHA A – CURRICULUM VITAE	29
PŘÍLOHA B – SEZNAM PUBLIKACÍ	30

## Seznam zkratek

Pro větší přehlednost a soulad se zavedeným označením nitrolátek v literatuře jsou studované sloučeniny považovány za deriváty toluenu.

ADNT	Aminodinitrotolueny
ANT	Aminonitrotolueny
AT	Aminotolueny
CDX	$\beta$ -Cyklodextrin
DANT	Diaminonitrotolueny
DAT	Diaminotolueny
DMCDX	Heptakis(2,6-di- <i>O</i> -methyl)- $\beta$ -cyklodextrin
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Dinitroaniliny
DNB	Dinitrobenzeny
DNT	Dinitrotolueny
NA	Nitroaniliny
NB	Nitrobenzen
NT	Nitrotolueny
SDS	Laurylsulfát sodný (dodecylsulfát sodný)
TNT	2,4,6-trinitrotoluen
TNB	Trinitrobenzeny

# 1 ÚVOD

2,4,6-Trinitrotoluen (TNT) patřil k nejpoužívanějším výbušninám 20. století. V důsledku toho došlo ke značné kontaminaci vody a půdy touto sloučeninou v místech výroby a zpracování a rovněž v místech, kde probíhá manipulace a likvidace TNT.

Při průmyslové výrobě TNT docházelo v minulosti ke vzniku dalších polohových izomerů trinitrotoluenu, jež mohou být toxičtější než samotný TNT. Těmto izomerům, jakož i potencionálním produktům jejich biotransformace nebyla na rozdíl od TNT v minulosti věnována větší pozornost.

Hodnocení toxikologických a ekotoxikologických vlastností TNT (průmyslově vyráběného staršími metodami) je významné, stejně tak jako studium vztahů mezi strukturou a jejich akutní toxicitou.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 TNT a produkty jeho transformace

2,4,6-Trinitrotoluen (TNT, 2-methyl-1,3,5-trinitrobenzen,  $\alpha$ -trinitrotoluen, tritol) poprvé připravil Wilbrand v roce 1863. Od počátku 20. století začal být používán jako nejvýznamnější vojenská trhavina nejprve v Německu a poté v ostatních státech. Důvodem jsou jeho vlastnosti: nízká teplota tání, umožňující plnit munici litím, odolnost proti nárazu, elektrostatické energii a tření, nulová hygroskopicitata a vysoká chemická a termická stabilita [1].

TNT tvoří šest polohových isomerů. Fyzikálně-chemická data pěti asymetrických izomerů ovšem nejsou na rozdíl od TNT tak dobře prozkoumána. Značení a odpovídající teploty tání jednotlivých izomerů jsou následující: 2,3,4- ( $\beta$ )-trinitrotoluen t.t. 112 °C; 2,4,5- ( $\gamma$ )-trinitrotoluen t.t. 104 °C; 3,4,5- ( $\delta$ )-trinitrotoluen t.t. 137,5 °C; 2,3,5- ( $\epsilon$ )-trinitrotoluen t.t. 97,2 °C a 2,3,6- ( $\eta$ )-trinitrotoluen t.t. 111 °C.

Obsah těchto izomerů v surovém TNT je následující: 2,4,6-TNT 95,5%, 2,4,5-TNT 2,9%, 2,3,4-TNT 1,3% a 2,3,6-TNT 0,3%. Tyto ve výbušninách nežádoucí příměsi vznikají nitrací 2,3-, 2,5- a 3,4-dinitrotoluenu, které vznikají v druhém stupni výroby nitrací *m*-nitrotoluenu. Asymetrické trinitrotolueny pak byly spolu s dalšími vedlejšími produkty odstraňovány buď krystalizací nebo rafinací siřičitanem sodným a používány v prvním případě jako součást amonoledkových trhavin v druhém jako suroviny pro výrobu barviv. Odpadní filtrát vznikající při rafinaci je nazýván jako „red water“ [1].

Z toxikologického hlediska patří nitroaromáty obecně mezi toxické látky s mutagenními vlastnostmi. Toxicita TNT byla poprvé podrobněji zkoumána za 1. světové války, kdy došlo k výraznému rozšíření výroby. TNT se vyznačuje akutní i chronickou toxicitou, v lidském organismu způsobuje poruchy krevetvorby, působí na CNS, poškozují játra., dráždí a senzibilizuje pokožku. Intoxikace se projevuje

křečemi, bolestmi hlavy a poruchami dýchání. Při chronické otravě dochází k poškození jater a aplastické anemii. Často se také objevují neuropatologické symptomy. TNT se vstřebává pokožkou a sliznicemi [1].

Osud TNT v životním prostředí závisí na mnoha faktorech, které lze rozdělit na biotické a ostatní. Mezi ostatní faktory jsou zařazovány nejrůznější fyzikálně chemické děje. Do skupiny biotických jevů pak náleží transformace původní látky působením nejrůznějších mikroorganismů. Tohoto jevu je rovněž využíváno při cílené biologické degradaci těchto sloučenin.

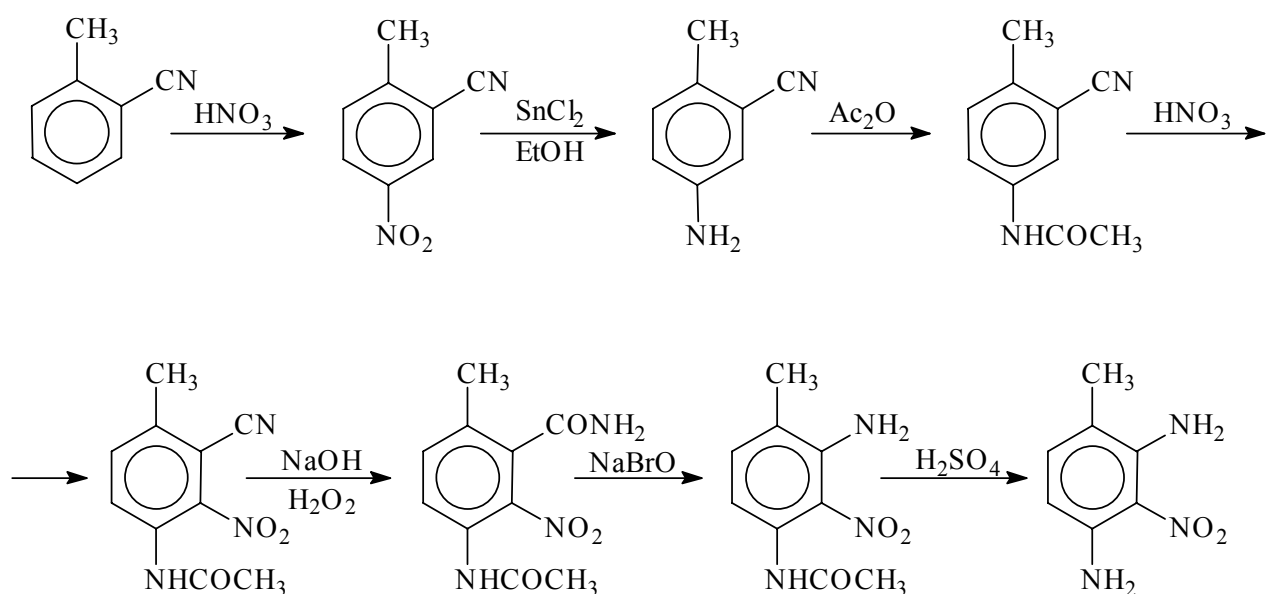
Konečný produkt transformace TNT závisí na způsobu a podmínkách, při nichž tato transformace probíhá. V případě biotransformací je to hlavně druh přítomných mikroorganismů a prostředí, v němž k transformaci dochází. Z hlediska prostředí lze biotransformace (resp. biodegradace) rozdělit na aerobní a anaerobní [2].

Vzhledem k zápornému induktivnímu efektu přítomných nitroskupin je otevření benzenového kruhu a tím i transformace TNT působením oxygenás obtížná. Snadno ovšem probíhá redukce nitroskupin, a to jak v prostředí aerobním, tak anaerobním. Při transformaci TNT postupně vznikají hydroxyaminodinitrotolueny (HADNT), aminodinitrotolueny (ADNT), diaminonitrotolueny (DANT) a jako konečný produkt většinou 2,4,6-triaminotoluen. V závislosti na mikroorganizmech a podmínkách pak dochází odstraněním aminoskupiny ke vzniku hydroxysloučenin a k otevření aromatického kruhu [3]. Během tohoto procesu často dochází rovněž k vzniku azoxysloučenin. Na rozdíl od biotransformací, probíhajících v anaerobním prostředí, dochází v aerobních podmínkách často k úplné mineralizaci TNT [2,3,4]. Ideálními konečnými produkty biodegradací jsou oxid uhličitý a voda, nebo látky, jejichž toxicita je nižší než toxicita výchozího TNT.

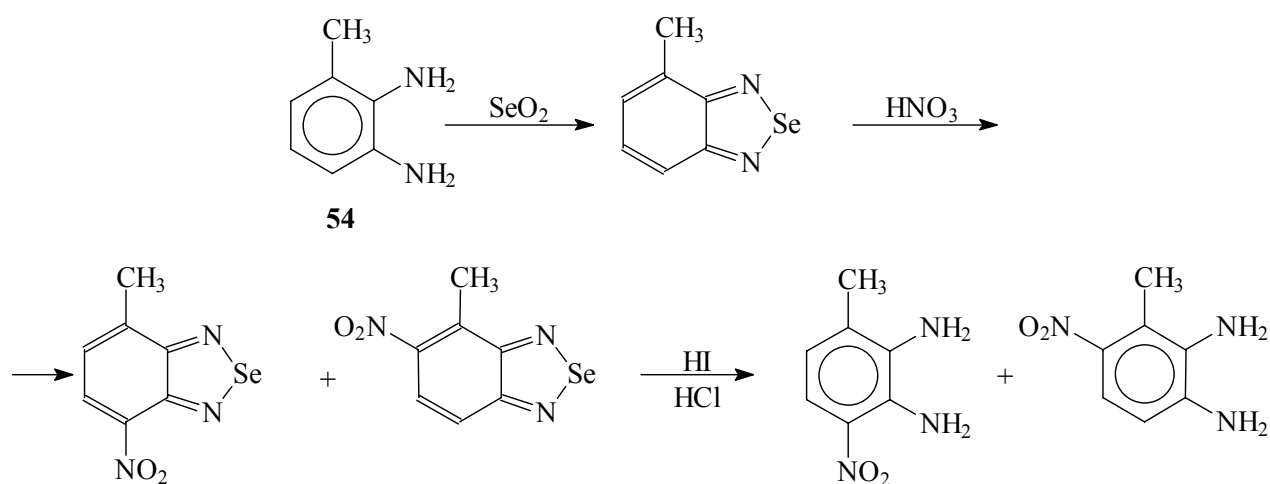
## 2.2 Metody syntéz

Z 62 sloučenin uvažovaných pro testování je většina komerčně dostupných. Jejich seznam je uveden v kapitole 4.2, kde je současně uveden i jejich výrobce. Ostatní sloučeniny uvažované pro testování bylo nutno připravit popsány nebo dosud nepublikovanými původními postupy.

První z těchto sloučenin je 2,4-diamino-3-nitrotoluen. Protože tato látka není dostupná přímou nitrací 2,4-diaminotoluenu (vzniká 2,4-diamino-5-nitrotoluen), je nutno zvolit komplikovanější postup. *N*-(3-kyano-4-methylfenyl)acetamid (získaný z *o*-toluonitrilu, který je nitrován [5], nitro skupina redukována chloridem cínatým v alkoholu [6] a získaný produkt je acetylován acetanhydridem) je nitrován na *N*-(3-kyano-4-methyl-2-nitrofenyl)acetamid, kyanoskupina je hydrolyzována na amid a ten je Hofmannovým odbouráváním přeměněn na amin. V konečném stupni je odstraněn acetyl z dusíku v poloze 4.



Druhou připravenou sloučeninou je 2,3-diamino-4-nitrotoluen. Jelikož v tomto případě není k ochraně aminoskupin během nitrace možno použít acetylaci (dochází k vzniku derivátů benzoimidazolu) byla hledána jiná cesta jejich ochrany. Použitý postup vychází ze vzniku heterocyklu, který nitrován a poté je heterocyklický kruh opět otevřen. Tohoto postupu je použito i při přípravě 2,3-diamino-4-nitrotoluenu. Jako výchozí sloučenina je 2,3-diaminotoluen, jehož ethanolický roztok reaguje s roztokem kyseliny seleničité za vzniku 4-methyl-2,1,3-benzoselenodiazolu. Jeho nitrací dusičnanem draselným v kyselině sírové vzniká směs 5- a 7-nitroderivátů 4-methyl-2,1,3-benzoselenodiazolu [7]. Redukcí těchto sloučenin jodovodíkovou kyselinou vznikají žádané produkty [8]. Jako vedlejší produkt vzniká 2,3-diamino-6-nitrotoluen [9].



### 2.3 Hodnocení toxicit

Pro zjištění cizorodých látek v životním prostředí jsou často používány metody klasické environmentální analýzy (GC, HPLC atd.), kterými lze zjistit obsah jednotlivých polutantů ve vzorku. Pro stanovení toxikologických údajů se již dlouhou dobu používá biologické testování na nejrůznějších organizmech.

Z testovacích organismů jsou k testům ekotoxicity používány nejčastěji ryby (například *Poecilia reticulata*), dafnie (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*) a zelené sladkovodní řasy (*Scenedesmus subspicatus*). Rovněž je používán test inhibice růstu kořene a v neposlední řadě bioluminiscenční bakterie (*Vibrio fischeri*) [10]. Sloučeniny testované v této práci byly těmito bakteriemi stanoveny v pracích [11 až 17]. Hodnoty toxicity jsou vyjadřovány jako  $LC_{50}$  (letální koncentrace, tj. koncentrace, při které uhynie 50% pokusných jedinců),  $IC_{50}$  (inhibiční koncentrace značící koncentraci, která inhibuje růst řas o 50%), NOAEC (nejvyšší koncentrace, která nezpůsobí žádný účinek) nebo v sledovaném případě hodnotami  $EC_{50}$  (efektivní koncentrace, tj. koncentrace, která způsobí 50% inhibici světelného výkonu) [18].

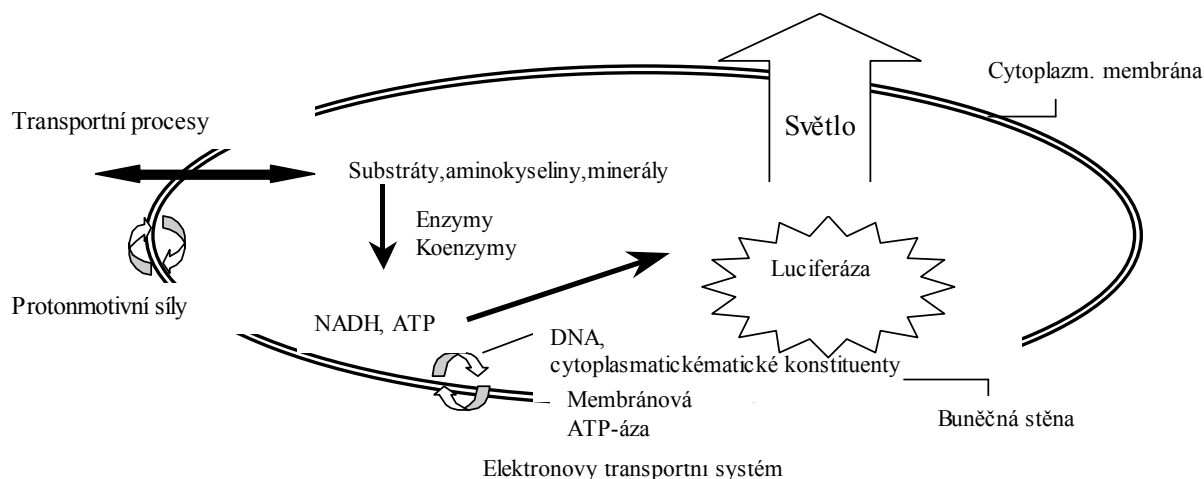
Použití bioluminiscenčních bakterií má před ostatními zmiňovanými organizmy několik výhod, neboť tyto organizmy jsou finančně nákladnější, mají velké nároky na prostor, provedení testů je časově náročné (hodiny až dny) a pro omezený počet jednotlivců mají testy menší statistickou významnost. Naproti tomu použití bioluminiscenčních bakterií je levnější a rychle a relativně snadno proveditelné. Často jsou proto používány pro monitorování znečištění povrchových a odpadních vod, skládkových výluhů, atd. [18].

Samotný význam bioluminiscenčních *in vivo* indikátorů je znám již delší dobu. Ke zjištění toxicity je využíváno poklesu produkce světelného výkonu bakterií v závislosti na koncentraci přítomného toxikantu. U těchto bakterií je přibližně 10 % přeměny metabolické energie využíváno k přeměně na viditelné světlo.

Vzhledem k tomu, že uvedená přeměna je spojena s buněčným dýcháním, je zřejmé, že porušení těchto procesů (ať již narušením metabolismu, nebo přímo buněčných struktur) povede k poklesu bioluminiscence. Tento pokles je přímo úměrný koncentraci měřeného toxikantu způsobujícího porušení buněčného metabolismu v souvislosti s elektronovým transportním systémem.

Samotný vznik světla je dán reakcí redukované formy flavin mononukleotidu (vzniká reakcí nikotiamiddinukleotid fosfátu s flavin mononukleotidem) s vyšším alifatickým aldehydem a kyslíkem za katalýzy enzymem luciferázou [19]. Produktem reakce je flavin mononukleotid, alifatická kyselina, voda a světlo (*Obr. 1*).





Obr. 1 Bakteriální bioluminiscence

Při stanovení toxicit je každá z koncentrací daného vzorku změřena v čase  $t = 0$  proti vzorku srovnávacímu. Toto měření jsou opakována v čase  $t = 15$ , respektive 30 minut. Vypočet % inhibice provede podle rovnice (1):

$$\% (\text{Inhibice}) = 1 - \frac{T_{15}(r) : T_0(r)}{T_{15}(k) : T_0(k)} \cdot 100 \quad (1)$$

kde

$T_{15}(r)$  je světelný výkon měřeného vzorku v čase 15 minut,

$T_0(r)$  je výkon téhož vzorku v čase 0 minut,

$T_{15}(k)$  je světelný výkon kontrolního vzorku v čase 15 minut a

$T_0(k)$  je světelný výkon kontrolního vzorku na počátku měření.

Pro hodnocení výsledků testů je nutno získat minimálně 5 hodnot inhibice pro 5 různých koncentrací, přičemž hodnoty inhibice se musí pohybovat v rozmezí 5 až 95%. Dále je nutné, aby hodnota 50% inhibice ležela minimálně mezi dvěma body.

Získané výsledky jsou výsledně zpracovány probitovou analýzou, kdy získané hodnoty inhibice jsou převedeny na probity a vyneseny proti logaritmu koncentrace jednotlivých vzorků. Z výsledné závislosti jsou poté vypočteny hodnoty koeficientů lineární regrese a zpětně hodnota  $EC_{50}$ .

## 2.4 QSAR

Metoda hodnocení vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (QSAR, Quantitative Structure-Activity Relationships) [20] vychází ze snahy o zjištění závislosti mezi strukturou chemické látky a jejím biologickým efektem. K popisu studované látky slouží většinou empirické konstanty, které mají charakter konstant substituentových. Jsou odvozeny od fyzikálně chemické změny vlastností

sloučeniny, které jsou způsobeny změnou substituentu na základní struktuře. Rovněž jsou používány veličiny (empirické i experimentální), které popisují vlastnosti molekuly jako celku. Z těchto důvodů je zřejmé, že substituentových konstant lze použít pouze pro strukturně příbuzné látky.

Parametry popisující molekulu pak můžeme rozdělit do následujících skupin. Lipofilní parametry (rozdělovací koeficient oktanol-voda  $\log P$ , lipofilní parametry  $\pi$ , fragmentové konstanty  $f_n$ ). Elektronové parametry (Hametovy konstanty  $\sigma$ , molární refrakce  $MR$ ). Sterický parametr  $E_s$ . Parametry popisující topologii molekuly (molekulová konektivita, index molekulového obrysu). Indikátorová proměnná  $I$ . V praxi je možno použít i dalších parametrů, např. veličin z kvantově chemických výpočtů apod.

Výsledná závislost biologické odpovědi na jednotlivých parametrech je řešena multiparametrovou lineární regresí, jejímž cílem je nalezení takové rovnice, která nejlépe popisuje rozptyl hodnot závisle proměnné.

Je také nutno zhodnotit vzájemnou kovarianci nezávisle proměnných a v případě, že mezi některými je vysoká, je nutno uvážit, která z nich lépe vystihuje biologický účinek z fyzikálně chemického hlediska.

Na základě získaných rovnic je poté možno předpovědět biologické odpovědi látek, jež dosud nebyly připraveny nebo pro něž nejsou biologická data dostupná z jiných důvodů.

### 3 CÍL PRÁCE

Disertační práce „Toxicita trinitrotoluenů a produktů jejich biotransformací“ má za cíl stanovení toxicit izomerů TNT a možných produktů jejich transformace, jakými jsou aminodinitrotolueny (ADNT) a diaminonitrotolueny (DANT). S ohledem na asymetrické TNT je třeba pro doplnění série studovaných látek syntetizovat několik doposud nepopsaných sloučenin.

Ke stanovení toxicit, vyjádřených jako efektivní koncentrace  $EC_{50}$ , je navrhováno využití bioluminiscenčních bakterií *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 spolu s odpovídajícím luminometrem ToxAlert<sup>®</sup> 10 (MERCK). Vyhodnocení nalezených toxicit v závislosti na struktuře studovaných aromatických nitrosloučenin bude provedeno metodami QSAR analýzy.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Přístrojové vybavení

<sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektra byla měřena na NMR spektrometrech Bruker AVANCE DRX 500 a Bruker AVANCE 300. Použitá rozpouštědla a chemické posuny ve stupnici  $\delta$  (TMS) jsou shrnuta v kapitole 5.1.

Hodnoty inhibice jednotlivých sloučenin byly měřeny na bioluminiscenčních bakteriích *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 dodávaných, spolu s odpovídajícím luminometrem ToxAlert<sup>®</sup> 10, firmou MERCK (kapitola 5.2).

Pro výpočet hodnot rozdělovacího koeficientu oktanol-voda byl použit program ACD/Log *P* DB [21]. Výpočet slučovacích entalpií, energií HOMO a LUMO, dipólových momentů, ploch a objemů studovaných molekul byl proveden na semiempirické úrovni metodou AM1 [22].

## 4.2 Použité chemikálie

Nitrobenzen (99+%), 4-nitroanilin (99+%), 2-nitrotoluen (99+%), 3-nitrotoluen (99%), 4-nitrotoluen (99%), 3,5-dinitroanilin (97%), 1,4-dinitrobenzen ( $\geq 98\%$ ), 2,3-dinitrotoluen (99%), 2,4-dinitrotoluen (97%), 2,6-dinitrotoluen (98%), 3,4-dinitrotoluen (99%), 4-amino-3,5-dinitrotoluen (99%), 2-amino-3-nitrotoluen (99%), 2-amino-4-nitrotoluen (99%), 3-amino-4-nitrotoluen (95%), 4-amino-2-nitrotoluen (97%), 4-amino-3-nitrotoluen (98%), 2,4-diaminotoluen (98%), 2,5-diaminotoluen (byl uvolněn ze sulfátu a předestilován), 2,6-diaminotoluen (97%) a 3,4-diaminotoluen (97%) (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, BRD). Produktem této firmy byl rovněž 2,6-dinitroanilin (95%), který byl před měřením překrystalován z ethanolu. 2-Nitroanilin (čistý) a 3-nitroanilin (čistý) (Lachema, Brno, ČR). 1,2-dinitrobenzen ( $\geq 97\%$ ), 1,3-dinitrobenzen ( $\geq 98\%$ ), 2-amino-5-nitrotoluen ( $\sim 99\%$ ), 2-amino-6-nitrotoluen ( $\geq 98\%$ ), 3-aminotoluen ( $\geq 99\%$ ) a 2,3-diaminotoluen ( $\geq 97\%$ ) (Fluka, Buchs, Švýcarsko). 2-Aminotoluen ( $> 99\%$ ) (Merck, Darmstadt, BRD). 4-Aminotoluen (čistý) (Reachim, Moskva, SSSR). 1,3,5-Trinitrobenzen (čistý) (Společnost pro chemickou a hutní výrobu, Ústí n/Labem, ČR). TNT (Explosia Pardubice, ČR) byl před použitím překrystalován z toluenu. Všechny ostatní testované sloučeniny byly syntetizovány na našem pracovišti.

## 4.3 Stanovení toxicit

Pro přípravu roztoků látek jejichž toxicity byly měřeny byla navážka dané sloučeniny rozpuštěna v acetonu (množství acetonu bylo voleno tak, aby koncentrace sledované látky byla dvojnásobkem nejvyšší požadované konečné koncentrace) a tento roztok byl pipetován do roztoku 2%ního chloridu sodného (pro všechna měření v sledované sérii látek byl použit tentýž roztok, který byl mezi měřeními skladován v mrazničce). Další požadované koncentrace vzorku byly získány nejčastěji ředěním 1:1. Pro každou látku byla připravena šestice roztoků o různých koncentracích.

Kontrolní roztok byl připraven přidavkem acetonu k 2% roztoku chloridu sodného.

V případech, kdy zkoumané sloučeniny byly rozpouštěny v roztocích heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyklodextrinu byl tento rozpuštěn v 2%ním roztoku

chloridu sodného a takto získaný roztok byl použit jak pro přípravu roztoků, tak pro kontrolní vzorek.

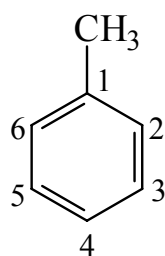
Před vlastním stanovením hodnot efektivní koncentrace byly provedeny předběžné testy pro určení vhodného koncentračního rozsahu roztoků měřené látky za použití „MULT Assay“ modu luminometru [18]. Použité koncentrace zkoumaných sloučenin byly odhadovány na základě dřívějších prací [11, 12]. Po ukončení měření byly odečteny hodnoty inhibice a koncentrace buď upravena a test opakován (v případě, že hodnota byla příliš nízká nebo naopak vysoká) nebo bylo přistoupeno k vlastnímu stanovení.

Vlastní stanovení bylo provedeno v „EC Assay“ modu luminometru [18]. Hodnoty inhibice byly měřeny v čase 15 a 30 minut. Hodnoty inhibic pro jednotlivé koncentrace stanovovaných sloučenin byly přepočteny hodnoty EC<sub>50</sub>, které jsou shrnuty v *Tab. 1* (kapitola 5.2).

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Syntézy

V následujících odstavcích jsou uvedeny <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C-NMR posuny prvně připravených sloučenin, jakož i pro sloučenin, jejichž identitu bylo nutno ověřit. Číslování uhlíkových atomů je vyznačeno na následujícím schématu:



V případě atomů vodíků, vázaných na aromatickém jádře, je při jejich číslování shodně použito číslování atomů uhlíku.

***N*-(3-Kyano-4-methyl-2-nitrofenyl)acetamid:** <sup>13</sup>C NMR (aceton-d<sub>6</sub>, 75 MHz): 20,54 (CH<sub>3</sub>), 23,91 (COCH<sub>3</sub>), 108,58 (C2), 114,25 (CN), 130,47 (C5), 131,36 (C1), 135,13 (C6), 141,43 (C4), 169,67 (COCH<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (aceton-d<sub>6</sub>, 300 MHz): 2,16 s, 3H (CH<sub>3</sub>), 2,61 s, 3H (COCH<sub>3</sub>), 7,71–7,74 m, H (H5), 8,12–8,16 m, H (H6).

**3-(Acetylamino)-6-methyl-2-nitrobenzamid:** <sup>13</sup>C NMR (aceton-d<sub>6</sub>, 125 MHz): 19,31 (CH<sub>3</sub>), 23,91 (COCH<sub>3</sub>), 126,42 (C5), 129,87 (C4), 133,07 (C1), 134,20 (C2), 134,74 (C6), 167,68 (COCH<sub>3</sub>), 169,52 (CONH<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (aceton-d<sub>6</sub>, 500 MHz): 2,12 s, 3H (CH<sub>3</sub>), 2,42 s, 3H, (COCH<sub>3</sub>), 7,45–7,47 m, H (H5), 7,79–7,82 m, H (H6).

***N*-(3-Amino-4-methyl-2-nitrofenyl)acetamid:** <sup>13</sup>C NMR (aceton-d<sub>6</sub>, 125 MHz): 17,83 (CH<sub>3</sub>), 24,59 (COCH<sub>3</sub>), 111,44 (C5), 121,50 (C1), 133,04 (C3), 135,21 (C4), 135,21 (C6), 144,05 (C2), 169,04 (COCH<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (aceton-d<sub>6</sub>, 500 MHz): 2,12 s, 3H (CH<sub>3</sub>), 2,22 s, 3H (COCH<sub>3</sub>), 7,19–7,21 m, H (H5), 7,28–7,30 m, H (H6).

**2,4-Diamino-3-nitrotoluen:**  $^{13}\text{C}$  NMR (aceton- $\text{d}_6$ , 125 MHz): 16,86 ( $\text{CH}_3$ ), 103,56 (C5), 109,93 (C1), 123,32 (C3), 137,17 (C6), 145,23 (C4), 146,51 (C2).  $^1\text{H}$  NMR (aceton- $\text{d}_6$ , 500 MHz): 2,12 s, 3H ( $\text{CH}_3$ ), 6,15–6,18 m, H (H5), 7,00–7,01 m, H (H6).

**2,3-Diamino-4-nitrotoluen:**  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $\text{d}_6$ , 75 MHz): 18,20 ( $\text{CH}_3$ ), 112,79 (C5), 118,35 (C6), 126,00 (C3), 130,03 (C4), 134,31 (C1), 134,71 (C2).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $\text{d}_6$ , 300 MHz): 2,14 s, 3H ( $\text{CH}_3$ ), 6,40–6,43 m, H (H5), 7,30–7,34 m, H (H6).

**2,3-Diamino-6-nitrotoluen** (připraven redukcí 4-methyl-5-nitro-2,1,3-benzoselenodiazolu):  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $\text{d}_6$ , 75 MHz): 13,89 ( $\text{CH}_3$ ), 109,75 (C4), 116,47 (C5), 132,37 (C1), 139,69 (C2), 141,01 (C3).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $\text{d}_6$ , 300 MHz): 2,30 s, 3H ( $\text{CH}_3$ ), 6,48–6,51 m, H (H4), 7,27–7,30 m, H (H5).

**2,3-Diamino-6-nitrotoluen** (připraven podle [9]):  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $\text{d}_6$ , 125 MHz): 13,86 ( $\text{CH}_3$ ), 109,54 (C4), 116,35 (C5), 132,25 (C1), 139,44 (C2), 140,91 (C3).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $\text{d}_6$ , 500 MHz): 2,26 s, 3H ( $\text{CH}_3$ ), 6,45–6,47 m, H (H4), 7,25–7,27 m, H (H5).

Ze spekter 3-(acetylamino)-6-methyl-2-nitrobenzamidu, 3-(acetylamino)-6-methyl-2-nitrobenzamidu, *N*-(3-amino-4-methyl-2-nitrofenyl)acetamidu a 2,4-DA-3-NT vyplývá, že tyto sloučeniny se podařilo navrženým postupem připravit. Totéž lze prohlásit i o 2,3-DA-4-NT, u kterého je správnost výchozí úvahy potvrzená i shodností spekter vedlejšího produktu, 2,3-DA-6-NT, která jsou shodná se spektry této látky připravené jiným [9], již známým postupem.

## 5.2 Stanovení toxicit

Byly změřeny hodnoty inhibice v závislosti na různých koncentracích za použití bakterií *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 (kapitola 4.3). Inhibice byla v souladu s [18] měřena v čase 15 a 30 minut. Tyto závislosti byly linearizovány logaritmováním koncentrací a převedením hodnot inhibice na probity [23]. Z těchto závislostí byly poté zpětně vypočteny hodnoty  $\text{EC}_{50}$ . Pro výpočet byly použity pouze hodnoty inhibice ležící v rozmezí 5 až 95%. Výsledné hodnoty  $\text{EC}_{50}$  spolu s jejich logaritmovanými hodnotami jsou shrnuty v *Tab. 1*.

Vzhledem k tomu, že ne všechny sloučeniny, které byly původně uvažovány pro testování jsou dostatečně rozpustné ve vodě natolik, aby bylo možno stanovit hodnoty  $\text{EC}_{50}$ , byl hledán systém ve kterém by bylo možno rozpustnost těchto sloučenin zvýšit. Ze sloučenin způsobujících zvýšení rozpustnosti byly testovány některé detergenty a sacharidy. Z detergentů to byl: TRITON X-100 (benzylpolyethylenglykol-*terc.*-oktylfenylether), BRIJ 35 (polyethylenglykoldodecylether), TERGITOL NPX-728 (nonadecylfenylpolyethylenglykol) a laurylsulfát sodný (SDS). Ze sacharidů pak byl testován  $\beta$ -cyklodextrin (CDX), heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyklodextrin (DMCDX), laktóza a D-galaktóza. V předběžné fázi byly testovány toxicity těchto sloučenin.

Tab. 1 Naměřené hodnoty  $EC_{50}$  v časech 15 a 30 minut

Sloučenina	$EC_{50}$ (mg.l <sup>-1</sup> )		-log $EC_{50}$		Sloučenina	$EC_{50}$ (mg.l <sup>-1</sup> )		-log $EC_{50}$	
	t <sub>15</sub>	t <sub>30</sub>				t <sub>15</sub>	t <sub>30</sub>		
NB	190	210	-2,28	-2,32	2-A-3,6-DNT	5,9	6,4	-0,77	-0,81
2-NA	46	49	-1,66	-1,69	2-A-4,5-DNT	25	21	-1,40	-1,32
3-NA	175	165	-2,24	-2,22	3-A-2,4-DNT	36	34	-1,56	-1,53
4-NA	22	22	-1,34	-1,34	3-A-2,6-DNT	47	49	-1,67	-1,69
2-NT	41	43	-1,61	-1,63	3-A-4,5-DNT	9,7	4,7	-0,99	-0,67
3-NT	63	72	-1,80	-1,86	4-A-2,3-DNT	24	22	-1,38	-1,34
4-NT	48	46	-1,68	-1,66	4-A-2,5-DNT	3,5	2,3	-0,54	-0,36
2,3-DNA	29	25	-1,46	-1,40	4-A-2,6-DNT	31	32	-1,49	-1,51
2,4-DNA	20	20	-1,30	-1,30	2-A-3-NT	30	29	-1,48	-1,46
2,5-DNA	2,6	1,4	-0,41	-0,15	2-A-4-NT	140	150	-2,15	-2,18
2,6-DNA	25	20	-1,40	-1,30	2-A-5-NT	64	70	-1,81	-1,85
3,4-DNA	12	9,7	-1,08	-0,99	2-A-6-NT	130	120	-2,11	-2,08
3,5-DNA	70	58	-1,85	-1,76	3-A-4-NT	26	30	-1,41	-1,48
1,2-DNB	19	15	-1,28	-1,18	4-A-2-NT	76	79	-1,88	-1,90
1,3-DNB	67	56	-1,83	-1,75	4-A-3-NT	32	32	-1,51	-1,51
1,4-DNB	1,5	0,89	-0,18	0,05	2-AT	900	970	-2,95	-2,99
2,3-DNT	18	17	-1,26	-1,23	3-AT	520	470	-2,72	-2,67
2,4-DNT*	85	92	-1,93	-1,96	4-AT	380	390	-2,58	-2,59
2,5-DNT	7,1	6,0	-0,85	-0,78	2,3-DAT	140	110	-2,15	-2,04
2,6-DNT	34	37	-1,53	-1,57	2,4-DAT	1700	1700	-3,23	-3,23
3,4-DNT	29	24	-1,46	-1,38	2,5-DAT	48	30	-1,68	-1,48
3,5-DNT*	91	68	-1,96	-1,83	2,6-DAT	930	650	-2,97	-2,81
1,2,3-TNB	0,10	0,050	1,00	1,30	3,4-DAT	200	170	-2,30	-2,23
1,2,4-TNB	0,084	0,055	1,08	1,26	2,3-DA-4-NT	15	18	-1,18	-1,26
1,3,5-TNB	0,27	0,16	0,57	0,80	2,3-DA-6-NT	54	57	-1,73	-1,76
2,3,4-TNT	0,54	0,37	0,27	0,43	2,4-DA-3-NT	28	28	-1,45	-1,45
2,3,5-TNT	0,42	0,24	0,38	0,62	2,4-DA-5-NT	54	60	-1,73	-1,78
2,3,6-TNT	0,23	0,14	0,64	0,85	2,4-DA-6-NT	25	28	-1,40	-1,45
2,4,5-TNT	0,23	0,15	0,64	0,82	2,5-DA-4-NT	24	23	-1,38	-1,36
2,4,6-TNT	6,8	4,1	-0,83	-0,61	3,4-DA-2-NT	40	35	-1,60	-1,54
3,4,5-TNT	0,46	0,22	0,34	0,66	4,5-DA-2-NT	29	29	-1,46	-1,46
2-A-3,4-DNT	16	12	-1,20	-1,08					

\* Ve vzorcích byl na místo acetonu použit DMSO o konečné koncentraci 20 µl/ml

Z uvedených sloučenin se ukázalo jako nejlepší komplexotvorné činidlo DMCDX z důvodu relativně malé toxicity a velké rozpustnosti této látky. Ostatní jsou buď velmi toxické nebo nevedou k zvýšení rozpustnosti sledovaných látek. V další fázi byla ověřena případná aditivita této sloučeniny na toxicitu.

Výsledky testů ukázaly že, přítomnost DMCDX v roztoku během měření sice podstatně zvyšuje rozpustnost sledovaných látek, avšak její účinek je aditivní

(prudký pokles toxicit způsobený pravděpodobně nedostupností sledovaných sloučenin pro bakterie). Z těchto faktů vyplývá, že stanovit toxicity některých málo rozpustných sloučenin přímým měřením není za těchto podmínek možné a je nutno se spokojit pouze s výpočtem její teoretické hodnoty metodou QSAR a tím i odhadnutím jejich relativního účinku ve srovnání s ostatními studovanými látkami.

Vzájemným srovnáním naměřených toxicit se ukazuje, že toxicita studovaných sloučenin se pohybuje podle typů jednotlivých sloučenin v závislosti na počtu a vzájemné poloze nitroskupin. Nejvyšší toxicitu vykazují TNB spolu s asymetrickými trinitrotolueny, následovány TNT a těmi dinitro sloučeninami, které mají nitroskupiny vzájemně v *para* poloze. Další v pořadí toxicit se nachází (s několika výjimkami) dinitro sloučeniny s nitroskupinami v poloze *ortho*. Následují dinitro sloučeniny s nitroskupinami v poloze *meta* spolu s mononitro deriváty a skupinu uzavírají AT a DAT.

Vlivu methylové skupiny na toxicitu není nikterak výrazný, neboť v řadě látek seřazených podle toxicity jsou deriváty toluenu i ostatní sloučeniny rovnoměrně rozptýleny. Zatímco v některých případech dochází k poklesu toxicity (např. trinitrotoluenů ve srovnání s TNB) v jiných je tomu opačně, popřípadě záleží na poloze v níž se methylová skupina nalézá (např. 2,6-DNT > 1,3-DNB > 2,4-DNT > 3,5-DNT).

Pomyslné nahrazení atomu vodíku v dané sloučenině za aminoskupinu nevede stejně jako v případě methylu k jednoznačným výsledkům. Opět závisí na typu sloučeniny a poloze aminoskupiny vůči nitroskupinám, což potvrzuje závěr, že toxicita tohoto typu sloučenin je nejvíce ovlivňována počtem a vzájemnou pozicí nitroskupin.

Vliv aminoskupiny na toxicitu je přesto podstatně výraznější. Náhradou nitroskupiny za aminoskupinu (tedy redukcí dané sloučeniny, což je, jak již bylo uvedeno principem biologické degradace tohoto typu sloučenin) dojde k výraznému snížení toxicity. Nejvíce je tento jev patrný v případě redukce TNB a asymetrických trinitrotoluenů a jim odpovídajícím ADNT, respektive DNA, kde se pokles toxicity pohybuje v rozmezí jednoho až tří řádů. Redukce další nitroskupiny vede k dalšímu poklesu toxicity, ale ten v případě, že v molekule zůstává ještě jedna nitroskupina, není již tak výrazný jako v případě redukce nitroderivátů neobsahujících aminoskupinu. Pokud ovšem v molekule nezůstává již žádná nitroskupina je tento pokles opět výrazný (až o dva řády), jak lze vidět na případu redukce DNT. Vzhledem k obtížné přípravě a vysoké nestabilitě triaminotoluenů (TAT), díky které se nedají uchovat delší dobu, nebylo možno tento jev ověřit u trinitrotoluenů, ale vzhledem k tomu co již bylo napsáno dříve, lze předpokládat, že i zde by došlo k dalšímu poklesu toxicity.

Tento pokles toxicity byl pozorován nejen u těchto sloučenin měřených pomocí bakterií *Vibrio fisheri*, ale i v případě testů na jiných organizmech. V literatuře [12] je shrnuta toxicita některých těchto sloučenin pro střevle (*Phoximus p.*) a perloočky (*Daphnia magna*).

Ačkoli se jedná o jiný typ organismů a délka testovací doby byla podstatně delší (48 a 96 hodin) je i z těchto údajů pozorovatelný značný pokles toxicit od trinitrotoluenů a TNB směrem k aminodinitrotoluenům.

Rovněž v tomto případě je patrné, že největší toxicity vykazují sloučeniny s nitroskupinami vzájemně vázanými v poloze *para* případně *ortho*. Tato závislost byla rovněž pozorována v případě, kdy byl jako testovací organismus použit kapr obecný [24].

V příbuzné práci z našeho pracoviště [25] je použit test inhibice růstu kořene a klíčivosti semen pšenice (*Triticum aestivum*), hořčice (*Sinapis alba*), salátu (*Lactuca sativa*) a čočky (*Lens culinaris*). V této práci již nejsou rozdíly mezi TNT a ADNT případně ANT tak jasně patrné, i zde je však výrazný rozdíl od DAT.

V pracích [12, 13, 14], kde k testování byly použity bakterie *Vibrio fischeri* pro menší soubor dat, je pořadí toxicit jednotlivých typů sloučenin zachováno.

### 5.3 QSAR analýza

V Tab. 2 jsou uvedeny chemicko-fyzikální parametry, které byly testovány při řešení QSAR rovnic víceparametrovou lineární regresí.

V této tabulce je **I** proměnná charakterizující počet a vzájemnou polohu nitroskupin na aromatickém jádře. Pro sloučeniny bez nitroskupiny je její hodnota 0, pro mono nitro sloučeniny 0,5, pro dinitro sloučeniny s nitroskupinami vázanými vzájemně v poloze *meta* 1, v poloze *ortho* a *para* a pro symetrické trinitro sloučeniny 3 a konečně pro asymetrické trinitro sloučeniny je její hodnota 5 [24, 26].

**$\Sigma\sigma$**  je suma Hammetových konstant. Při jejich výpočtu byl jako základní struktura použit nitrobenzen. Hodnoty konstant pro jednotlivé *ortho* substituenty byly  $\sigma_o$ -CH<sub>3</sub> -0,15,  $\sigma_o$ -NO<sub>2</sub> 1,40,  $\sigma_o$ -NH<sub>2</sub> -0,79 [27]. Zbývající konstanty  $\sigma_m$ -CH<sub>3</sub> -0,06,  $\sigma_m$ -NO<sub>2</sub> 0,71,  $\sigma_m$ -NH<sub>2</sub> -0,09,  $\sigma_p$ -CH<sub>3</sub> -0,14,  $\sigma_p$ -NO<sub>2</sub> 0,81,  $\sigma_p$ -NH<sub>2</sub> -0,57 [28].

**Log P** je rozdělovací koeficient oktanol-voda vypočtený pomocí programu ACD/log P DB [21].

**$\Sigma E_s$**  je suma sterických konstant. Pro methylovou skupinu byla použita hodnota -1,24, pro nitroskupinu -2,52 a pro amino skupinu -0,61 [29].

**$\Sigma MR$**  je suma molárních refrakcí. Pro methylovou skupinu byla použita hodnota 0,56, pro nitroskupinu 0,74 a pro amino skupinu 0,54 [29].

**$^1\chi$**  je index konektivity prvního řádu vypočtený podle pravidel uvedených v [20].

**$^1\kappa$**  je index molekulového obrysu vypočtený podle [26].

Hodnoty  $E_{\text{HOMO}}$ ,  $E_{\text{LUMO}}$ , dipólového momentu  $\mu$ , plochy **S** a objemu **V** molekuly a slučovací entalpie  $\Delta H_f^\circ$  byly vypočteny na semiempirické úrovni za totální optimalizace rovnovážné geometrie metodou AM1 [22].



Tab. 2 Fyzikálně chemické parametry použité pro konstrukci QSAR rovnic

Sloučenina	I	$\Sigma\sigma$	$\log P$	$\Sigma E_S$	$\Sigma MR$	$^1\chi$	$^1\kappa$	$E_{HOMO}$ (eV)	$E_{LUMO}$ (eV)	$\mu$ (D)	S ( $\text{\AA}^2$ )	V ( $\text{\AA}^3$ )	$\frac{\Delta H_f}{(\text{kcal.mol}^{-1})}$	$E_{HOMO}-E_{LUMO}$ (eV)
NB	0,5	0,00	1,95	-2,52	0,74	4,305	6,677	-10,56	-1,07	5,24	141,48	121,20	25,291	-9,49
2-NA	0,5	-0,79	1,83	-3,13	1,28	4,715	7,650	-9,07	-0,79	5,29	151,54	130,85	20,737	-8,28
3-NA	0,5	-0,09	1,37	-3,13	1,28	4,698	7,650	-9,00	-0,86	6,30	154,72	131,40	24,637	-8,14
4-NA	0,5	-0,57	1,39	-3,13	1,28	4,698	7,650	-9,16	-0,70	7,64	154,77	131,38	21,651	-8,46
2-NT	0,5	-0,15	2,41	-3,76	1,30	4,715	7,665	-10,17	-1,01	5,04	157,83	138,59	18,918	-9,16
3-NT	0,5	-0,06	2,41	-3,76	1,30	4,698	7,665	-10,20	-1,02	5,44	161,31	139,38	17,593	-9,18
4-NT	0,5	-0,14	2,41	-3,76	1,30	4,698	7,665	-10,30	-1,05	5,73	161,33	139,38	17,253	-9,25
1,2-DNB	3	1,40	1,84	-5,04	1,48	5,626	9,210	-11,27	-1,99	7,35	162,33	141,77	43,122	-9,28
1,3-DNB	1	0,71	1,62	-5,04	1,48	5,609	9,210	-11,43	-1,91	4,84	167,38	142,88	33,132	-9,52
1,4-DNB	3	0,81	1,37	-5,04	1,48	5,609	9,210	-11,34	-2,21	0,00	167,45	142,90	33,289	-9,13
2,3-DNT	3	1,34	2,30	-6,28	2,04	6,037	10,203	-10,89	-1,71	7,92	184,65	160,91	31,776	-9,18
2,4-DNT	1	0,57	2,08	-6,28	2,04	6,020	10,203	-11,03	-1,84	5,43	183,72	160,62	26,196	-9,19
2,5-DNT	3	0,75	1,83	-6,28	2,04	6,020	10,203	-10,91	-2,13	0,81	183,91	160,33	26,741	-8,78
2,6-DNT	1	0,56	2,08	-6,28	2,04	6,037	10,203	-10,95	-1,75	3,68	181,27	159,93	30,109	-9,20
3,4-DNT	3	1,34	2,30	-6,28	2,04	6,020	10,203	-10,98	-1,80	8,32	186,58	161,16	30,480	-9,18
3,5-DNT	1	0,65	2,08	-6,28	2,04	6,003	10,203	-10,97	-1,84	5,33	187,20	161,07	25,300	-9,13
2,3-DNA	3	1,31	2,42	-5,65	2,02	6,037	10,163	-9,65	-1,72	8,67	172,25	151,37	42,584	-7,93
2,4-DNA	1	0,14	2,22	-5,65	2,02	6,020	10,163	-9,92	-1,47	7,26	177,42	152,50	25,419	-8,45
2,5-DNA	3	0,72	1,95	-5,65	2,02	6,020	10,163	-9,74	-1,93	2,58	177,45	152,55	28,542	-7,81
2,6-DNA	1	-0,08	2,66	-5,65	2,02	6,037	10,163	-9,82	-1,71	1,98	173,81	151,84	25,537	-8,11
3,4-DNA	3	1,31	1,98	-5,65	2,02	6,020	10,163	-9,75	-1,67	9,60	175,55	151,93	39,525	-8,08
3,5-DNA	1	0,02	1,74	-5,65	2,02	6,003	10,163	-9,69	-1,72	6,73	180,52	153,07	32,321	-7,97
1,2,3-TNB	5	2,11	1,66	-7,56	2,22	6,947	11,753	-12,07	-2,38	8,07	192,36	164,86	53,917	-9,69
1,2,4-TNB	5	1,52	1,19	-7,56	2,22	6,930	11,753	-11,99	-2,87	3,64	188,20	163,44	54,652	-9,12
1,3,5-TNB	3	1,42	1,22	-7,56	2,22	6,914	11,753	-12,25	-2,53	0,00	193,16	164,53	44,874	-9,72
2,3,4-TNT	5	1,97	2,12	-8,80	2,78	7,358	12,748	-11,58	-2,29	8,65	210,10	182,73	46,598	-9,29
2,3,5-TNT	5	1,46	1,65	-8,80	2,78	7,341	12,748	-11,56	-2,64	4,63	210,70	182,65	42,920	-8,92
2,3,6-TNT	5	1,37	1,65	-8,80	2,78	7,358	12,748	-11,54	-2,64	3,52	207,56	182,00	45,968	-8,90
2,4,5-TNT	5	1,37	1,65	-8,80	2,78	7,341	12,748	-11,60	-2,68	5,04	209,10	182,07	42,835	-8,92
2,4,6-TNT	3	1,28	1,68	-8,80	2,78	7,341	12,748	-11,70	-2,43	1,39	207,08	181,56	41,252	-9,27
3,4,5-TNT	5	2,05	2,12	-8,80	2,78	7,341	12,748	-11,56	-2,29	8,55	212,84	183,01	47,272	-9,27

Tab. 2 Pokračování

Sloučenina	I	$\Sigma\sigma$	$\log P$	$\Sigma E_S$	$\Sigma MR$	$\chi$	$\kappa$	$E_{HOMO}$ (eV)	$E_{LUMO}$ (eV)	$\mu$ (D)	S ( $\text{\AA}^2$ )	V ( $\text{\AA}^3$ )	$\frac{\Delta H_f}{(\text{kcal.mol}^{-1})}$	$E_{HOMO} - E_{LUMO}$ (eV)
2-A-3,4-DNT	3	1,17	2,88	-6,89	2,58	6,447	11,156	-9,68	-1,55	9,05	195,50	170,76	26,635	-8,13
2-A-3,6-DNT	3	0,57	2,41	-6,89	2,58	6,447	11,156	-9,61	-1,77	3,22	193,09	170,06	25,068	-7,84
2-A-4,5-DNT	3	1,17	2,44	-6,89	2,58	6,430	11,156	-9,70	-1,53	10,09	199,77	171,03	27,548	-8,17
3-A-2,4-DNT	1	-0,22	3,12	-6,89	2,58	6,447	11,156	-9,74	-1,59	2,83	191,84	169,70	19,590	-8,15
3-A-2,6-DNT	1	-0,01	2,68	-6,89	2,58	6,447	11,156	-9,83	-1,33	5,88	192,04	169,77	23,510	-8,50
3-A-4,5-DNT	3	1,25	2,88	-6,89	2,58	6,430	11,156	-9,73	-1,53	9,04	197,46	171,11	25,967	-8,20
4-A-2,3-DNT	3	1,16	2,88	-6,89	2,58	6,447	11,156	-9,58	-1,47	8,61	195,75	170,91	27,466	-8,11
4-A-2,5-DNT	3	0,57	2,41	-6,89	2,58	6,430	11,156	-9,49	-1,87	1,89	194,10	170,02	22,062	-7,62
4-A-2,6-DNT	1	0,47	2,20	-6,89	2,58	6,430	11,156	-9,66	-1,65	5,11	194,55	170,24	29,396	-8,01
2-A-3-NT	0,5	-0,85	2,29	-4,37	1,84	5,126	8,615	-8,98	-0,77	5,45	169,34	148,67	13,782	-8,21
2-A-4-NT	0,5	-0,23	1,83	-4,37	1,84	5,109	8,615	-9,17	-0,94	6,25	172,8	149,42	16,380	-8,23
2-A-5-NT	0,5	-0,63	1,85	-4,37	1,84	5,109	8,615	-9,17	-0,76	7,35	172,75	149,32	14,249	-8,41
2-A-6-NT	0,5	-0,24	1,83	-4,37	1,84	5,126	8,615	-9,11	-0,77	5,82	170,35	149,07	20,338	-8,34
3-A-4-NT	0,5	-0,93	2,29	-4,37	1,84	5,109	8,615	-9,02	-0,77	5,71	171,36	149,04	12,810	-8,25
4-A-2-NT	0,5	-0,24	1,83	-4,37	1,84	5,109	8,615	-9,06	-0,90	5,65	171,25	148,95	17,865	-8,16
4-A-3-NT	0,5	-0,85	2,29	-4,37	1,84	5,109	8,615	-8,90	-0,76	5,33	171,44	149,06	13,237	-8,14
2,3-DA-4-NT	0,5	-1,02	2,11	-4,98	2,38	5,537	9,568	-8,80	-0,82	6,02	182,57	159,24	14,626	-7,98
2,4-DA-3-NT	0,5	-1,64	2,21	-4,98	2,38	5,537	9,568	-8,53	-0,53	4,15	180,89	158,79	10,623	-8,00
2,4-DA-5-NT	0,5	-1,42	1,71	-4,98	2,38	5,520	9,568	-8,75	-0,51	6,99	182,78	158,97	9,849	-8,24
2,4-DA-6-NT	0,5	-0,33	1,29	-4,98	2,38	5,520	9,568	-8,77	-0,65	5,99	183,64	159,39	19,076	-8,12
2,5-DA-4-NT	0,5	-1,02	1,37	-4,98	2,38	5,520	9,568	-8,43	-0,79	5,68	183,29	159,28	13,601	-7,64
3,4-DA-2-NT	0,5	-1,03	2,11	-4,98	2,38	5,537	9,568	-8,65	-0,71	5,02	182,27	159,11	17,004	-7,94
4,5-DA-2-NT	0,5	-0,81	1,67	-4,98	2,38	5,520	9,568	-8,87	-0,80	6,12	184,31	159,35	15,368	-8,07
2-AT	0	-	1,40	-1,85	1,10	3,805	6,086	-8,44	0,60	1,56	146,83	127,73	13,178	-9,04
3-AT	0	-	1,40	-1,85	1,10	3,788	6,086	-8,47	0,61	1,51	148,63	128,03	13,004	-9,08
4-AT	0	-	1,40	-1,85	1,10	3,788	6,086	-8,06	0,79	1,42	148,64	127,87	13,995	-8,85
2,3-DAT	0	-	0,51	-2,46	1,64	4,215	7,033	-8,17	0,57	0,48	159,75	138,12	12,596	-8,74
2,4-DAT	0	-	0,15	-2,46	1,64	4,198	7,033	-8,12	0,71	0,71	160,15	138,08	11,573	-8,83
2,5-DAT	0	-	0,22	-2,46	1,64	4,198	7,033	-7,87	0,61	0,20	160,24	138,15	12,601	-8,48
2,6-DAT	0	-	0,15	-2,46	1,64	4,215	7,033	-8,24	0,69	2,66	157,98	137,82	14,180	-8,93
3,4-DAT	0	-	0,51	-2,46	1,64	4,198	7,033	-8,10	0,59	0,25	161,93	138,51	12,062	-8,69

Pro skupinu NT, DNT a TNT byla jako nejlepší nalezena následující jednoparametrová rovnice (2):

$$-\log EC_{50} = 0,503(0,048) \mathbf{I} - 2,237(0,160) \quad n = 15; r = 0,945; s = 0,341 \quad (2)$$

Čísla uvedené v závorkách představují standardní odchylky jednotlivých regresních parametrů,  $n$  je počet sloučenin zahrnutých do výpočtu,  $r$  korelační koeficient a  $s$  směrodatná odchylka.

Po rozšíření zpracovávaného souboru sloučenin o NB, DNB a TNB byla získána následující jednoparametrová rovnice:

$$-\log EC_{50} = 0,568(0,057) \mathbf{I} - 2,308(0,191) \quad n = 22; r = 0,911; s = 0,474 \quad (3)$$

Z dvouparametrových rovnic tuto závislost nejlépe popisuje kombinace proměnné  $\mathbf{I}$  a  $\mu$  nebo kombinace  $\mathbf{I}$  a  $\log P$ , rovnice (4) a (5).

$$-\log EC_{50} = 0,449(0,043) \mathbf{I} - 1,037(0,074) \log P \quad n = 22; r = 0,937; s = 0,413 \quad (4)$$

$$-\log EC_{50} = 0,584(0,050) \mathbf{I} - 0,093(0,034) \mu - 1,892(0,225) \quad n = 22; r = 0,937; s = 0,412 \quad (5)$$

Pro ADNT a aminonitrotolueny (ANT) byly nejvýznamnější dvouparametrové rovnice (6) a (7):

$$-\log EC_{50} = 0,327(0,051) \mathbf{I} - 0,083(0,026) \mu - 1,453(0,165) \quad n = 16; r = 0,879; s = 0,224 \quad (6)$$

$$-\log EC_{50} = 1,436(0,299) E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}} + 0,450(0,148) \log P + 9,178(2,519) \quad n = 16; r = 0,862; s = 0,238 \quad (7)$$

S ohledem na korelační koeficient a směrodatnou odchylku se nabízí i kombinace  $\mathbf{I}$  a  $E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$ , ale v tomto případě je nutno vzít v úvahu jistou kovarianci mezi těmito proměnnými.

Zahrnutím DANT do výpočtu se však stává tato kombinace nejlépe se hodící (pro nejvyšší korelačním koeficient a nejmenší směrodatnou odchylku ze všech dvouparametrových rovnic) k popisu účinku této skupiny látek, současně dojde k výraznému omezení vzájemné kovariance těchto proměnných, rovnice (8).

$$-\log EC_{50} = 0,897(0,228) E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}} + 0,184(0,044) \mathbf{I} + 5,587(1,866)$$

$$n = 23; r = 0,829; s = 0,219$$

(8)

Naopak po rozšíření této skupiny látek o NA a DNA zůstává nejlepší proměnnou  $\mathbf{I}$ , respektive její kombinace s  $\mu$ , rovnice (9).

$$-\log EC_{50} = 0,324(0,049) \mathbf{I} - 0,078(0,024) \mu - 1,455(0,157)$$

$$n = 25; r = 0,826; s = 0,267$$

(9)

Pokles vlivu dipólového momentu na toxicitu a vzrůst vlivu parametru  $E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$  je možno vysvětlit relativně snadnou oxidovatelností aminoskupin v ADNT a DANT, charakterizovanou právě parametrem  $E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$ . Naopak zahrnutí NA a DNA, které jsou z tohoto hlediska stabilnější, do výpočtu tuto korelaci narušuje a k popisu se opět nejlépe hodí parametry  $\mathbf{I}$  a  $\mu$ . Ještě více je toto patrné v případě velmi snadno oxidovatelných diaminotoluenů (DAT). Pro skupinu aminotoluenů (AT), DAT a DANT byla získána rovnice (10):

$$-\log EC_{50} = 1,337(0,171) E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}} + 9,237(1,448)$$

$$n = 15; r = 0,908; s = 0,299$$

(10)

Pro skupinu AT, DAT, DANT, ADNT a ANT pak rovnice (11):

$$-\log EC_{50} = 1,480(0,147) E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}} + 10,525(1,216)$$

$$n = 31; r = 0,882; s = 0,305$$

(11)

Pro všechny sloučeniny obsahující amino skupinu byla získána rovnice (12):

$$-\log EC_{50} = 1,429(0,163) E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}} + 10,131(1,350)$$

$$n = 40; r = 0,818; s = 0,362$$

(12)

Porovnání regresních koeficientů a směrodatných odchylek posledních tří rovnic rovněž ukazuje pokles závislosti toxicity na parametru  $E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$  spolu se zahrnutím hůře oxidovatelných sloučenin do výpočtů. Ve všech třech případech se parametr  $E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$  nejlépe hodí k popisu těchto závislostí. Použití víceparametrových rovnic ale naráží na jeho kolinearitu s ostatními proměnnými, popřípadě statistickou nevýznamnost jejich koeficientů.

Pro korelaci všech sloučenin (s výjimkou DANT, DAT a AT) byla nalezena následující tříparametrová rovnice (13):

$$-\log EC_{50} = 0,486(0,034) \mathbf{I} - 0,077(0,022) \boldsymbol{\mu} - 0,258(0,126) \log \mathbf{P} - 1,171(0,277) \\ n = 47; r = 0,922; s = 0,363 \quad (13)$$

Pro korelaci všech sloučenin (s výjimkou DAT a AT) byla nalezena tříparametrová rovnice (14):

$$-\log EC_{50} = 0,457(0,031) \mathbf{I} - 0,073(0,022) \boldsymbol{\mu} - 0,319(0,115) \log \mathbf{P} - 0,968(0,249) \\ n = 54; r = 0,911; s = 0,362 \quad (14)$$

Korelační matice nezávisle proměnných (parametrů) pro tuto skupinu sloučenin je uvedena v *Tab. 3*.

Téměř shodná rovnice byla nalezena pro hodnoty toxicit změřených v čase 30 minut (15):

$$-\log EC_{50} = 0,512(0,032) \mathbf{I} - 0,079(0,022) \boldsymbol{\mu} - 0,330(0,119) \log \mathbf{P} - 0,947(0,257) \\ n = 54; r = 0,922; s = 0,374 \quad (15)$$

*Tab. 3 Korelační matice parametrů pro všechny sloučeniny s výjimkou AT a DAT*

<b>r</b>	<b>I</b>	$\Sigma\sigma$	$\log P$	$\Sigma E_S$	$\Sigma MR$	${}^1\chi$	${}^1\kappa$	$E_{HOMO}$	$E_{LUMO}$	$\mu$	<b>S</b>	<b>V</b>	$\Delta H_f^\circ$	$E_H-E_L$
<b>I</b>	1,00	0,88	0,08	0,81	0,52	0,83	0,79	0,71	0,86	0,04	0,67	0,65	0,86	0,35
$\Sigma\sigma$		1,00	0,00	0,72	0,32	0,73	0,68	0,81	0,88	0,12	0,53	0,50	0,90	0,52
$\log P$			1,00	0,08	0,19	0,04	0,07	0,22	0,14	0,26	0,12	0,17	0,27	0,26
$\Sigma E_S$				1,00	0,84	0,99	0,99	0,62	0,81	0,07	0,94	0,94	0,69	0,23
$\Sigma MR$					1,00	0,83	0,88	0,11	0,39	0,03	0,95	0,96	0,28	0,23
${}^1\chi$						1,00	1,00	0,60	0,82	0,07	0,92	0,91	0,73	0,20
${}^1\kappa$							1,00	0,54	0,77	0,05	0,95	0,94	0,67	0,13
$E_{HOMO}$								1,00	0,89	0,22	0,37	0,34	0,84	0,86
$E_{LUMO}$									1,00	0,26	0,59	0,57	0,89	0,52
$\mu$										1,00	0,02	0,00	0,01	0,11
<b>S</b>											1,00	0,99	0,46	0,03
<b>V</b>												1,00	0,42	0,00
$\Delta H_f^\circ$													1,00	0,55
$E_H-E_L$														1,00

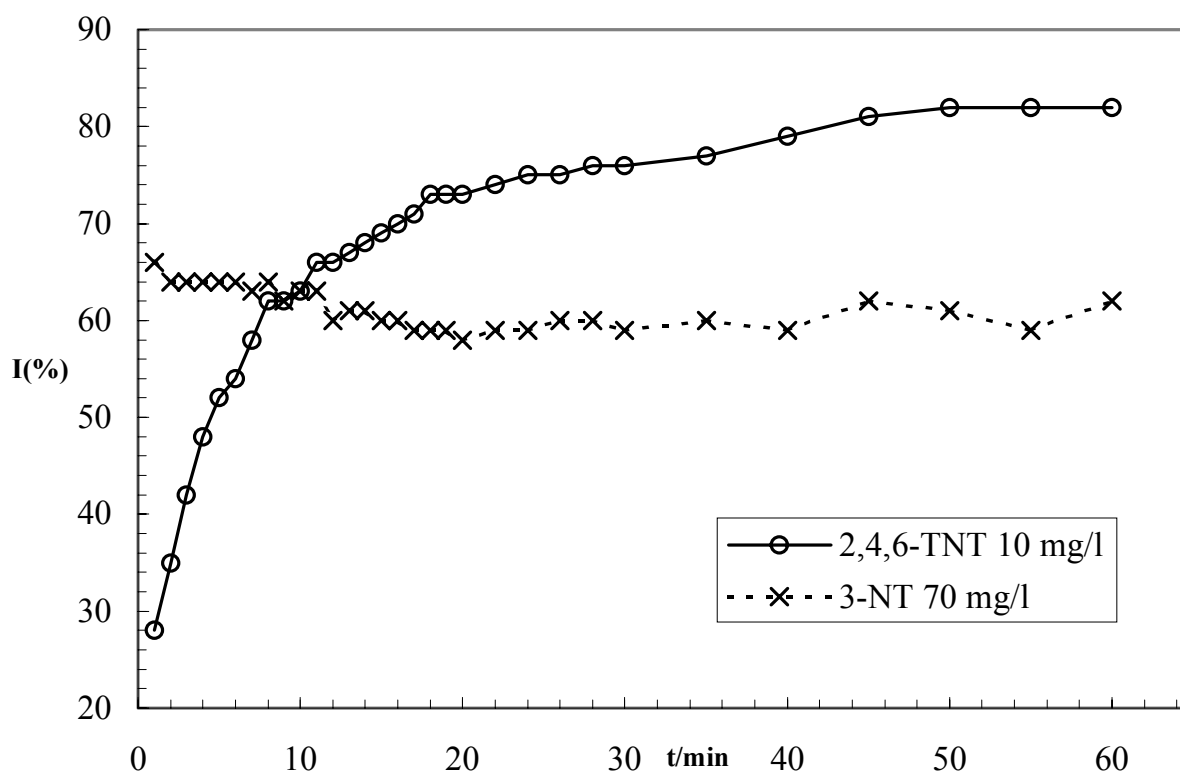
Z porovnání rovnic (6) až (9) vyplývá, že toxicita DANT, kterou lze spolu s ANT a ADNT popsat pomocí parametru  $E_{HOMO}-E_{LUMO}$ , může být popsána i pomocí parametrů **I**,  $\boldsymbol{\mu}$  a  $\log \mathbf{P}$ . Naopak rozšíření tohoto souboru látek o AT a DAT nevede k signifikantnímu výsledku. Z toho lze usuzovat, že těchto tří parametrů může být použito pouze pro sloučeniny obsahující nitroskupinu.

Malé rozdíly v parametrech rovnic (14) a (15) jsou způsobeny různou rychlostí účinku u jednotlivých sloučenin na bakterie, jak ukazuje příklad na *Obr. 2*. Zatímco inhibice 3-NT byla po celou dobu měření zhruba konstantní, u TNT docházelo k jejímu růstu a za konstantní ji lze považovat až od cca 30 minut. Z těchto důvodů lze považovat rovnici (15) za nadřazenou rovnici (14). Měření v delších časových intervalech již však výrobce bakterií nedoporučuje. Malé rozdíly mezi parametry těchto rovnic rovněž svědčí o tom, že bakterie nebyly v průběhu měření ovlivňovány vnějšími vlivy.

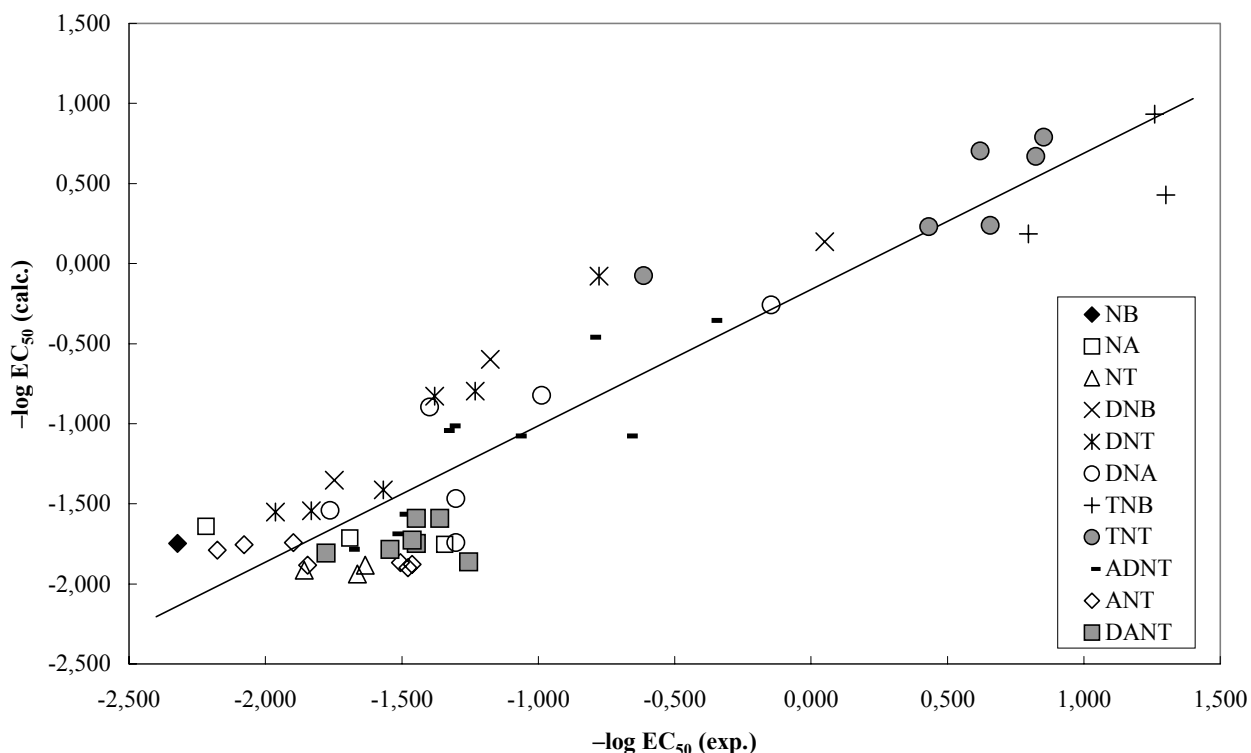
Na základě získaných rovnic (14) a (15) byly vypočteny teoretické hodnoty  $-\log EC_{50}$  a porovnány s hodnotami naměřenými (*Obr. 3*). Získané výsledky ukazují, že rovnice (14) a (15) popisují toxicitu studovaných sloučenin s dostatečnou přesností. Body jsou rozptýleny podél celé regresní přímky a nejedná se tedy např. o dvě samostatné skupiny sloučenin. Rovněž se v souboru nevyskytují výrazně odlehlé body, které by bylo nutno vyloučit.

Rovněž byly vypočteny hodnoty toxicit pro ty ADNT a DANT, jejichž experimentální stanovení není možné vzhledem k jejich nízké rozpustnosti, nebo ty, které nebyly z důvodu nízkého obsahu odpovídajících asymetrických trinitrotoluenů v reálných výbušninách (kapitola 2.1) připraveny. Předpověď hodnot  $-\log EC_{50}$  je uvedena v *Tab. 4*.

*Obr. 2* Závislost inhibice bakterií na čase



Obr. 3 Závislost vypočtených a experimentálních hodnot  $-\log EC_{50}$  pro čas 15 minut



Tab. 4 Vypočtené hodnoty toxicit některých ADNT a DANT

Sloučenina	I	log P	$\mu$ (D)	$-\log EC_{50}$	
				15 min.	30 min.
2-A-3,5-DNT	1	2,68	7,57	-1,92	-1,92
2-A-4,6-DNT	1	2,20	6,82	-1,71	-1,70
3-A-2,5-DNT	3	2,41	1,73	-0,49	-0,34
4-A-3,5-DNT	1	3,12	2,34	-1,68	-1,65
5-A-2,3-DNT	3	2,44	9,67	-1,08	-0,98
5-A-2,4-DNT	1	2,68	7,47	-1,91	-1,91
6-A-2,3-DNT	3	2,44	10,01	-1,11	-1,01
2,3-DA-5-NT	0,5	1,67	6,50	-1,75	-1,76
2,3-DA-6-NT	0,5	1,67	6,37	-1,74	-1,75
2,5-DA-3-NT	0,5	1,37	5,74	-1,60	-1,60
2,6-DA-3-NT	0,5	1,77	7,06	-1,82	-1,83
2,6-DA-4-NT	0,5	1,29	6,90	-1,65	-1,66
3,4-DA-5-NT	0,5	2,11	5,63	-1,82	-1,83
3,5-DA-2-NT	0,5	1,77	6,45	-1,77	-1,78
3,5-DA-4-NT	0,5	2,21	4,54	-1,78	-1,78
3,6-DA-2-NT	0,5	1,37	4,98	-1,54	-1,54

Porovnáním těchto vypočtených hodnot s experimentálními výsledky obdobných sloučenin uvedenými v Tab. 1 je patrné, že ADNT a DANT, jejichž toxicity není

možno stanovit zapadají do strukturně podobných skupin a získané QSAR rovnice lze s výhodou použít pro odhad jejich toxicit.

Velký význam parametru **I** prakticky ve všech rovnicích potvrzuje, že toxicita studovaných sloučenin závisí v největší míře na počtu a vzájemné elektronové interakci přítomných nitroskupin. Jejich celkový substituční efekt se projevuje i v případech testování toxicit těchto látek na jiných organismech [24, 26]. Naopak v případě koncových produktů redukce, tedy hlavně DAT a DANT ztrácí na významu a výrazněji se projevují redukčně-oxidační vlastnosti NO<sub>2</sub> / NH<sub>2</sub> skupin, charakterizované rozdílem energií  $E_{\text{HOMO}}-E_{\text{LUMO}}$  (rovnice 10 až 12). Jelikož v případě samotného dipólového momentu signifikantní závislost neexistuje a do regresních rovnic se  $\mu$  zapojuje až v přítomnosti parametru **I** (rovnice 5, 6, 9, 12, 14 a 15), lze soudit, že koriguje parametr **I**, který má relativně úzký interval. Tyto dva parametry zřejmě souvisejí s polárními interakcemi elektrostatického charakteru studovaných látek se strukturou buněčných receptorů. Rozdělovací koeficient **log P** (rovnice 13 až 15) pak charakterizuje hydrofobní interakce studovaných látek, tj. snadnost jejich průniku buněčnou membránou.

## 6 ZÁVĚR

V rámci práce bylo v prvním kroku syntetizováno 28 nitroaromatických sloučenin k doplnění série 34 komerčně dostupných chemikálií, které byly použity pro studium toxicit trinitrotoluenů a produktů jejich biotransformací. Dvě syntetizované sloučeniny, 2,4-diamino-3-nitrotoluen (2,4-DA-3-NT) a 2,3-diamino-4-nitrotoluen (2,3-DA-4-NT), byly připraveny poprvé.

V druhé fázi práce pak byly určeny toxicity  $-\log EC_{50}$  celkem 62 sloučenin pomocí bioluminiscenčních bakterií *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 na luminometru ToxAlert<sup>®</sup> 10 (MERCK). Jelikož ne u všech látek bylo možno z důvodů nízké rozpustnosti toxicitu stanovit, byly provedeny pokusy o zvýšení jejich rozpustnosti přidávkem detergentů a sacharidů, jehož efekt se ovšem neprojevil očekávaným způsobem. Bylo zjištěno, že toxicita měřených sloučenin je dominantně závislá na počtu a vzájemné pozici jednotlivých nitroskupin. Přítomnost methylu a aminoskupiny nemá jak jednoznačný, tak podstatný vliv na toxicitu nitroaromatických sloučenin. Naopak velmi významným faktorem se ukázala být redukční transformace přítomných nitroskupin na aminoskupiny, tj. absolutní pokles počtu nitroskupin v molekule během biologické transformace. Jako nejvíce toxické nitroaromatické sloučeniny byly nalezeny 1,3,5-TNB a asymetrické trinitrotolueny (2,3,4-TNT, 2,4,5-TNT, 2,3,5-TNT, 2,3,6-TNT a 3,4,5-TNT). S poklesem počtu nitroskupin za současného nárůstu aminoskupin toxicita kontinuálně klesá a nejnižší toxicitu vykazují DAT a AT, tj. sloučeniny neobsahující žádnou nitroskupinu.

V poslední části práce byla provedena QSAR analýza získaných výsledků za použití široké škály fyzikálně-chemických parametrů. Bylo použito celkem 14 různých deskriptorů, od běžně užívaných parametrů až po molekulární indexy



získané kvantově-chemickými výpočty. Získané QSAR vztahy prokázaly, že toxicity souboru nitroaromatických sloučenin neobsahujících aminoderiváty dominantně korelují s parametrem **I**, který implicitně postihuje elektronové efekty vázaných nitroskupin v závislosti na jejich počtu a vzájemné poloze. Po rozšíření souboru o nitroaromatické aminoderiváty byl jako druhý signifikantní regresní parametr nalezen dipólový moment  $\mu$  a při dostatečně velkém stupni volnosti byl jako třetí parametr nalezen rozdělovací koeficient **log P**. Tato trojice parametrů byla úspěšně použita i pro korelace s ostatními sloučeninami kromě DAT a AT, jejichž toxicita úzce souvisí s oxido-redukčními vlastnostmi, vyjádřenými parametrem  $E_{\text{HOMO}}-E_{\text{LUMO}}$ .

Nalezené QSAR vztahy poskytují prakticky využitelné závislosti mezi strukturou a toxicitou aromatických nitroderivátů a jejich transformačních produktů.

## 7 LITERATURA

1. Yinon J.: *Toxicity and Metabolism of Explosives*; s. 3–21, CRC Press, Boca Raton 1990; ISBN 0-8493-5128-6.
2. Lenke, H.; Achtnich, C.; Knackmuss, H.-J.: Perspectives of bioelimination of polyaromatic compounds. In: *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives* (Spain, J. C.; Hughes, J. B.; Knackmuss, H.-J.; Eds.). s. 91–126, Lewis Publisher; New York 2000; ISBN 1-56670-522-3.
3. Kaplan D. L. in: *Organic Energetic Compounds* (Marinkas, P. L., Ed.), s. 373–416, Nova Sci. Pubs., Commack (NY) 1996; ISBN 1-56072-201-0.
4. Newcombe, D. A.; Crawford, R. L.: Degradation of energetic compounds by fungi. In: *Fungi in Bioremediation* (Gadd, G. M., Ed.). s. 224–241, Cambridge University Press, Cambridge 2001; ISBN 0-521-78119-1.
5. Landsberger, W.: Einige Abkömmlinge des *o*-Tolunitrils. *Chem. Ber.*, **1898**, 31, 2880.
6. Bellamy F. D.: Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25 (8) 839–842.
7. Pesin, V. G.; Muravnik, R. S.: 2,1,3-Thia- and -selenadiazole, XXVI. Halogenation and nitration. *Latv. PSR. Zinat. Akad. Vestis Khim. Ser.*, **1964**, 725–742; *Chem. Abstr.*, **1965**, 63, 4279.
8. Tian, W.; Grivas, S.: A useful methodology for the synthesis of 2-methyl-4-nitrobenzimidazoles. *Synthesis*, **1992**, 12 (12), 1283–1286.
9. Cupps, T. L.; Bogdan, S. E.: Preparation of 5-(2-imidazolidinylideneamino)-benzimidazoles as  $\alpha$ 2-adrenergic agonists. PCT Int. Appl. WO 95 16685 A1, *Chem. Abstr.*, **1995**, 124, 8813.
10. Kafka, Z.; Punčochářová, J.: Bioindikátory v monitoringu životního prostředí. *Chem. Listy*, **2000**, 94, 909–912

11. Matoušek, J.; Manová, J.; Válková, P.: Biotransformation of some organic energetics and toxicity of product in aquatic environment. *Chem. Listy*, **2002**, 96, S 285–286.
12. Manová, J.; Válková, P.: Biodegradace aromatických nitrosloučenin a využití bioluminiscence při stanovení toxicity rozpadových látek; *Soutěž studentské tvůrčí činnosti Student FCH 2001*, Sborník příspěvků; 28–32, VUT Brno, FCH, **2001**; ISBN 80-214-1932-6.
13. Sunahara, I. G.; Dodard, S. G.; Sarrazin, M.; Paquet, L.; Ampleman, G.; Thiboutot, S.; Hawari, J.; Renoux, Y. A.: Development of a soil extraction procedure for ecotoxicity characterization of energetic compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **1998**, 39, 185–194.
14. Dodard, S. G.; Renoux, Y. A.; Hawari, J.; Ampleman, G.; Thiboutot, S.; Sunahara, I. G.: Ecotoxicity characterization of dinitrotoluenes and some of their reduced metabolites. *Chemosphere*, **1999**, 38 (9) 2071–2079.
15. Sunahara, I. G.; Dodard, S. G.; Sarrazin, M.; Paquet, L.; Hawari, J.; Greer, C. V.; Ampleman, G.; Thiboutot, S.; Renoux, Y. A.: Ecotoxicological characterization of energetic substances using a soil extraction procedure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **1999**, 43, 138–148.
16. Johnson, R. L.; Davenport, R.; Balbach, H.; Schaeffer, D. J.: Phototoxicology. 2. Near-ultraviolet light enhancement of Microtox assays of trinitrotoluene and aminodinitrotoluenes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **1994**, 27, 23–33.
17. Yuan, X.; Lu, G.; Lang, P.: QSAR study of the toxicity of nitrobenzenes to river bacteria and *Photobacterium phosphoreum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1997**, 58, 123–127.
18. Manuál k přístroji ToxAlert<sup>®</sup> 10 firmy MERCK, verze 1.0.
19. Bluth, B. J.; Frew, S. E.; McNally, B.: *Cell-Cell Communication and the lux operon in Vibrio fischeri*, Pittsburgh: Department of Biological Sciences, Carnegie Mellon University, [cit. 20.11.2003]. Dostupný z:   
<<http://www.bio.cmu.edu/courses/03441/TermPapers/97TermPapers/lux/>>
20. Kuchař, M.; Rejholec, V.: *Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou*; Academia, Praha 1987.
21. ACDLabs, ACD/log P DB v. 7.00, Advanced Chemistry Development, Toronto 2003.
22. TITAN v. 1.0.8, Wawefunction, Schrödinger, USA, 2001.
23. Svobodová, Z.; Machová, J.; Beklová, M.; Supáková, Š.; Minks, J.: Testy toxicity na organizmech vodního prostředí. *Ekotoxikologie – praktická cvičení*, část 1., 24–30, VFU Brno, 2000.
24. Lang, P.; Ma, X.; Lu, G.; Wang, Y.; Bian, Y.: QSAR for the acute toxicity of nitro aromatics to the carp (*Cyprinids cardio*). *Chemosphere*, **1996**, 32 (8) 1547–1552.
25. Picka, K.; Friedl, Z.: Phytotoxicity of some toluene nitroderivatives and products of their reduction. *Fresenius Environ. Bull.*, **2004**, 13 (8) 789–794.

26. Hall, L. H.; Maynard, L. E.; Kier, L. B.: QSAR investigation of benzene toxicity to fathead minnow using molecular connectivity. *Environ. Toxicol. Chem.*, **1989**, *8*, 783–788.
27. Pytela, O.; Liška, J.: Chemometrical analysis of substituent effects. 5. Ortho effect. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1994**, *59* (9) 2005–2021.
28. Exner, O.: *Correlation Analysis of Chemical Data*, Plenum Press, New York 1988; ISBN 0-306-41559-3.
29. Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D.: *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*; ACS, Washington 1995; ISBN 0-8412-2987-2.

## 8 ABSTRACT

The study of toxicity of trinitrotoluenes and potential products of their biotransformation, aminodinitrotoluenes (ADNT) and diaminonitrotoluenes (DANT), respectively, was accomplished on a series of 22 derivatives, when some of these compounds were subsequently synthesized. In addition toxicity of altogether 40 dinitrobenzenes (DNB), trinitrobenzenes (TNB), nitroanilines (NA), dinitroanilines (DNA), nitrotoluenes (NT), dinitrotoluenes (DNT), aminonitrotoluenes (ANT), diaminotoluenes (DAT), toluidines (AT) and nitrobenzene (NB) was evaluated.

The toxicity of all compounds was tested on the bioluminescence bacteria *Vibrio Fischeri* NRRL B-11177 using luminometer ToxAlert 10<sup>®</sup> (MERCK). The obtained values of toxicity, expressed as effective concentration EC<sub>50</sub>, were treated by QSAR analysis using multiple regression analysis. Linear QSAR equations for biological activity were found depending on

$$-\log EC_{50} = 0,457(0,031) \mathbf{I} - 0,073(0,022) \boldsymbol{\mu} - 0,319(0,115) \mathbf{\log P} - 0,968(0,249) \\ (\text{time 15 min}); n = 54; r = 0,911; s = 0,362$$

$$-\log EC_{50} = 0,512(0,032) \mathbf{I} - 0,079(0,022) \boldsymbol{\mu} - 0,330(0,119) \mathbf{\log P} - 0,947(0,257) \\ (\text{time 30 min}); n = 54; r = 0,922; s = 0,374$$

variables characterizing number and mutual position of nitro groups **I**, dipole moment  **$\mu$**  and partition coefficient octanol/water  **$\log P$** .

The evaluated QSAR equations are suitable in practice to describe and/or predict the toxicity of aromatic nitro compounds.

## **PŘÍLOHA A – Curriculum vitae**

### **Osobní údaje**

JMÉNO A PŘÍJMENÍ: Ing. Karel Bednařík

DATUM A MÍSTO NAROZENÍ: 24. listopadu 1975, Frýdek-Místek

NÁRODNOST: Česká

STAV: Svobodný

RODIČE:

Matka: Jiřina Bednaříková, rozená Jarotková, narozena 1950

Otec: Karel Bednařík, narozen 1947, zemřel 1998

### **Vzdělání**

Gymnázium Petra Bezruče ve Frýdku-Místku

1990–1994

VUT Brno, Fakulta chemická

1994–2000

Studium DSP na VUT Brno, Fakultě chemické

2000–dosud

### **Zaměstnání**

Technický pracovník – technické zajišťování praktických úloh z organické chemie v rámci praktických cvičení pro 2. ročník, na FCH VUT Brno

2004–dosud

## **PŘÍLOHA B – Seznam publikací**

Bednařík K.; Friedl Z.: Synthesis of aromatic nitrocompounds relating to biodegradation of isomeric trinitrotoluenes. In: *Chem. Listy*, (2002) 96, S 260 ISSN 0009-2770

Bednařík K.; Friedl Z.: Synthesis of aromatic nitrocompounds relating to biodegradation of isomeric trinitrotoluenes. In: *Soutěž studentské tvůrčí činnosti Student FCH 2002, Sborník příspěvků*, (2003) 196 ISBN 80-214-2347-1

Bednařík K.; Friedl Z.: Toxicity of trinitrotoluenes and products of their biotransformations; In: *Soutěž studentské tvůrčí činnosti Student FCH 2003, Sborník příspěvků*, (2004) 182-185 ISBN 80-214-2599-7

Bednařík K.; Friedl Z.: Toxicity of trinitrotoluenes and products of their biotransformations. In: *Proc. SETAC Europe 14<sup>th</sup> Annu. Meeting*, p. 274. SETAC Europe Brussels, Prague, April 2004

Bednařík K.; Friedl Z.: Toxicity of toluene polynitro derivatives and products of their biotransformation: A QSAR study. In: *Fressenius Environ. Bull.*; rukopis v redakci