

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



**Helena Hrušková**

Využití moderních analytických metod pro studium vybraných koordinačních  
sloučenin boru

Application of modern analytical methods for the study of selected boron coordination  
compounds

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Ivan Jelínek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Martin Štícha, Ph.D.

Praha 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 1. května 2019.

Podpis:

### **Poděkování:**

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu doc. Ivanu Jelínkovi za vstřícnost a cenné rady během vypracovávání diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi panu RNDr. Martinovi Štíchovi za veškerou ochotu moji práci konzultovat a za rady, které mi k tématu poskytl.

## Abstrakt

Tato práce je zaměřena na studium koordinačních sloučenin boru, konkrétně komplexu boru s pyrogallolovým a 2,3-dihydroxynaftalenovým ligandem, které mohou sloužit jako potenciální farmaka pro léčbu rakovinných onemocnění.

V úvodní části práce jsou diskutovány vlastnosti borových sloučenin, jejich příprava, možnosti separace pomocí kapilární elektroforézy a způsoby strukturní charakterizace.

V první části práce jsou diskutovány způsoby přípravy komplexů a pro každý komplex byla zvolena optimální reakce z hlediska výtěžnosti. Výsledné produkty byly studovány pomocí hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením.

Ve druhé části práce jsou důkladněji popsány jednotlivé struktury komplexů včetně jejich modelování v programu Gaussian. Komplexy byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Dále byly komplexy studovány pomocí  $^{11}\text{B}$ ,  $^1\text{H}$  a  $^1\text{H}$  COSY NMR a IR spektroskopie.

Třetí část práce je zaměřena na separaci těchto sloučenin ze směsi po reakci. Pro separaci byly využity techniky CE-UV a CE-MS. Separační metoda byla vyvíjena v mravenčnanových pufrech, které jsou kompatibilní s oběma přístroji. Pomocí CE-UV byla také sledována rovnováha mezi komplexy a ligandy v roztocích.

Zvláštní kapitolou je studium oxidace pyrogallolu pomocí UV-VIS spektrometrie a CE-UV. Pomocí těchto technik byla popsána kinetika rozpadu pyrogallolu v bazických mravenčnanových pufrech.

## Klíčová slova:

bor, mravenčnanový pufr, koordinační sloučeniny, hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance, infračervená spektroskopie, kapilární elektroforéza, oxidace pyrogallolu

## **Abstract**

This thesis is focused on the study of boron coordination compounds, specifically boron pyrogallol and 2,3-dihydroxynaphthalene ligand complexes.

In the introductory part of the work are discussed the properties of boron compounds, their preparation, the possibility of separation by capillary electrophoresis and methods of structural characterization.

In the first part of the thesis, the methods of preparation of complexes are discussed and for each complex the optimal yield response is chosen. The resulting products were studied by low resolution mass spectrometry.

In the second part of the thesis, structures of complexes, including their modeling in the Gaussian program, were described more precisely. Furthermore, the complexes were characterized by high resolution mass spectrometry. The complexes were also studied by  $^{11}\text{B}$ ,  $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$  COSY NMR and IR spectroscopy.

The third part was devoted to the separation of these substances from the mixture after the reaction. CE-UV and CE-MS techniques were used for this purpose. To convert the results, the separation method was developed in ammonium formate buffers that are compatible with both instruments. The equilibration between complexes and ligands was also monitored by CE-UV.

A special chapter is the study of pyrogallol autooxidation by UV-VIS and CE-UV. Using these techniques, the kinetics of pyrogallol disintegration in basic formate buffers have been described.

## **Keywords:**

boron, formate buffer, coordination compounds, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy, capillary electrophoresis, pyrogallol oxidation

## Obsah:

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b><u>TEORETICKÝ ÚVOD</u></b>                               | <b>12</b> |
| <b>1.1</b> | <b>SLOUČENINY BORU A JEJICH VYUŽITÍ</b>                     | <b>12</b> |
| 1.1.1      | VÝZNAM A REAKTIVITA SLOUČENIN BORU                          | 12        |
| 1.1.2      | ARYLSPIROBORÁTY, INTERAKCE BORU S DIOLY                     | 13        |
| 1.1.3      | NEUTRONOVÁ ZÁCHYTOVÁ TERAPIE                                | 14        |
| 1.1.4      | BOROVÁ NEUTRONOVÁ ZÁCHYTOVÁ TERAPIE (BNCT)                  | 15        |
| 1.1.5      | CÍLENÁ NÁDOROVÁ TERAPIE                                     | 16        |
| 1.1.6      | SLOUČENINY BORU PRO BNCT                                    | 17        |
| 1.1.7      | VYUŽITÍ ARYLSPYROBORÁTŮ PŘI LÉČBĚ RAKOVINNÝCH ONEMOCNĚNÍ    | 19        |
| 1.1.8      | OXIDACE PYROGALLOLU   | 19        |
| <b>1.2</b> | <b>ZPŮSOBY ANALÝZY SLOUČENIN BORU</b>                       | <b>20</b> |
| 1.2.1      | MOŽNOSTI ANALÝZY METALOLÉČIV POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY | 20        |
| 1.2.2      | SROVNÁNÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S HPLC                     | 22        |
| 1.2.3      | VÝVOJ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S HMOTNOSTNÍ DETEKČÍ          | 23        |
| 1.2.4      | SPŘAŽENÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY S HMOTNOSTNÍ DETEKČÍ       | 23        |
| 1.2.5      | TYPY ROZHRANÍ PRO SPŘAŽENÍ CE S MS TECHNIKOU                | 24        |
| 1.2.6      | HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE BOROVÝCH SLOUČENIN                 | 25        |
| 1.2.7      | NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE                              | 26        |
| 1.2.8      | INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE, VIBRACE B-O VAZBY               | 27        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>2</b>   | <b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>  | <b>28</b> |
| <b>2.1</b> | <b>CHEMIKÁLIE</b>   | <b>28</b> |
| <b>2.2</b> | <b>METODY PŘÍPRAVY KOMPLEXŮ BORU</b>  | <b>28</b> |
| 2.2.1      | POSTUPY PŘÍPRAVY KOMPLEXU BORU S PYROGALOLEM [B(PG) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                       | 28        |
| 2.2.2      | POSTUPY PŘÍPRAVY KOMPLEXU BORU S 2,3-DIHYDROXYNAFTALENEM [B(DHN) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>          | 31        |
| <b>2.3</b> | <b>INSTRUMENTACE A PODMÍNKY MĚŘENÍ</b>  | <b>33</b> |
| <b>2.4</b> | <b>PŘÍPRAVA ROZTOKŮ</b>   | <b>36</b> |
| <b>2.5</b> | <b>DALŠÍ EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY</b>   | <b>39</b> |
| <b>2.6</b> | <b>VÝPOČTY A VYHODNOCENÍ EXPERIMENTÁLNÍCH DAT</b>   | <b>41</b> |
| <b>3</b>   | <b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>   | <b>46</b> |
| <b>3.1</b> | <b>MODELOVÁNÍ STRUKTUR KOMPLEXŮ BORU A PREDIKCE JEJICH IR SPEKTER</b>                                 | <b>46</b> |
| 3.1.1      | MODELOVÁNÍ STRUKTUR KOMPLEXŮ [B(PG) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> A [B(DHN) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> | 46        |
| 3.1.2      | PREDIKCE IR SPEKTER POMOCÍ PROGRAMU GAUSSIAN  | 48        |
| <b>3.2</b> | <b>VÝBĚR POSTUPŮ PŘÍPRAVY BOROVÝCH KOMPLEXŮ</b>   | <b>50</b> |
| 3.2.1      | VYHODNOCENÍ JEDNOTLIVÝCH POSTUPŮ:   | 50        |
| <b>3.3</b> | <b>STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE KOMPLEXŮ BORU</b>  | <b>54</b> |
| 3.3.1      | CHARAKTERIZACE SLOUČENIN BORU POMOCÍ HRMS   | 54        |
| 3.3.2      | CHARAKTERIZACE SLOUČENIN BORU POMOCÍ NMR  | 59        |
| 3.3.3      | CHARAKTERIZACE SLOUČENIN BORU POMOCÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRIE                                       | 63        |
| <b>3.4</b> | <b>SEPARACE KOMPLEXŮ BORU ZE SMĚSI PRODUKTŮ REAKCE POMOCÍ CE</b>                                      | <b>65</b> |
| 3.4.1      | OVĚŘENÍ VLASTNOSTÍ NOSNÝCH ELEKTROLYTŮ O HODNOTÁCH PH V ROZMEZÍ 3,6 - 10,1                            | 65        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.4.2      | VZOROVÁ SEPARACE SLOUČENIN POMOCÍ CE-UV                             | 75        |
| 3.4.3      | STABILITY A ROVNOVÁHY KOMPLEXŮ A NEZREAGOVANÝCH LIGANDŮ V ROZTOCÍCH | 77        |
| <b>3.5</b> | <b>KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA S HMOTNOSTNÍ DETEKČÍ</b>                 | <b>80</b> |
| <b>3.6</b> | <b>STUDIUM OXIDACE PYROGALLOLU</b>                                  | <b>81</b> |
| 3.6.1      | SLEDOVÁNÍ OXIDACE PYROGALLOLU POMOCÍ UV-VIS ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE | 82        |
| 3.6.2      | SLEDOVÁNÍ OXIDACE PYROGALLOLU POMOCÍ CE-UV                          | 84        |
| <b>4</b>   | <b><u>ZÁVĚR</u></b>   | <b>86</b> |
| <b>5</b>   | <b><u>LITERATURA</u></b>  | <b>88</b> |



## Seznam použitých zkratek:

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| ABCHC                               | 1-aminocyklobutankarboxylová kyselina                                      |
| ABCPC                               | 1-amino-3-borocyklopentankarboxylová kyselina                              |
| ABNS                                | akcelerátory na bázi neutronového zdroje                                   |
| ACN                                 | acetonitril  |
| [B(DHN) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> | komplex boru s 2,3-dihydroxynaftalenem                                     |
| BNCT                                | borová neutronová záchytová terapie  |
| BPA                                 | 4-dihydroxyborylfenylalanin  |
| BSH                                 | merkaptoundekahydrododekaborát sodný                                       |
| [B(PG) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>  | komplex boru s pyrogallolem  |
| CEC                                 | kapilární elektrochromatografie  |
| CE-FT-ICR-MS                        | kapilární elektroforéza spřažená s iontovým cyklotronem                    |
| CE-MS                               | kapilární elektroforéza s hmotnostní detekcí                               |
| CE-UV                               | kapilární elektroforéza s UV detekcí                                       |
| CGE                                 | kapilární gelová elektroforéza   |
| CIEF                                | kapilární izoelektrická fokusace   |
| CID                                 | kolizně indukovaná disociace   |
| COSY                                | korelační spektroskopie  |
| C(Z)E                               | kapilární (zónová) elektroforéza   |
| DNA                                 | deoxyribonukleová kyselina   |
| EOF                                 | elektroosmotický tok   |
| ESI                                 | ionizace elektrosprejem  |
| FTIR                                | infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací                      |
| HPLC                                | vysokoúčinná kapalinová chromatografie                                     |
| HRMS                                | hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením                              |
| IR                                  | infračervená spektroskopie   |
| LRMS                                | hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením                               |
| MALDI                               | hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice |
| MEKC                                | micelární elektrokinetická kapilární                                       |

|        |  |
|--------|--|
|        | elektrochromatografie  |
| MS     | hmotnostní spektrometrie   |
| MS/MS  | 2D hmotnostní spektrometrie  |
| NACE   | kapilární elektroforéza v nevodném prostředí                                   |
| NCT    | neutronová záchytová terapie   |
| NMR    | nukleární magnetická rezonance   |
| QQQ    | trojitý kvadrupól  |
| q-TOF  | kvadrupól-průletový analyzátor   |
| THF    | tetrahydrofuran  |
| TOF    | průletový analyzátor   |
| UV-VIS | spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti<br>elektromagnetického záření |

## Cíle práce:

Tato diplomová práce si klade za cíl rozšířit znalosti o komplexech boru zvaných arylspiroboráty. Konkrétně se jedná o komplexní sloučeniny boru s pyrogallolem a s 2,3-dihydroxynaftalenem.

Dílní cíle diplomové práce jsou následující:

- Optimalizace způsobů přípravy a izolace komplexů v pevné fázi
- Modelování struktur připravených komplexů a predikčních IR spekter pomocí programu Gaussian
- Detailní charakterizace struktury komplexů pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, nukleární magnetické rezonance a infračervené spektrometrie
- Charakterizace nosných elektrolytů s kyselinou mravenčí a amoniakem pro použití v CE-MS
- Vývoj separační metody pro separaci připravených komplexů v reakční směsi a izolovaných z roztoku. K tomuto účelu budou techniky CE-UV a CE-MS. Podmínky separace budou optimalizovány tak, aby byla zajištěna jejich převoditelnost mezi oběma přístroji. Pomocí CE-UV budou podrobněji studovány rovnováhy komplexů a ligandů v roztocích a sledována kinetika probíhajících reakcí.
- Studium oxidace pyrogallolu v bazických roztocích s pomocí UV-VIS absorpční spektrometrie a CE-UV, jako významné konkurenční reakce při přípravě komplexu boru s pyrogallolem

# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1 Sloučeniny boru a jejich využití

### 1.1.1 Význam a reaktivita sloučenin boru

Významnost sloučenin boru zejména kyseliny borité a jejich derivátů v posledních letech stoupá. Například kyselina boritá je důležitým intermediátem, který je běžně užíván v Suzukiho reakcích, jako chránící skupina diolů, v Diels-Alderových reakcích, asymetrických syntézách aminokyselin, selektivní redukci aldehydů a borové neutronové zachytové terapii<sup>1</sup>.

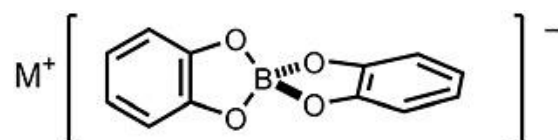
Většina kyselin a esterů boru je na vzduchu stabilní a ve většině reakčních podmínek, až na několik výjimek, lze tyto sloučeniny považovat za poměrně stálé. Alifatické kyseliny boru a jejich estery vykazují tendenci oxidovat se více než aryl a alkenyl deriváty. Tyto sloučeniny jsou také náchylné k deboronaci při styku s kyselinami, nukleofily a oxidanty kvůli prázdnému p-orbitálu boru<sup>2</sup>.

Analogicky s karboxylovými kyselinami vznikne nahrazením alkoxy nebo aryloxy skupiny ester. Ztrátou vodíkové vazby a donorového potenciálu hydroxylových skupin jsou estery kyselin méně polární a snadněji se s nimi pracuje. Také mohou sloužit jako chránící skupiny pro zmírnění reaktivity bor-uhlíkové vazby<sup>3</sup>. Acyklické estery boru jsou náchylné k hydrolyze, kdežto cyklické estery boru jsou více stálé.

Na rozdíl od karboxylových kyselin se kyseliny boru nechovají jako Brønstedovské kyseliny ale jako slabé Lewisovské kyseliny. Tyto sloučeniny a jejich estery jsou slabšími Lewisovskými kyselinami než borany kvůli interakci volného elektronového páru na atomech kyslíku s volným p-orbitalem boru. Ve vodě se tyto sloučeniny ionizují na borátový aniont a hydroxoniový iont. Hodnota  $pK_a$  těchto sloučenin ve vodě závisí nepřímo na jejich Lewisovské kyselosti. Obvykle se  $pK_a$  pro kyseliny boru pohybuje mezi 4,0 až 10,5. Estery těchto kyselin mívají  $pK_a$  vyšší než jejich kyseliny asi o 2-4 jednotky<sup>2</sup>.

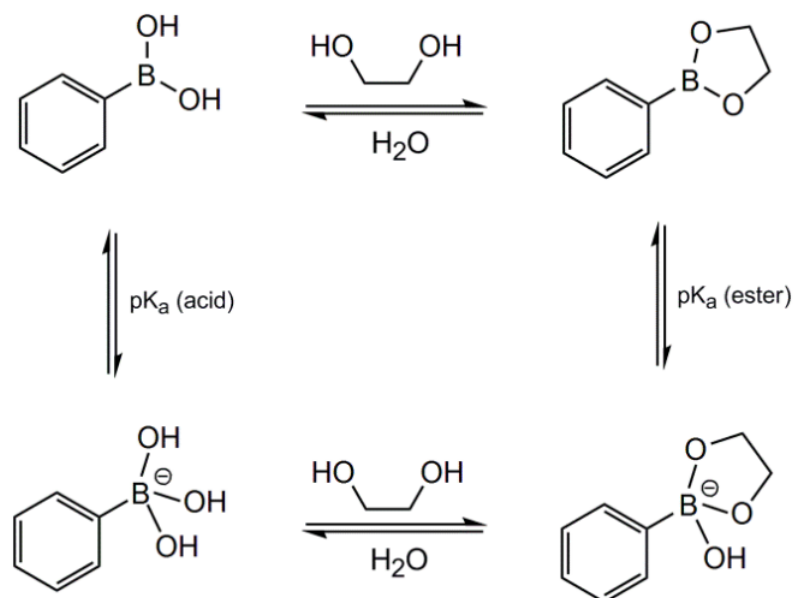
## 1.1.2 Arylspiroboráty, interakce boru s dioly

Arylspiroboráty jsou pozoruhodnou skupinou sloučenin boru obsahující dva ligandy odvozené od katecholu vázané na centrální atom boru. Jsou obvykle netoxické, tepelně, chemicky a elektrochemicky stabilní. Nejjednodušším arylspiroborátem je komplex se dvěma katecholovými ligandy, který znázorňuje obrázek 1<sup>4,5</sup>.



Obrázek 1: Komplexní sloučenina boru se dvěma katecholovými ligandy<sup>6</sup>

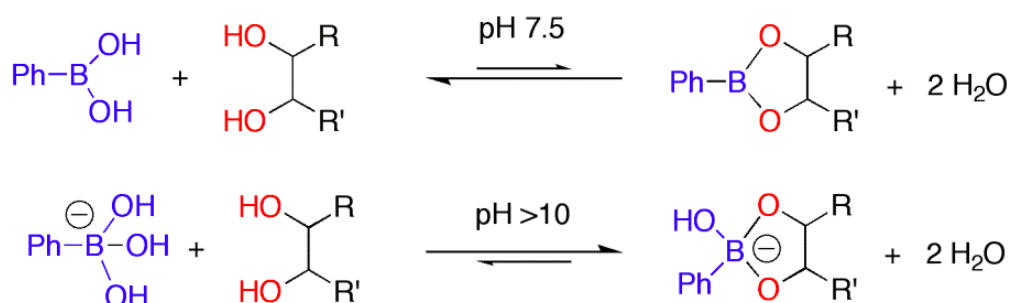
Samotný bor je silnou Lewisovskou kyselinou neboť spadá mezi systémy s otevřenou elektronovou slupkou<sup>1</sup>. Kyselina boritá je pak známá svou velkou afinitou k sloučeninám obsahujícím diol přes reverzibilní tvorbu esteru, jehož stabilita je závislá na pH a rozpouštědle<sup>7</sup>. Interakce mezi kyselinou fenylboritou a diolem ve vodných roztocích je zobrazena na obrázku 2.



Obrázek 2: Mnohonásobné rovnováhy v roztocích kyseliny fenylborité a diolu<sup>8</sup>

Reverzibilní a kovalentní povaha interakcí mezi kyselinami boru a dioly byla ve vodném prostředí intenzivně studována. První studie interakce mezi kyselinami boru a

polyalkoholy byla provedena v roce 1959 Lorandem a Edwardsem. Tato studie zjistila, že v roztocích o vysokém pH je upřednostňována tvorba esteru. Toto chování ve srovnání s neutrálními podmínkami je připisováno uvolnění napětí úhlu při tvorbě hydroxyesteru a tedy rehybridizaci boru z  $sp^2$  na  $sp^3$  konfiguraci<sup>9</sup>. Tvorba esteru není upřednostňována v oblasti fyziologického pH a v silně kyselém prostředí k ní vůbec nedochází<sup>8</sup>. Rovnováhy v roztocích kyseliny fenyloborité a diolu při různém pH znázorňuje obrázek 3. Reakce bývají velmi citlivé na strukturu a stereochemii konkrétního diolu. Například 1,2-dioly se váží na bor lépe než 1,3-dioly, tetrahydrofurany lépe než tetrahydropyrany a *cis* dioly reagují lépe než *trans* nebo jednoduché acyklické dioly. V nepolárních rozpouštědlech se estery boru chovají jako neutrální, zatímco ve vodě tvoří záporně nabitě ionty<sup>9</sup>.



Obrázek 3: Posuny rovnováh při interakci boru s dioly v neutrálním a bazickém prostředí<sup>8</sup>

### 1.1.3 Neutronová záchyťová terapie

Neutronová záchyťová terapie (NCT) je termín užívaný pro léčbu zářením generovaným díky záchyťové reakci termálních neutronů různými jádry. Tato energie je použita pro selektivní destrukci tkáně, zejména k ničení maligních nádorů. Cílem terapie je vymýcení nádorových buněk, jejichž přesná lokace v organismu nemusí být zcela známa a mohou způsobovat recidivu nádoru. Běžné radiační procedury takovou selektivitu neposkytují. Jsou založeny na předpokladu, že maligní buňky jsou citlivější na radiační záření než buňky zdravé. Tento předpoklad však není vždy splněn a mnoho nádorových buněk je rezistentních jak vůči chemoterapii, tak i radioterapii.

NCT je založena na schopnosti nuklidů určitých prvků absorbovat tepelné nebo pomalé neutrony<sup>10</sup>. Jako zdroje neutronů se používají nukleární reaktory a zdroje založené na akceleratoru ABNS (accelerator-based neutron sources) nebo například cyklotrony. Zdroj

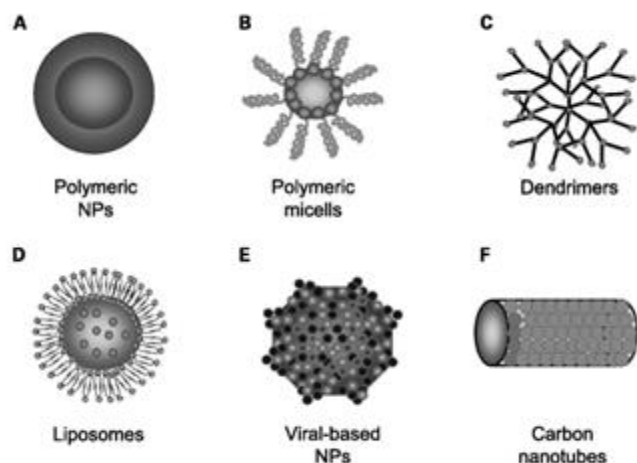
musí být schopen regulovat průtok neutronů a jejich energii<sup>11</sup>. Emitované záření obsahuje částice s vysokým lineárním přenosem energie. Tyto částice mají krátký dolet a jejich energie je rozložena podél krátké dráhy. Díky velikosti a energii těchto částic působí radiační záření pouze uvnitř buňky. Zdravá tkáň tak může při správném zacílení léčiva zůstat nepoškozená. Jednou z největších výzev NCT je chemický design léčiva. Je třeba syntetizovat látky, které svou strukturou dokáží léčivo zacílit výhradně na poškozenou tkáň. Výzkum je převážně zaměřen na sloučeniny boru jehož neradioaktivní izotop  $^{10}\text{B}$  má unikátní schopnost tvořit stabilní sloučeniny s chemickými a fyzikálními vlastnostmi analogickými jejich uhlíkovým protějškům<sup>10</sup>.

#### **1.1.4 Borová neutronová záchyťová terapie (BNCT)**

Velkou výhodou boru oproti ostatním nuklidům je jeho malá velikost, a tedy možnost synteticky napodobovat uhlíkaté analogy nahrazením atomu uhlíku atomem boru v uhlíkatém skeletu. Borová neutronová záchyťová terapie je založena na schopnosti  $^{11}\text{B}$  rozpadat se na  $^7\text{Li}$  a emitovat alfa částice v důsledku ozáření neutrony. Alfa částice destrukují tkáň pouze na velmi krátkou vzdálenost, což je pro radioterapii výhodné, neboť poškozují téměř výhradně nádorovou buňku - jsou to ideální částice pro lokalizovanou radiační terapii. Úspěšná aplikace BNCT vyžaduje vývoj sloučenin boru, které transportují významnější množství  $^{10}\text{B}$  přímo do cílových buněk<sup>1</sup>. Mechanismus BNCT je znázorněn na obrázku 4.







Obrázek 5: Nanonosiče pro transport léčiv v organismu<sup>15</sup>

Tyto úpravy mohou zvyšovat specifickou selektivitu, stabilitu případně bioaktivitu léčiva<sup>16</sup>. Design léčiva se odvíjí od koordinační sféry kovu. Kovový iont poskytuje mnoho možností, jak jemně ladit koordinační sféru kovu. Kromě lineární a planární geometrie se nabízí i možnost uspořádání do tvaru tetraedru, pyramidy, trigonální bipyramidy a oktaedru. S rostoucím počtem substituentů kolem kovového středu se zvyšuje i počet možných stereoisomerů. Kromě koordinační sféry kovového iontu lze modifikovat i samotné ligandy. Způsob modifikace se pak odvíjí od konkrétního cíle v organismu.

Přestože se ligandová výměna probíhající v organismu často považuje za mechanismus účinku léku, konečnou účinnou látkou je pouze kovový iont. Pokud je koordinační sféra kovu designována s ohledem na prostředí v organismu, kovový iont je schopen účastnit se biologických redoxních reakcí a přecházet mezi jednotlivými oxidačními stavy. Pro některá potenciální léčiva může přechod mezi oxidačními stavy znamenat přeměnu na účinnou specii kovu, která se dokáže specificky vázat na cílovou biomolekulu (např. DNA)<sup>17</sup>.

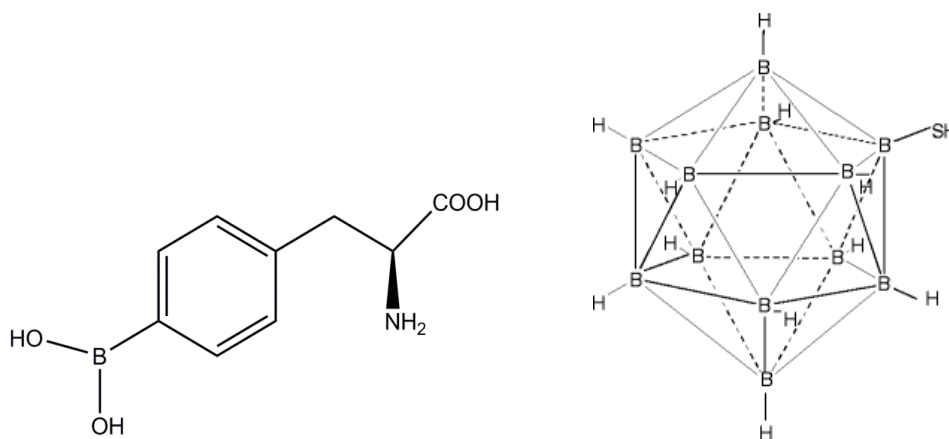
### 1.1.6 Sloučeniny boru pro BNCT

Nejdůležitější požadavky pro BNCT léčiva jsou nízká vnitřní toxicita (vůči zdravé tkáni), vysoká absorpce nádoru a nízká absorpce tkáně nejlépe s poměrem koncentrace boru nádor:normální tkáň a nádor:krev vyšším než 3:1. Dalším požadavkem může být schopnost těla relativně rychle odstranit látku z krve a zdravé tkáně. Látko však ale musí být schopna

přetrvat v nádorové tkáni alespoň několik dalších hodin během ozařování neutrony<sup>18</sup>. Existují celkem tři generace sloučenin boru, které využívá BNCT.

První generace odvozená od kyseliny borité a jejích derivátů. Poprvé byly tyto sloučeniny vyvíjeny a testovány v 50. a 60. letech minulého století, jakožto elementární sloučeniny však nevykazovaly správnou distribuci v tkáních.

Sloučeniny druhé generace BPA (4-dihydroxyborylfenylalanin) a BSH (merkaptoundekahydrododekaborát sodný) vykazovaly nižší toxicitu a byly schopné přetrvat v nádorech testovaných zvířat delší dobu ve srovnání s první generací léčiv<sup>11</sup>. BPA a BSH bylo klinicky testováno roku 1988 převážně k léčbě pacientů s kožními maligními melanomy a BPA-fruktóza byla užita k léčbě glioblastomy (maligní nádorové onemocnění mozku), přičemž poměr koncentrací v nádoru a v mozku byl vyšší než 1. Od té doby je BPA-fruktóza nejběžněji užívaným klinickým léčivem pro kraniální nádory<sup>19</sup>. Sloučeniny jsou znázorněny na obrázku 6.



Obrázek 6: Sloučeniny druhé generace pro BNFT – BPA (vlevo) a BSH (vpravo)<sup>20</sup>

Snaha zlepšit selektivitu léčiv se u třetí generace léčiv rozvinula především v zapouzdřování boru do nádorově cílených nosičů jako jsou aminokyseliny, polyaminy, peptidy, proteiny, nukleosidy, cukry, porfyriny, lipozomy a nanočástice. Mezi nízkomolekulární látky používané jako borové nosiče patří přírodní aminokyseliny i borové deriváty dalších aminokyselin jako je kyselina aspartová, tyrosin, cystein, methionin a serin. Některé zcela nově syntetizované aminokyseliny byly studovány také kvůli jejich vyšší metabolické stabilitě ve srovnání s přírodními aminokyselinami. Příkladem takovýchto aminokyselin můžou být například borové deriváty kyseliny 1-aminocyklobutankarboxylové (ABCHC) a 1-amino-3-borocyklopentankarboxylové (ABCPC). Vyšší nádorovou koncentraci

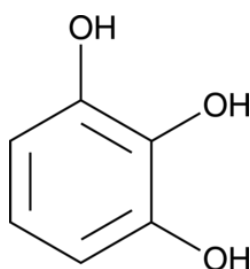
a poměr koncentrace sloučeniny boru nádor:mozek bylo dosaženo s ABCPC, ale poměr koncentrací nádor:krev byly srovnatelné s BPA<sup>18</sup>.

### 1.1.7 Využití arylspiroborátů při léčbě rakovinných onemocnění

Arylspiroboráty byly testovány ve třech různých modelech zhoubného karcinomu ledvin. Toxicita těchto sloučenin vůči nádorovým buňkám byla sledována v ledvinné tkáni. Buněčná tkáň projevila citlivost na kontrolní sloučeninu NBu<sub>4</sub>[Bcat<sub>2</sub>]. Gallolové deriváty amonných solí protinádorovou aktivitu neprokázaly. Důležité je však pozorování, že v normálních buňkách ledvin nebyla zachycena žádná významná úroveň cytotoxicity. NBu<sub>4</sub>[Bcat<sub>2</sub>] selektivně cílil pouze na rakovinné buňky, zatímco zdravé zůstaly neporušené. Tento objev je pozoruhodný, jelikož dosavadní protinádorová léčiva jako je cisplatina vykazují nedostatek specifity a interagují i se zdravými buňkami nebezpečnými způsoby se značným množstvím vedlejších účinků<sup>21</sup>.

### 1.1.8 Oxidace pyrogallolu

Pyrogallol neboli benzen-1,2,3-triol je za laboratorních podmínek bílý krystalický prášek a silné redukční činidlo. Poprvé byl připraven v roce 1786 zahříváním kyseliny gallové. Dalším způsobem přípravy této sloučeniny může být zahřívání para-chlorfenoldisulfonové kyseliny s hydroxidem draselným<sup>22</sup>. Struktura pyrogallolu je znázorněna na obrázku 7.

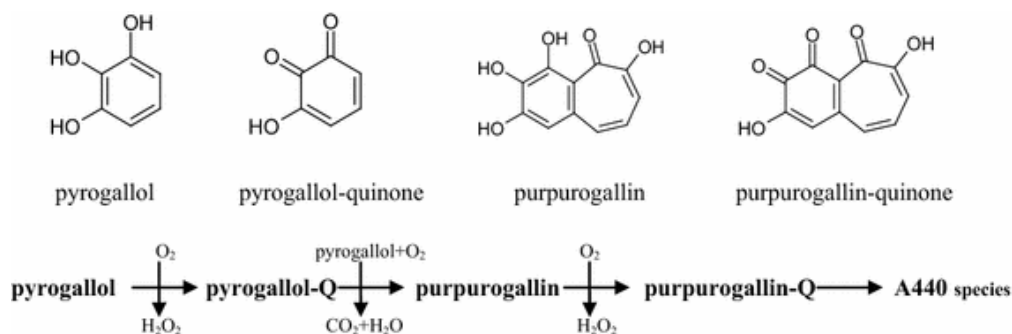


Obrázek 7: Struktura pyrogallolu<sup>23</sup>

Rozklad pyrogallolu v bazickém prostředí v důsledku oxidace pyrogallolu vzdušným kyslíkem za současné tvorby více barevných produktů již byl popsán ve více člancích. Mechanismus reakce je však poměrně komplikovaný, a ne vždy se články shodují

na jednotlivých reakčních krocích. V literatuře<sup>23</sup> je popisována oxidace pyrogallolu zejména pomocí spektrometrických metod. Dle této studie zahrnuje mechanismus reakce pravděpodobně několik oxidačních kroků, z nichž ne všechny koncentrace meziproduktů jsou detekovatelné<sup>23</sup>.

Dle literatury<sup>24</sup> vznikají jako okamžité produkty autooxidace pyrogallolu pyrogallol-ortho-chinon a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jako jeden z produktů reakce se může vyskytovat purpurogallin - bicycklý produkt pyrogallolu a jeho ortho-chinon. Tyto látky však nejsou jedinými ani terminálními produkty reakce a netvoří se během pomalých oxidací v homogenních systémech. Pyrogallol tedy může reagovat v bazických roztocích za tvorby purpurogallinu s absorpčním maximem 325 nm, následně se tvoří modré specie, které jsou považovány za dianion chinonu purpurogallinu (absorpční maximum kolem 600 nm) a přecházejí na sloučeniny s absorpčním maximem 440 nm - konečný produkt pyrogallolového rozkladu<sup>24</sup>. Předpokládaný mechanismus oxidace pyrogallolu je znázorněn na obrázku 8.



Obrázek 8: Předpokládaný mechanismus autooxidace pyrogallolu<sup>24</sup>

## 1.2 Způsoby analýzy sloučenin boru

### 1.2.1 Možnosti analýzy metaloléciv pomocí kapilární elektroforézy

Je obecně známo, že proces vytváření nového léku, zahrnující i chemoterapeutika a metaloléciva je náročný a málo účinný. Jeho produkce farmaceutickými společnostmi je záležitost enormně drahá a samotný vývoj nového léčiva (od výzkumného počátku až

po vypuštění léčiva na trh) může trvat desetiletí<sup>25</sup>. Nové léčivo musí projít několika fázemi od vývoje a navrhnutí designu přes klinické testy až po schválení příslušnými institucemi a uvedení na trh<sup>26</sup>. Kvůli množství a komplikovanosti dostupných dat je nutné, aby schopnost zpracovat signál a samotná analýza držely krok s vývojem léčiv.

Z těchto poznatků vyplývá, že je nezbytně nutné rozšiřovat spektrum analytických technik. Složitost vzorků, která u chemoterapeutik (metaloléciv, radioterapeutik) může zahrnovat obsah anorganických, organických a biologických látek, podléhajících různým metabolickým procesům a ligandovým výměnám, klade na analytické metody zvláštní požadavky.

Základní schopností analytické metody je schopnost oddělit a změřit jednotlivé specie kovu a separovat je od ostatních komponent, přičemž by metoda měla být co nejméně citlivá na biologickou matici<sup>25</sup>. Kapilární elektroforéza vykazuje velmi dobré vlastnosti pro studium reaktivity a stability potenciálních léčiv obsahujících specie kovů v biologických systémech<sup>27</sup>. Anorganické specie lze analyzovat s detekčními limity v řádech pikogramů v relativně jednoduchých nosných elektrolytech<sup>28</sup>.

Mezi mnohé aplikace kapilární elektroforézy spadá i charakterizace a hodnocení stability komplexních sloučenin kovů s bioaktivními ligandy, dále popis kinetiky a rovnováhy těchto sloučenin v metabolických procesech a jejich charakterizace přímo v matici (v tělních tekutinách). Vhodná kombinace této separační metody s prvkově a molekulově specifickými hmotnostními spektrometry zvýšila významnost kapilární elektroforézy jako nástroje v biochemické speciální analýze<sup>25</sup>. Zatímco počáteční aplikace kapilárních elektroforetických metod pro analýzu léčiv byla zaměřena převážně na protirakovinné sloučeniny platiny, v posledních letech se pole působnosti techniky CE poměrně rozšířilo a bylo provedeno množství nových studií pro sloučeniny Ru, Sb, Gd etc. s potenciálními terapeutickými účinky. Výzkum byl zaměřen na vazebnou kinetiku, speciaci a optimalizaci designu léčiva se snahou lépe pochopit vlastnosti připravovaných sloučenin kovů<sup>26</sup>.

Velmi dobře lze kapilární elektroforézy využít při sledování stability metaloléciv. Jakmile je sloučenina aplikována do organismu, začne podléhat metabolickým přeměnám a může docházet k ligandové výměně, případně k hydrolyze. Produkt přeměny může být separován CE od primární specie díky odlišnému poměru velikosti náboje ku velikosti molekuly. Kromě toho může být monitorována i samotná kinetika přeměny sloučeniny, a to pomocí integrace ploch píků původní sloučeniny a produktu (hydrolytické) přeměny v závislosti na čase<sup>25</sup>.

Monitorování kinetiky hydrolyzy již bylo provedeno například u sloučenin platiny(II)<sup>29-31</sup>, ruthenia(III)<sup>32,33</sup> a titanu (IV)<sup>34</sup>. Měření bylo provedeno za použití fyziologických podmínek. V případě platiny se jednalo o separaci tzv. cisplatiny cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] od produktů hydrolytické reakce této sloučeniny [PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup> a [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> pomocí kapilární zónové elektroforézy a micelárního elektrolytu. Hlavní produkt [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> byl pomocí CE kvantifikován v krevním séru. Jednou z dalších možných metabolických cest metaloléciv může být i jejich redoxní přeměna v důsledku přítomnosti některých redukčních činidel v tělních tekutinách (např. kyselina askorbová nebo glutathion). Pomocí CE byla dokázána konverze ruthenia(III) na ruthenium(II) specie vlivem působení kyseliny askorbové<sup>25</sup>.

### 1.2.2 Srovnání kapilární elektroforézy s HPLC

V medicínských aplikacích poskytuje CE několik výhod oproti běžně rozšířenému systému HPLC. CE systémy lze poměrně snadno ovládat, není nutné pracovat s velkými množstvími organických rozpouštědel. CE vykazuje i lepší kompatibilitu při měření za fyziologických podmínek. Vykazuje vynikající rozlišovací schopnosti při separaci směsí obsahujících různě nabitě formy metalokomplexů. Velká výhoda spočívá i v kratší době analýzy: pravděpodobnost, že během průchodu CE systémem dojde k nechtěným reakcím složek vzorku, je nižší<sup>25</sup>. Je aplikovatelná v mnoha různých separačních módech, které jsou určeny typem užitého pufru. CZE zůstává nejběžněji užívanou technikou, často se užívají i micelární elektrokinetická chromatografie, kapilární gelová elektroforéza, kapilární isoelektrická fokusace a další. Nevýhodou tradičního uspořádání CE-UV je obvykle nízké rozlišení pro strukturně příbuzné složky vzorku. V případě analýzy komplexů to může být problém pro specie vznikající ligandovou výměnou a oxidací, která běžně poskytuje velký počet strukturně blízkých produktů<sup>35</sup>. Ve spojení s MS detektorem můžeme získat přímou informaci o molekulární struktuře a (v případě vysokého rozlišení) kvantitativní informaci s ohledem na prvkové složení. Vzhledem k tomu, že nejběžněji užívané kovy v léčivech nejsou v organismu přítomny přirozeně, můžeme provádět poměrně citlivou analýzu biologických vzorků<sup>36</sup>.

CE-MS stále trpí nedostatkem robustnosti, která tuto metodu limituje při validaci vyvinutých metod pro rutinní použití. Nejběžnější komerční realizace propojení kapilární elektroforézy s hmotnostním detektorem využívá rozhraní s připojením stínící kapaliny,

platinovou zemnicí elektrodu a soustavu koncentrických kapilár zajišťující rozprášení kapalné fáze před vstupem do hmotnostního spektrometru<sup>26,37</sup>.

### 1.2.3 Vývoj kapilární elektroforézy s hmotnostní detekcí

O první spřažení kapilární elektroforézy s hmotnostním detektorem se pokusila výzkumná skupina R.D. Smithe, přičemž první článek o úspěšné aplikaci této metody publikovali v roce 1987<sup>38,39</sup>. V prvním CE-MS experimentu sloužila jako mobilní fáze směs voda-methanol. Testovací vzorek obsahoval pět organických kvarterních amonných solí, které v hmotnostním spektru poskytly velmi zřetelné nedeformované signály. V experimentu byla využita křemenná kapilára, ionizace elektrosprejem a kvadrupólový hmotnostní spektrometr<sup>40,41</sup>.

### 1.2.4 Spřažení kapilární elektroforézy s hmotnostní detekcí

Kapilární elektroforéza spřažená s hmotnostní spektrometrií kombinuje separaci v důsledku rozdílů v hodnotách elektroforetických mobilit jednotlivých analytů s poskytnutím strukturních informací z hmotnostního spektrometru. V jedné analýze je možné sloučeniny s vysokou účinností separovat a zároveň získat informaci o jejich struktuře, molekulové hmotnosti, elementárním složení a případně i fragmentačním mechanismu<sup>42,43</sup>.

V praxi je CE-MS složeno z vlastní kapilární elektroforézy, rozhraní spojujícího obě techniky a hmotnostního detektoru. Rozhraní pro kapilární elektroforézu s hmotnostní detekcí je konkurenčně odvozeno z techniky LC-MS, s přihlédnutím k odlišnostem obou separačních technik. Běžně se průtoky v CE pohybují v rozsahu 0 až 100 nl/min zatímco v LC se jedná o 100 – 500  $\mu$ l/min, což může způsobovat obtíže (např. nestabilitu iontového zdroje). Pro CE systém je tedy důležité udržet rychlost průtoků kapaliny při přenosu analytu z výstupu kapiláry do vstupu sprejovací kapiláry. Pro řešení problémů s průtokovou nekompatibilitou se často používá stínící kapalina, která navíc slouží i pro zajištění vodivého spojení konce separační kapiláry se zemnicí elektroforetickou elektrodou<sup>38,44</sup>.

Kapilární elektroforézu lze spojit s prakticky libovolným typem hmotnostního spektrometru. Lze měřit jak v nízkém rozlišení (iontová past, kvadrupól)<sup>45</sup>, tak ve vysokém rozlišení (iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací, průletový hmotnostní spektrometr)<sup>46,47</sup>. Za nejlepší volbu z hlediska rozlišení a přesnosti se považuje

právě CE-FT-ICR-MS, jeho nevýhodou jsou však vysoké pořizovací náklady a nižší četnost sběru dat<sup>48,49</sup>.

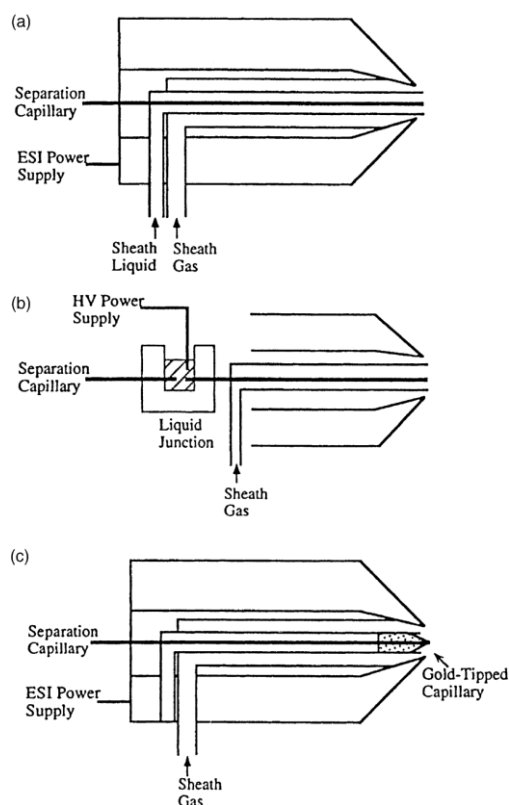
### 1.2.5 Typy rozhraní pro spřažení CE s MS technikou

Byly popsány tři základní typy rozhraní (viz obrázek 9) pro spojení CE s hmotnostním spektrometrem. Jedná se o rozhraní s přídavnou kapalinou, rozhraní s kapalinovým spojem a rozhraní bez přídavné kapaliny<sup>50</sup>.

- **Rozhraní s přídavnou kapalinou**

V praxi je nejběžnější spojení přes rozhraní s přídavnou kapalinou. Rozhraní je znázorněno na obrázku 9(a). V tomto uspořádání je separační kapilára umístěna koaxiálně do kapiláry větších rozměrů, která uzavírá vodivý okruh. Vodivá stínící kapalina, na kterou je vloženo napětí elektrospreje, proudí touto vnější trubicí a mísí se se základním elektrolytem vytékající na výstupu z CE kapiláry. Obvykle se užívá i plynu, který protéká třetí kapilárou a usnadňuje tvorbu spreje v elektrosprejovém zdroji<sup>51</sup>. Význam stínící kapaliny spočívá jednak v uzavření vodivého obvodu a dále ve zvýšení průtoku kapaliny a vytvoření stabilního elektrospreje<sup>52</sup>. Nedávno vyvinuté nízkoprůtokové rozhraní zpochybnilo doposud zastávaný názor o vlivu zředění analytu stínící kapalinou na dosažitelnou citlivost analýzy. Zdá se, že na citlivost má mnohem větší vliv účinnost ionizace při přenosu analytu do MS přístroje. Přestože účinnost ionizace je odhadována v optimálním případě až na 20 %, při běžném provedení obvykle nepřekročí 1 %. Dalším důležitým aspektem ovlivňujícím citlivost detekce je kvalita ESI emitoru daná úpravou konce separační kapiláry - předpokladem pro tvorbu stabilního a symetrického kužele rozprášené kapaliny je úzký, symetrický a hydrofobní výstup kapiláry<sup>53</sup>.





Obrázek 9: Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem: (a) rozhraní s přidávanou kapalinou (b) rozhraní s kapalinovým spojením (c) rozhraní bez přidávané kapaliny<sup>54</sup>

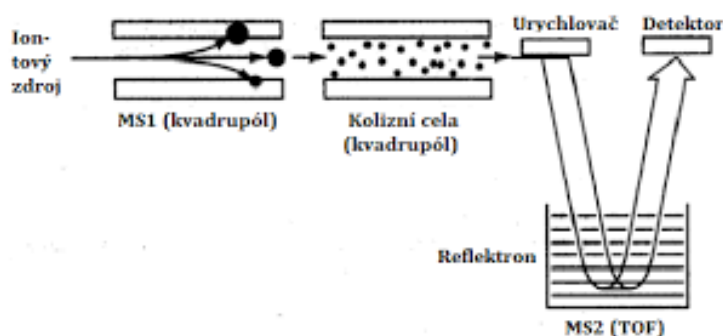
## 1.2.6 Hmotnostní spektrometrie borových sloučenin

Bor je lehký prvek a má dva izotopy  $^{10}\text{B}$  a  $^{11}\text{B}$  s procentuálním zastoupením v přírodě 19,9 % a 80,1 %. V roztocích existuje ve dvou formách – jako trigonální kyselina boritá a tetraedrální borátový anion  $\text{B}(\text{OH})_4^-$ . Trigonální forma je upřednostňována v kyselých roztocích a je více obohacena  $^{11}\text{B}$ , zatímco anion  $\text{B}(\text{OH})_4^-$  je více obohacen  $^{10}\text{B}$ . Tento jev je způsoben rozdíly ve vibračních frekvencích obou izotopů a molekulárním koordinačním stavem v roztocích borových specií. Při běžném měření hmotnostních spekter je však tento rozdíl zcela zanedbatelný a nezjistitelný<sup>55</sup>.

Nejdůležitějším parametrem při výběru vhodné kombinace hmotnostních spektrometrů při tandemové hmotnostní spektrometrii bývá obvykle rozlišovací schopnost spektrometru a přesnost měření v každém stupni hmotnostní analýzy. Spektrometr q-TOF kombinuje skenovací schopnosti kvadrupólu s rozlišovacími možnostmi TOF analyzátoru. Umožňuje

i spektroskopická měření s dlouhým interakčním časem<sup>56,57</sup>. Kritickým parametrem pro výběr spektrometrů může být i kinetická energie použitá pro CID v závislosti na tom, jaké spektrální informace potřebujeme. Zásadní může být rychlost analýzy – mnoho MS/MS přístrojů bylo vyvinuto pro rychlou hmotnostní analýzu s vysokou skenovací frekvencí kvůli předřazení separačního kroku<sup>58,59</sup>.

Jednou z největších výhod q-TOF analyzátoru je možnost jednoduchého propojení s ionizačními technikami ESI a MALDI. Dalšími výhodami q-TOF přístrojů je snadná manipulace, vysoké rozlišení, vysoká přesnost měření a asi stonásobné zvýšení citlivosti v porovnání s trojitým kvadrupólem QqQ. Nicméně QqQ přístroje jsou vhodnější pro kvantitativní studie a také pro skenování prekurzorového iontu, ve kterých lze rozeznat charakteristický profil iontu ze specifické fragmentace<sup>56</sup>. Hybridní přístroj q-TOF je znázorněn na obrázku 10.



Obrázek 10: Schématické znázornění tandemového hmotnostního spektrometru q-TOF<sup>60</sup>

## 1.2.7 Nukleární magnetická rezonance

Existují dva stabilní izotopy boru  $^{10}\text{B}$  a  $^{11}\text{B}$  s přírodním zastoupením 19,6 % a 81,4 %. Oba izotopy mají magnetické momenty, tudíž vykazují charakteristickou NMR absorpci.  $^{11}\text{B}$  izotop se pro NMR prokázal jako užitečnější z několika důvodů.  $^{11}\text{B}$  signály jsou intenzivnější díky jeho většímu zastoupení v přírodě.  $^{11}\text{B}$  Bor má také větší jaderný magnetický moment než  $^{10}\text{B}$  - obecně lze říci, že NMR poměr signál/šum se zvyšuje se zvyšujícím se jaderným momentem. Dalším důvodem pro jeho použití je, že spin  $I$  v jednotkách  $h/\pi$  má pro izotop  $^{11}\text{B}$  hodnotu  $3/2$  zatímco pro izotop  $^{10}\text{B}$  má hodnotu  $3$ . V důsledku toho má  $^{10}\text{B}$  větší jaderný kvadrupólový moment a jeho NMR spektra nejsou tak ostrá jako spektra  $^{11}\text{B}$ <sup>61</sup>.

Spektra  $^{11}\text{B}$  měřená u arylspiroborátů by měla poskytovat ostrý singlet v oblasti přibližně 14ti ppm. Tento posun odpovídá čtyřvaznému boru. V protonových a uhlíkových spektrech nelze očekávat výraznější změny v chemických posunech oproti volným ligandům<sup>21,62</sup>.

### 1.2.8 Infračervená spektrometrie, vibrace B-O vazby

Vibrace vazby B-O odpovídá pro estery boru a směsné estery vlnočtu přibližně  $1340\text{ cm}^{-1}$ . Tento pás má vysokou intenzitu bývá zřetelný<sup>63,64</sup>. Spektra halogenovaných amonných solí arylspiroborátů poskytla pásy v oblasti přibližně  $1450$ ,  $1350$  a  $1280\text{ cm}^{-1}$ <sup>65</sup>. Ve studovaných komplexech boru  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  a  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$  by v IR spektrech obou sloučenin měl být znatelný rozdíl.  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  obsahuje na rozdíl od  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$  dvě hydroxylové skupiny vázané na benzen, které by měly poskytovat široký signál v oblasti  $3550$ - $3200\text{ cm}^{-1}$ <sup>66</sup>.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

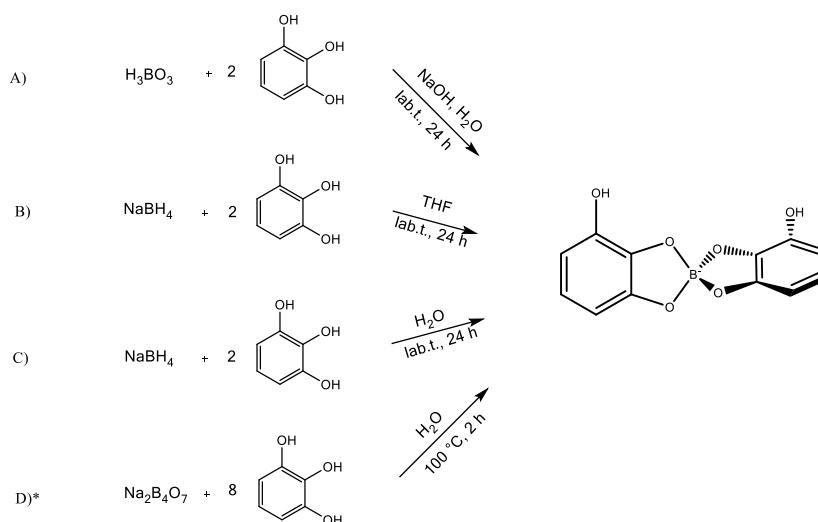
### 2.1 Chemikálie

Tetraboritan sodný dekahydrát 99%, hydroxid sodný 98 %, kyselina chlorovodíková 35% kyselina mravenčí 85%, amoniak 25%, kyselina boritá 99,5%, tetrahydrofuran 99,5%, methanol 99,5% (Lach:ner s.r.o., ČR), tetrahydridoboritan sodný 96%, thiomčovina 99,0% (Sigma Aldrich, Německo), pyrogallol 99%, 2,3-dihydroxynaftalen 98% (Alfa Aesar, Německo), acetonitril 99,9% (Carl Roth, Německo), 1,2-dichlorethan 99,9% (PENTA s.r.o., ČR), deuterovaný acetonitril 99,8% (Eurisotop, Francie), deionizovaná voda (Milli-Q<sub>plus</sub> systém - Millipore, USA, specifický elektrický odpor 18,2 MΩ·cm)

### 2.2 Metody přípravy komplexů boru

#### 2.2.1 Postupy přípravy komplexu boru s pyrogalolem [B(PG)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

Pro přípravu komplexu boru s pyrogalolem bylo využito celkem čtyř postupů. Přípravy komplexu z tetrahydridoboritanu sodného jsou převzaté a modifikované z literatury<sup>21</sup>, z kyseliny borité z literatury<sup>62</sup>. Příprava komplexu z tetraboritanu sodného doposud popsána nebyla. Schémata příprav znázorňuje obrázek 11. Jednotlivé reakční cesty jsou pro přehlednost v další diskuzi označeny písmenem A-D.



Obrázek 11: Schématické znázornění postupů pro přípravu komplexu  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$ ; \*reakcí D vznikají čtyři moly komplexu  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$

- **Reakční cesta A**

119,88 mg (1,94 mmol) kyseliny borité bylo rozpuštěno ve 2,39 ml vody. Navážka 487,15 mg (3,86 mmol) pyrogallolu byla rozpuštěna v 1,22 ml vody. Po smíchání roztoků sloučenin byl ke směsi přidán roztok hydroxidu sodného 83,12 mg (2,08 mmol) ve 2 ml vody. Směs byla přivedena k varu a pod refluxem zahřívána a míchána po dobu dvou hodin.

- **Reakční cesta B**

*Postup 1B)*

K navážce 630,13 mg (5,00 mmol) pyrogallolu bylo přidáno 15 ml THF. Za stálého míchání byl ligand v THF rozpuštěn a k roztoku byl přidán pevný tetrahydridoboritan sodný 94,93 mg (2,54 mmol). Směs byla míchána po dobu 24 h na magnetické míchačce. Produkt byl ze směsi odfiltrován, promyt 5 ml THF, vysušen a zvážen.

### *Postup 2B)*

Vzhledem k malému výtěžku 1B byl postup modifikován. K navážce 1,2048 g (9,55 mmol) pyrogallolu bylo přidáno 15 ml THF. Za stálého míchání byl ligand rozpuštěn a k roztoku byl přidán pevný tetrahydridoboritan sodný 193,42 mg (5,11 mmol). Směs byla míchána po dobu 24 h na magnetické míchačce. Z roztoku byl 20ti ml 1,2-dichlorethanu vysrážen produkt, jenž byl odfiltrován a zvážen.

- **Reakční cesta C**

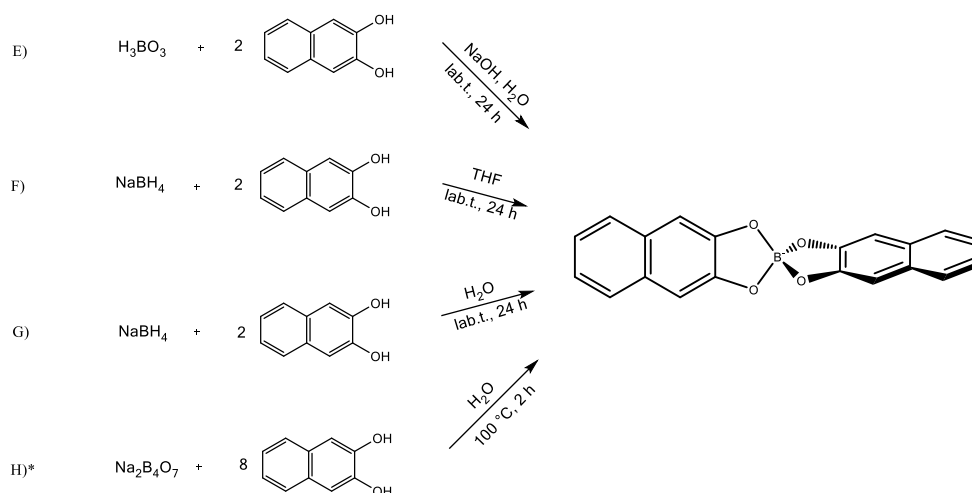
K navážce 631,92 mg (5,01 mmol) pyrogallolu bylo přidáno 15 ml vody. Za stálého míchání byl pyrogallol ve vodě rozpuštěn a k roztoku byl přidán pevný tetrahydridoboritan sodný 94,18 mg (2,49 mmol). Směs byla míchána na magnetické míchačce při laboratorní teplotě po dobu 24 h.

- **Reakční cesta D**

Nejprve byly připraveny nasycené roztoky tetraboritanu sodného dekahydrátu a pyrogallolu. Bylo naváženo 147,58 mg (0,387 mmol) tetraboritanu sodného dekahydrátu a navážka byla rozpuštěna v 3,86 ml vody. Dále bylo naváženo 389,57 mg (3,09 mmol) pyrogallolu a rozpuštěno v 0,65 ml vody. Oba roztoky byly smíseny a následně míchány na magnetické míchačce při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin.

## 2.2.2 Postupy přípravy komplexu boru s 2,3-dihydroxynaftalenem [B(DHN)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

Pro přípravu komplexu boru s 2,3-dihydroxynaftalenem bylo využito celkem čtyř postupů. Příprava komplexu z tetrahydridoboritanu sodného je převzatá a modifikovaná z literatury<sup>21</sup>, postupy přípravy z kyseliny borité z literatury<sup>62</sup>. Příprava komplexu z tetraboritanu sodného doposud popsána nebyla. Jednotlivé reakční cesty jsou pro přehlednost označovány písmenem E-H. Schémata příprav znázorňuje obrázek 12.



Obrázek 12: Schématické znázornění reakcí pro přípravu komplexu [B(DHN)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>; \*reakci H vznikají čtyři moly komplexu [B(DHN)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

### • Reakční cesta E

Navážka 100,78 mg (0,63 mmol) 2,3-dihydroxynaftalenu byla rozpuštěna v 7,5 ml vody. K tomuto roztoku byly přidány navážky hydroxidu sodného 13,04 mg (0,33 mmol) a kyseliny borité 20,16 mg (0,33 mmol). Směs byla přivedena k varu (100 °C) a refluxována po dobu 2 hodin. Krystalický produkt byl ze směsi odfiltrován, vysušen a zvážen.

- **Reakční cesta F**

K navážce 104,12 mg (0,65 mmol) 2,3-dihydroxynaftalenu bylo přidáno 7,5 ml THF. Za stálého míchání byl 2,3-dihydroxynaftalen v THF rozpuštěn a k roztoku byl přidán pevný tetrahydridoboritan sodný 10,14 mg (0,27 mmol). Směs byla míchána 24 hodin za laboratorní teploty, ze směsi byl odfiltrován, vysušen a zvážen pevný produkt.

- **Reakční cesta G**

K navážce 107,11 mg (0,67 mmol) 2,3-dihydroxynaftalenu bylo přidáno 7,5 ml vody. Za stálého míchání byl 2,3-dihydroxynaftalen ve vodě rozpuštěn a k roztoku byl přidán pevný tetrahydridoboritan sodný 15,11 mg (0,40 mmol). Směs byla míchána na magnetické míchačce 24 hodin. Ze směsi byl odfiltrován pevný produkt, který byl vysušen a zvážen.

- **Reakční cesta H**

Navážka 29,76 mg (0,08 mmol) tetraboritanu sodného byla rozpuštěna v 7,5 ml vody. K roztoku byl přidán pevný 2,3-dihydroxynaftalen 100,63 mg (0,63 mmol) a směs byla za laboratorní teploty míchána po dobu 24 hodin. Po této době byl z roztoku odfiltrován, vysušen a zvážen pevný produkt.



## 2.3 Instrumentace a podmínky měření

- **Hmotnostní spektrometrie**

Pro získání hmotnostních spekter nízkého rozlišení byl použit přístroj AMAZON SL (BRUKER, Daltonic, Německo). Při měření v negativním módu byly použity následující experimentální podmínky:

- rozsah skenování:  $m/z$  50 až  $m/z$  1000
- tlak zmlžovače: 0,5 bar
- teplota sušícího plynu ( $N_2$ ): 200 °C
- průtok sušícího plynu ( $N_2$ ): 4,0 l/min
- napětí na kapiláře: 4500 V

Pro získání hmotnostních spekter vysokého rozlišení byl použit přístroj q-TOF compact (Bruker, Daltonic, Německo). Při měření v negativním módu byly použity následující experimentální podmínky:

- rychlost dávkování vzorku: 3  $\mu$ l/min
- rozsah skenování:  $m/z$  50 až  $m/z$  1000
- tlak zmlžovače: 0,3 bar
- teplota sušícího plynu ( $N_2$ ): 220 °C
- průtok sušícího plynu ( $N_2$ ): 3,0 l/min
- napětí na kapiláře: 2800 V

- **Nukleární magnetická rezonance**

Pro měření  $^1\text{H}$  a  $^{11}\text{B}$  NMR spekter byl použit přístroj Bruker Ascend <sup>TM</sup> (400 MHz) NMR spektrometr (Bruker Daltonik, Německo). Měření vzorků probíhalo ve skleněných kyvetách s vnitřním průměrem 5 mm za následujících experimentálních podmínek:

- referenční vzorek: tetramethylsilan
- frekvence  $^1\text{H}$  spekter 400 MHz v  $\text{CDCl}_3$ , reference na signál 7,26 ppm
- frekvence  $^{11}\text{B}$  spekter 128 MHz, bez reference.

- **Infračervená spektroskopie**

Pro měření infračervených spekter byl použit přístroj Nicolet in10 spektromikroskop ThermoScientific. Při měření pevných vzorků v reflexním módu s detektorem chlazeným kapalným dusíkem byly použity následující podmínky měření:

- referenční vzorek: zlatá vrstva
- počet akumulací spektra: 256
- spektrální rozlišení:  $8\text{ cm}^{-1}$
- velikost měřené oblasti:  $150 \times 150\ \mu\text{m}$

- **UV-VIS absorpční spektrometrie**

Pro měření UV-VIS absorpčních spekter byl použit jednopaprskový spektrometr Thermo Evolution 60 (Thermo Fischer Scientific – USA) s křemennými kyvetami o objemu 3 ml s definovanou optickou délkou 1 cm. Při měření vzorků byly použity následující podmínky měření:

- skenovací rozsah: 200 – 800 nm
- skenovací krok: 5 nm
- rychost skenu: vysoká (100 nm/min)

- **Kapilární elektroforéza s UV detekcí**

Pro měření CE-UV byl využíván přístroj Agilent Technologies 7100 (Německo) s DAD detektorem. Při měření vzorků byly použity následující experimentální podmínky:

- kapilára: křemenná 50/375  $\mu\text{m}$  (Polymicro Technologies, Phoenix, U.S.A.)
- délka do detektoru 39,5 cm, celková délka 47,5 cm
- napětí: 25 kV
- teplota termostatu: 25 °C
- dávkování tlakové: 30 mbar, 5 s
- detekce: absorpční fotometrická,  $\lambda_{\text{max}}$  [B(DHN)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> 236 nm,  $\lambda_{\text{max}}$  [B(PG)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> 210 nm

- **Kapilární elektroforéza s hmotnostní detekcí**

Pro měření CE-MS byl využíván přístroj pro kapilární zónovou elektroforézu Agilent Technologies 7100 (Německo) v kombinaci s hmotnostním spektrometrem Bruker qTOF compact (Německo). Pro veškerá měření byly použity následující experimentální podmínky:

- separační kapilára: křemenná 50/375  $\mu\text{m}$  (Polymicro Technologies, Phoenix, U.S.A.)
- délka kapiláry: 50 cm
- separační napětí: 25 kV
- nosný elektrolyt: 10 mM kyselina mravenčí + NH<sub>4</sub>OH (pH 10,08)

- stínící roztok (sheat fluid): 10 mM kyselna mravenčí/methanol (50:50 v/v), průtok 5,0 µl/min
- dávkování vzorku: tlakové, 50 mbar, 10 s
- průtok sušícího plynu (N<sub>2</sub>): 10 l/min
- teplota sušícího plynu: 200 °C
- napětí na kapiláře (ESI): 2800 V
- tlak zmlžovače: 2 bar

- **Další použitá instrumentace**

- JENWAY 3540Y Conductivity Meter and pH meter (P-LAB, Česká Republika)
- stolní pH metr XS pH 50 (Verkon, Česká Republika)
- analytické váhy Sartorius 2004 MP (Sartorius, Německo)
- mikrováhy Sartorius 7085011 (Sartorius, Německo)
- elektromagnetická míchačka s ohřevem IKA RCT basic IKAMAG (Verkon, Česká Republika)
- ultrazvuková lázeň Elmasonic S (Elma Smidchbauer, Německo)
- lineární dávkovač (KD Scientific, USA)

## 2.4 Příprava roztoků

- **Příprava nosných elektrolytů o hodnotách pH v rozmezí 3,6 – 10,1**

Bylo připraveno 9 pufrů obsahujících 20 mM kyselinu mravenčí a proměnnou koncentrací amoniaku, které byly následně použity jako nosné elektrolyty v CZE. Při praktické přípravě nosných elektrolytů bylo za stálé kontroly pH titrováno 100 ml roztoku 20 mM kyseliny mravenčí 10 µl přídávky 25% vodného roztoku amoniaku. Po dosažení požadovaného pH byl roztok převeden do uzavřené skleněné nádoby a uchováván v lednici pro další použití. Efekt změny koncentrace kyseliny mravenčí naředěním při titraci byl zanedbán. Parametry pufrů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Hodnoty pH jednotlivých roztoků 20 mmol/l kyseliny mravenčí a amoniaku

| pH    | c <sub>NH3</sub> [mmol/l] |
|-------|---------------------------|
| 2,83  | 0,00                      |
| 3,63  | 9,06                      |
| 4,00  | 12,89                     |
| 4,54  | 17,46                     |
| 4,98  | 18,91                     |
| 6,10  | 19,89                     |
| 7,04  | 20,12                     |
| 8,03  | 21,23                     |
| 9,08  | 33,52                     |
| 10,08 | 150,52                    |

- **Příprava roztoků vzorků pro měření hmotnostní spektrometrií**

Byly odváženy 2 mg tuhého vzorku a v ultrazvukové lázni rozpuštěny v 10 ml acetonitrilu. Před měřením byl tento roztok 100krát naředěn čistým acetonitrilem.

- **Příprava roztoků vzorků pro měření NMR**

Vzorky pro nukleární magnetickou rezonanci byly připraveny rozpuštěním 2 mg vzorku 2B a 2 mg vzorku H v 1 ml deuterovaného acetonitrilu.

- **Příprava roztoků vzorků pro měření vzorových elektroforegramů pomocí CE-UV**

Vzorky byly ředěny takovým způsobem, aby se plochy píku komplexů boru pohybovaly přibližně mezi 100 – 150 mAU·s. Pro vzorovou separaci látek byl do

10 ml odměrné banky připraven roztok vzorku 2B komplexu  $[B(PG)_2]^-$  o koncentraci 1 mg/ml ve směsném poměru ACN/H<sub>2</sub>O (2/3 v/v). Do vialky byl roztok ředěn s vodou v poměru 1:1. Obdobně bylo postupováno při přípravě vzorku H komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  pouze ředění do vialky vzorek:voda bylo upraveno na poměr 5:1.

- **Příprava roztoků vzorků pro studium rovnováhy mezi ligandem a komplexem pomocí pomocí CE-UV**

Vzorky byly ředěny takovým způsobem, aby se plochy píku komplexů boru pohybovaly přibližně mezi 100 – 200 mAU·s. Pro měření stability ve vodných roztocích s přídavkem acetonitrilu ve směsném poměru ACN/H<sub>2</sub>O (2/3 v/v) byly připraveny roztoky vzorku 2B a vzorku H do 10 ml odměrné baňky o koncentraci 1 mg/ml. Do vialky byly následně roztoky ředěny v poměru 1:1 s vodou. Pro měření stability v čistě acetonitrilovém roztoku byly připraveny roztoky obou vzorků v acetonitrilu o koncentraci 1 mg/ml. Do vialky byly roztoky ředěny s acetonitrilem v poměru 1:1.

- **Příprava roztoků vzorků pro měření pomocí CE-MS**

Koncentrace byla volena tak, aby výška píku komplexu  $[B(PG)_2]^-$  poskytovala intenzitu přibližně  $1 \cdot 10^{-4}$ . Pro vzorovou separaci látek byl do 10 ml odměrné baňky připraven roztok vzorku 2B komplexu  $[B(PG)_2]^-$  o koncentraci 1 mg/ml ve směsném poměru ACN/H<sub>2</sub>O (2/3 v/v). Do vialky pak byl vzorek ředěn v poměru 1:20 s vodou.

- **Příprava roztoků vzorků pro sledování oxidace pyrogallolu pomocí UV-VIS spektrometrie**

Vzorek byl ředěn do kyvety takovým způsobem, aby se změřená hodnota absorbance pohybovala mezi 0,1 – 1 AU v měřené oblasti spektra. Nejprve byl připraven zásobní roztok pyrogallolu bez přídavku báze o koncentraci  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pro studium přeměny pyrogallolu v bazickém roztoku byl připraven

pracovní roztok smísením 1,5 ml pyrogallolu o koncentraci  $0,002 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  s 1,5 ml  $0,020 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  mravenčnanového pufru. Výsledné pH roztoku činilo 10,01. Z tohoto roztoku bylo do květy pipetováno 0,6 ml a doplněno na 3 ml deionizovanou vodou.

- **Příprava roztoků vzorků pro sledování oxidace pyrogallolu pomocí CE-UV**

Výchozí koncentrace pyrogallolového ligandu byla volena tak, aby se plocha pyrogallolu pohybovala v oblasti přibližně 100 mAU·s jednotek v čase nula. Pro studium oxidace pyrogallolu byl připraven zásobní roztok pyrogallolu o koncentraci 1 mg/ml a mravenčnanový pufr o pH 10,06. 300  $\mu\text{l}$  roztoku pyrogallolu o koncentraci 1 mg/ml a mravenčnanový pufr o pH 10,06. 300  $\mu\text{l}$  roztoku pyrogallolu o koncentraci 1 mg/ml bylo pipetováno do vialky společně s 300  $\mu\text{l}$   $0,020 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  mravenčnanového pufru o pH 10,08. Pro sestavení kalibrační závislosti absorbance pyrogallolu na koncentraci pyrogallolu v roztoku bylo připraveno ze zásobního roztoku 5 kalibračních roztoků pyrogallolu v koncentračním rozmezí 0,17 – 0,83 mg/ml.

## 2.5 Další experimentální postupy

- **Měření vodivosti nosných elektrolytů**

Nejprve byla opakovaným (celkem desetinásobným) měřením vodivosti 0,1 mol/l roztoku chloridu draselného určena odporová konstanta nádoby. Pro určení vodivosti analyzovaných pufrů bylo do deseti úzkých kádinek pipetováno 20 ml jednotlivých pufrů a za stálého míchání byla pomocí konduktometru změřena jejich vodivost. Hodnoty specifické vodivosti byly srovnány s teoretickými hodnotami získanými v programu PeakMaster. Všechna měření byla provedena třikrát.

- **Určení pufrací kapacity nosných elektrolytů**

Určení pufrací kapacity Metodou 1 bylo provedeno dle literatury<sup>67</sup>. Do kádinky bylo odpipetováno 50 ml mravenčnanového pufru a pomocí pH metru byla změřena hodnota pH. Následně byl ke kyselým/bazickým pufrům přidán 1 ml kyseliny chlorovodíkové/hydroxidu sodného a opět byla proměřena hodnota pH. Poté byly kyselé/bazické pufrы titrovány 200  $\mu$ l přídatky hydroxidu sodného/kyseliny chlorovodíkové, po každém přídatku bylo proměřeno pH, až do celkové spotřeby odměrného roztoku 2 ml. Ve výsledcích je experiment označován jako Metoda 1. Celý experiment byl proveden i opačným způsobem. Ke kyselým pufrům byl přidán 1 ml NaOH, který byl titrován 200  $\mu$ l přídatky HCl. Analogicky bylo postupováno v případě bazických pufrů. Ve výsledcích je experiment označován jako Metoda 2. Koncentrace báze/kyseliny v roztoku zmenšená o koncentraci přidatné kyseliny/báze (viz vztah 4) byla vynesena do grafu oproti naměřenému pH. Křivky byly proloženy přímkou a z rovnice přímkы byla určena hodnota pufrací kapacity (pufrací kapacita odpovídá absolutní hodnotě směrnice dané přímkы v bodu ekvivalence). U pufrů, které nebylo možné proložit lineární závislostí, byly k výpočtu pufrací kapacity a grafickému znázornění závislostí použity pouze hodnoty kolem nulového bodu koncentrace báze/kyseliny. Experimentálně naměřené hodnoty byly srovnány s hodnotami predikovanými programem PeakMaster a výpočtem pufrací kapacity dle vztahů 5 a 6, které jsou převzaty z literatury<sup>68</sup>, jedná se o výpočet dle D. van Slykea.

- **Sledování oxidace pyrogallolu pomocí UV-VIS spektrometrie**

Oxidace pyrogallolu za tvorby dalších barevných produktů byla proměřována pomocí UV-VIS spektrometrie ve dvouminutových časových intervalech od započatí reakce přídatkem bazického mravenčnanového pufru.

Nejprve byl proměřen čistý roztok pyrogallolu bez přídatku báze. Pomocí UV-VIS spektrometrie byla snímána spektra po dobu osmi minut ve dvouminutových intervalech. Dále byla sledována přeměna pyrogallolu na jeho barevné oxidační produkty po přídatku bazického mravenčnanového pufru k roztoku pyrogallolu. Spektra byla zaznamenávána po dvou minutách po dobu dvou hodin.



## 2.6 Výpočty a vyhodnocení experimentálních dat

Koncentrace báze/kyseliny při určení pufrační kapacity roztoků byla vypočítána dle vztahu přejatého z literatury<sup>67</sup>. Výpočet pufrační kapacity byl proveden dle vztahu přejatého z literatury<sup>68</sup>.

### 1) Použité výrazy a vzorce

- Chyba určení přesné hmoty v hmotnostních spektrech vysokého rozlišení byla vypočítána dle vztahu:

$$\Delta m = \frac{(m/z_{\text{experiment}} - m/z_{\text{predikce}})}{m/z_{\text{predikce}}} \cdot 10^6$$

(1)

Kde  $\Delta m$  je chyba měření [ppm],  $m/z_{\text{experiment}}$  je experimentálně určená hodnota hmoty komplexu,  $m/z_{\text{predikce}}$  je predikovaná hodnota hmoty komplexu.

- Odporová konstanta nádoby při měření vodivosti byla vypočítána dle vztahu:

$$K = \frac{k_{25}}{G}$$

(2)

Kde  $K$  je odporová konstanta nádoby [ $\text{m}^{-1}$ ],  $k_{25}$  je známá specifická vodivost při 25 °C 0,01 mol/l KCl tj 141,3 [ $\text{mS} \cdot \text{m}^{-1}$ ],  $G$  [S] je naměřená vodivost roztoku.

- **Specifická vodivost byla vypočítána dle vztahu:**

$$\kappa = K \cdot G$$

(3)

Kde  $\kappa$  je specifická vodivost [ $S \cdot m^{-1}$ ],  $K$  je odporová konstanta nádoby [ $m^{-1}$ ],  $G$  [S] je naměřená vodivost roztoku.

- **Koncentrace báze/kyseliny při určení pufrací kapacity roztoků byla vypočítána dle vztahu**

$$c_{BÁZE/KYSELINY} = \frac{c_{NaOH/HCl} \cdot V_{NaOH/HCl} \cdot f_{NaOH/HCl} - c_{HCl/NaOH} \cdot 1 \text{ ml} \cdot f_{HCl/NaOH}}{50 \text{ ml} + 1 \text{ ml} + V_{NaOH/HCl}}$$

(4)

- **Výpočet pufrací kapacity dle D. van Slykea pro kyselé pufrы – vztah 5 a pro bazické pufrы vztah 6**

$$\beta = 2,3 \cdot C \frac{K_a \cdot [H_3O^+]}{(K_a + [H_3O^+])^2}$$

(5)

$$\beta = 2,3 \cdot C \frac{K_b \cdot [OH^-]}{(K_b + [OH^-])^2}$$

(6)

Kde  $\beta$  je pufrční kapacita [mol/l],  $C$  je suma koncentrací soli a kyseliny/báze [mol],  $K_a$  je disociační konstanta kyseliny mravenčí,  $K_b$  disociační konstanta amoniaku,  $[H_3O^+]$  je koncentrace hydroxoniových iontů v roztoku [mol/l],  $[OH^-]$  je koncentrace hydroxidových iontů v roztoku [mol/l].

- **Elektroosmotická mobilita byla určena dle vztahu**

$$\mu = \frac{L_D \cdot L_{celk}}{U \cdot t_m}$$

(7)

Kde  $L_D$ [cm] je délka kapiláry k detektoru,  $L_{celk}$  je celková délka kapiláry [cm],  $U$  je vložené napětí [V],  $t_m$  je migrační čas EOF markeru [min].

- **Elektroforetická mobilita analytu byla určena dle vztahu**

$$\mu = \frac{L_D \cdot L_{celk}}{U} \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eof}} \right)$$

(8)

Kde  $L_D$ [cm] je délka kapiláry k detektoru,  $L_{celk}$  je celková délka kapiláry [cm],  $U$  je vložené napětí [V],  $t_m$  je migrační čas EOF markeru [s],  $t_{eof}$  je migrační čas analytu [s].

- **Procentuální zastoupení analytu ve vzorku byla určována metodou vnitřní normalizace dle vztahu:**

$$A(\%) = \frac{A_x}{\sum A_n}$$

(9)

Kde  $A_x$  je plocha jednoho píku a  $\sum A_n$  suma ploch všech píků.

- **Kalibrační závislosti byly proloženy kalibrační přímkou ve tvaru:**

$$A(A) = k \cdot c(A) + q$$

(10)

Kde  $k$  je směrnice regresní přímky a  $q$  je úsek regresní přímky.

## 2) Použité programy

- **OriginPro 9.3 (OriginLab, USA)** byl užit pro tvorbu grafů, tabulek a statistické hodnocení výsledků
- **PeakMaster 5.3 (Univerzita Karlova, Česká Republika)** byl užit k predikci hodnot vodivosti a pufrační kapacity mravenčnanových pufrů
- **Vision Lite Scan 5 (Thermo Fischer Scientific, USA)** byl užit k vyhodnocení UV-VIS absorpčních spekter
- **CHemBioDraw Ultra 14.0 (PerkinElmer, USA)** byl užit k tvorbě chemických vzorců

- **Avogadro 1.1<sup>70</sup>** byl užit k vyhodnocení a úpravě struktur modelovaných komplexů a predikčních IR spekter získaných pomocí programu Gaussian
- **Agilent ChemStation 8.04 (Agilent Technologies, USA)** byl užit k vyhodnocení dat získaných měřeními na kapilární elektroforéze
- **Compass DataAnalysis 4.4 (Bruker Daltonik, USA)** byl užit k vyhodnocení dat získaných měřeními hmotnostní spektrometrií
- **MestReNova 6.0 (Mestrelab Research S.L., Španělsko)** byl užit k vyhodnocení a úpravě NMR spekter
- **Gaussian 16 (Carnegie Mellon University, USA)** byl užit k výpočtům 3D struktur, délky vazeb a IR spekter, které byly provedeny pomocí teorie funkcionálu hustoty (DFT) na úrovni B3LYP s použitím báze 3-21G+ v programu Gaussian 16. Při optimalizacích nebyla použita žádná omezení symetrie.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

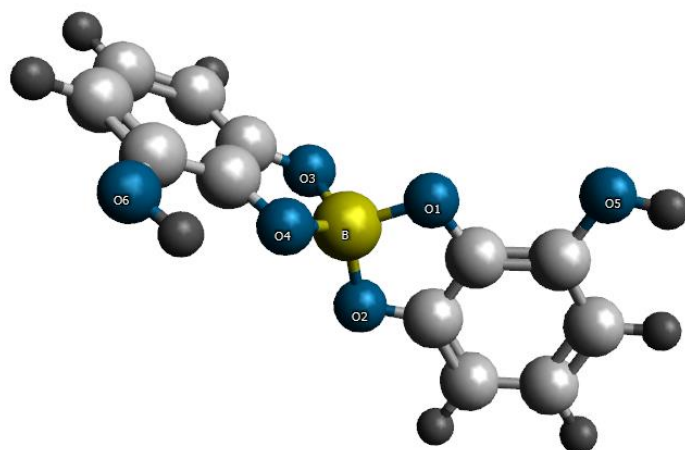
#### 3.1 Modelování struktur komplexů boru a predikce jejich IR spekter

##### 3.1.1 Modelování struktur komplexů $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$ a $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$

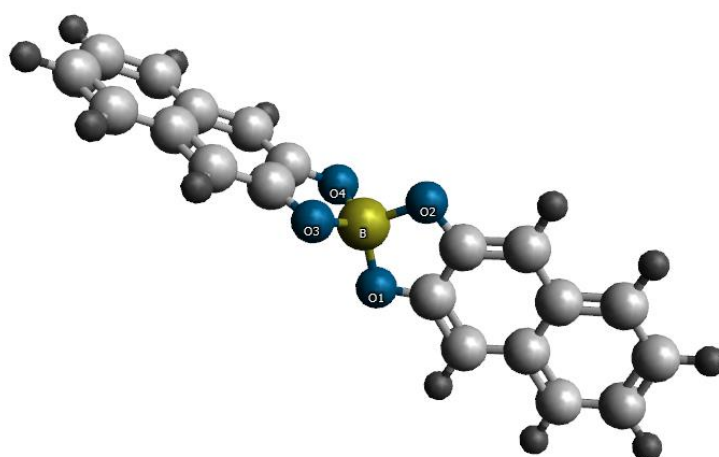
Pomocí programu Gaussian byly určeny struktury komplexů  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  a  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$ , včetně délek vazeb mezi atomy a vazebných úhlů. Strukturu komplexu  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  znázorňuje obrázek 13, komplexu  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$  náleží obrázek 14. V obou komplexech je bor koordinován čtyřmi atomy kyslíku, což odpovídá tetraedrickému uspořádání a  $sp^3$  hybridizaci. Velikost vazebných úhlů mezi dvěma atomy kyslíku a borem činí  $113,2^\circ$  pro komplex  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  a  $102,6^\circ$  pro komplex  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$ . Sevrění úhlu je tedy pro pyrogallolový komplex nižší než u ideálního tetraedru ( $109,5^\circ$ ) a pro dihydroxynaftalenový komplex vyšší. Příčinou rozdílů mezi vazebnými úhly jednotlivých komplexů může být velikost 2,3-dihydroxynaftalenového ligandu, případně přítomnost hydroxylových skupin na aromatickém jádře komplexu  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$ , ovlivňující rozložení elektronové hustoty v molekule. Délky vazeb mezi borem a kyslíkem se pro jednotlivé komplexy neliší, stejně jako délky vazeb mezi kyslíkem a uhlíkem. Úhly mezi borem kyslíkem a uhlíkem a se pro oba komplexy shodují. Rozdíl v úhlech mezi dvěma atomy uhlíku a kyslíkem je pouze nepatrný. Délky vazeb a úhly pro oba komplexy shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2: Délky vazeb mezi jednotlivými atomy a velikosti úhlů mezi atomy vypočítané programem Gaussian

| Vazba mezi atomy [Å]         | B-O <sub>1</sub>                 | O <sub>1</sub> -C   |                    |
|------------------------------|----------------------------------|---------------------|--------------------|
| $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  | 1,467                            | 1,227               |                    |
| $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$ | 1,467                            | 1,227               |                    |
| Úhel mezi atomy              | O <sub>1</sub> -B-O <sub>2</sub> | B-O <sub>1</sub> -C | C-C-O <sub>1</sub> |
| $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  | $113,2^\circ$                    | $106,0^\circ$       | $113,0^\circ$      |
| $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$ | $102,6^\circ$                    | $106,0^\circ$       | $112,8^\circ$      |



Obrázek 13: Struktura komplexu  $[B(PG)_2]^-$  získaná modelováním v programu Gaussian, značení: uhlíkové atomy – světle šedá, vodíkové atomy – tmavě šedá



Obrázek 14: Struktura komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  získaná modelováním v programu Gaussian, značení: uhlíkové atomy – světle šedá, vodíkové atomy – tmavě šedá

### 3.1.2 Predikce IR spekter pomocí programu Gaussian

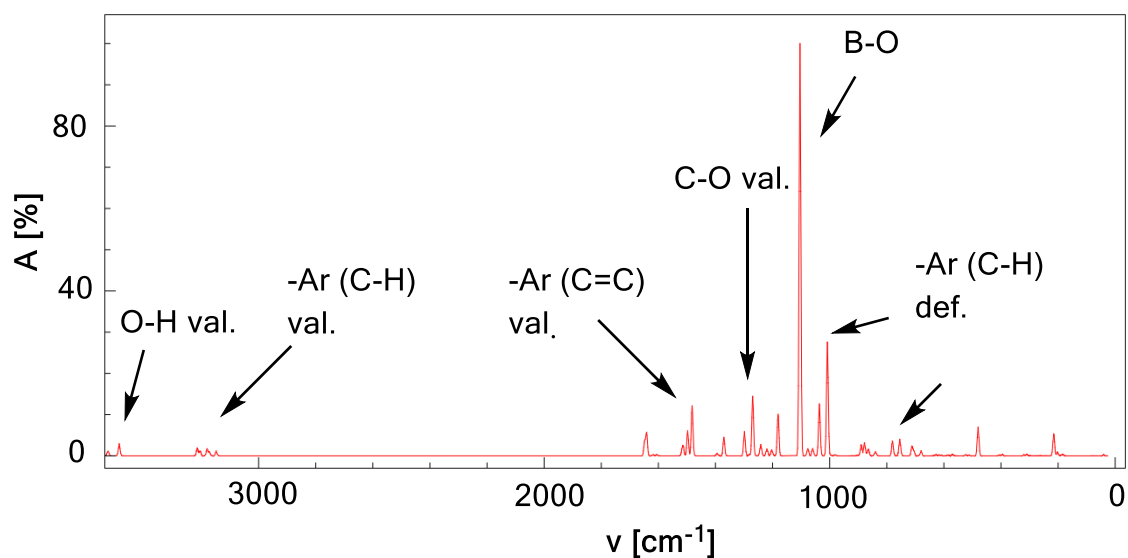
Obě spektra komplexů  $[B(PG)_2]^-$  a  $[B(DHN)_2]^-$  predikovaná pomocí programu Gaussian jsou počítána pro molekuly v plynném stavu.

IR spektrum je pro komplex  $[B(PG)_2]^-$  znázorněno na obrázku 15. Vibrace B-O vazby odpovídá vlnočtu  $1103\text{ cm}^{-1}$ . Valenčním vibracím hydroxylových skupin (O-H vazby) odpovídá pás  $3488 - 3528\text{ cm}^{-1}$ . Vibrační pás valenční vibrace C-O se nachází v oblasti  $1240\text{ cm}^{-1}$ . Vibrace aromatického jádra se nachází v oblasti vlnočtu  $3150\text{ cm}^{-1}$  (valenční vibrace C-H),  $1450\text{ cm}^{-1}$  (valenční vibrace C=C),  $1040\text{ cm}^{-1}$  (deformační rovinné vibrace C-H) a  $795\text{ cm}^{-1}$  (deformační mimorovinné vibrace C-H).

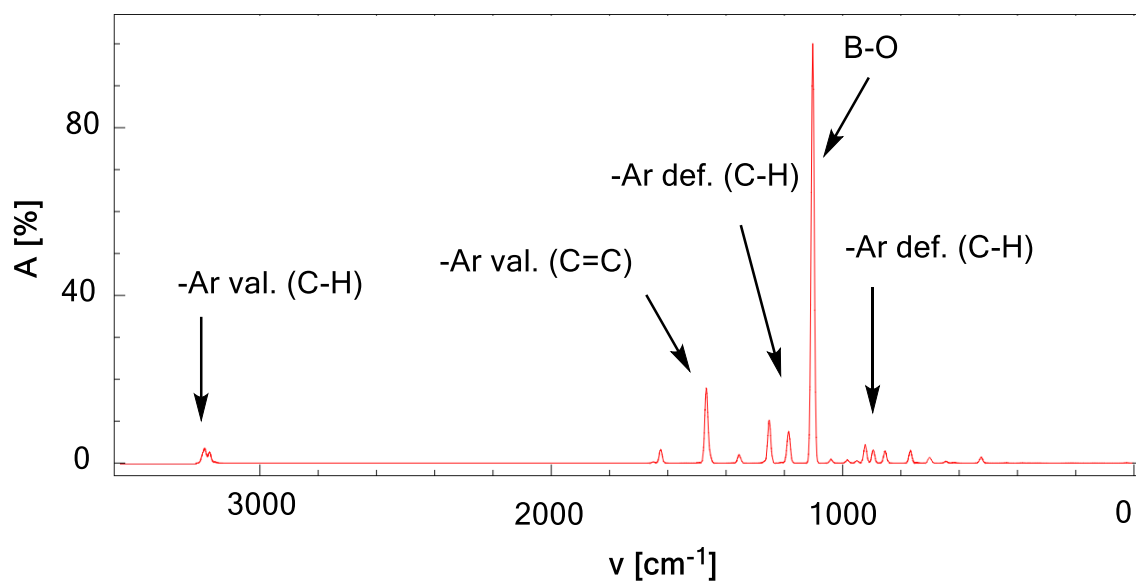
Na obrázku 16 se nachází predikované spektrum komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  v plynné fázi. V predikčním spektru, které náleží komplexu  $[B(DHN)_2]^-$ , lze rozeznat vibrační pás vazby B-O s vlnočtem  $1103\text{ cm}^{-1}$ . Dále lze ve spektru pozorovat pásy náležící aromatickým jádrům. Konkrétně se jedná o valenční vibrace C-H vazeb s vlnočtem v oblasti  $3200\text{ cm}^{-1}$ , pás valenční vibrace C=C vazeb s vlnočtem  $1468\text{ cm}^{-1}$ , deformační rovinné vibrace C-H vazby s vlnočtem  $1191 - 1251\text{ cm}^{-1}$  a deformační mimorovinné vibrace C-H vazeb aromatického jádra s vlnočtem  $890 - 985\text{ cm}^{-1}$ .

Nejvýznamnějším rozdílem mezi oběma spektry je přítomnost pásů náležících vibracím hydroxylové vazby ve spektru komplexu  $[B(PG)_2]^-$ , naopak vibrační pásy aromatických jader a bor-kyslíkových vazeb jsou si hodnotami vlnočtů velmi podobné.





Obrázek 15: IR spektrum komplexu  $[B(PG)_2]^-$  predikované programem Gaussian pro plynnou fázi (val. je valenční vibrace, def. je deformační vibrace)



Obrázek 16: IR spektrum komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  predikované programem Gaussian pro plynnou fázi (val. je valenční vibrace, def. je deformační vibrace)

## 3.2 Výběr postupů přípravy borových komplexů

### 3.2.1 Vyhodnocení jednotlivých postupů:

V následujícím textu je popsáno pozorování během jednotlivých postupů příprav komplexů a výtěžky reakcí v případě vzniku pevné fáze. Čisté komplexy jsou pevné bílé látky, zbarvení roztoku tedy indikuje přítomnost nečistot (nezreagovaných ligandů nebo vedlejších produktů reakce). U pyrogallolových komplexů mohou roztoky během reakcí nabývat hnědého zbarvení. Barva roztoku je způsobena degradací nezreagovaného pyrogallolu. V případě komplexu boru s 2,3-dihydroxynaftalenem dochází ke zbarvování směsi produktů reakce do růžovofialova, pravděpodobně v důsledku dekompozice dihydroxynaftalenového ligandu.

Produkty způsobů příprav A, C a D neposkytují výtěžek ve formě pevné fáze, ale zůstávají rozpuštěny v roztoku. Roztoky jsou zbarveny červenohnědě, což indikuje přítomnost oxidačních produktů nezreagovaného pyrogallolu. Reakce 1B poskytuje pevnou fázi komplexu  $[B(PG)_2]^-$  s výtěžkem 43,2 mg. Vzhledem k nízkému výtěžku byl postup přípravy upraven a produkt byl z roztoku THF vysrážen 1,2-dichlorethanem, přičemž výtěžek reakce se zvýšil na 598,9 mg. Nejpravděpodobnější nečistotou ve vzorku je nezreagovaný ligand.

Pevné fáze komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  byly získány reakcemi F s výtěžkem 96,6 mg, G s výtěžkem 36,0 mg a H s výtěžkem 210,0 mg. Reakce E sice poskytovala krystalický produkt, jednalo se ale o kyselinu boritou. Narůžovělé zbarvení produktů reakce může být způsobeno přítomností dihydroxynaftalenového komplexu, jehož roztoky nabývají stejného zbarvení po delším stání.

Z hlediska výtěžnosti reakce se nejlépe pro komplex  $[B(PG)_2]^-$  jeví příprava 2B a pro komplex  $[B(DHN)_2]^-$  příprava H. Tyto reakční postupy byly zvoleny pro přípravu většího množství komplexů pro další experimenty. Lze konstatovat, že produkty reakce boru s pyrogallolovým ligandem jsou ve vodě více rozpustné než produkty reakce boru s 2,3-dihydroxynaftalenovým komplexem, jelikož sraženina komplexu  $[B(PG)_2]^-$  vznikala pouze během jediného způsobu přípravy. Důvodem je přítomnost hydroxylových skupin

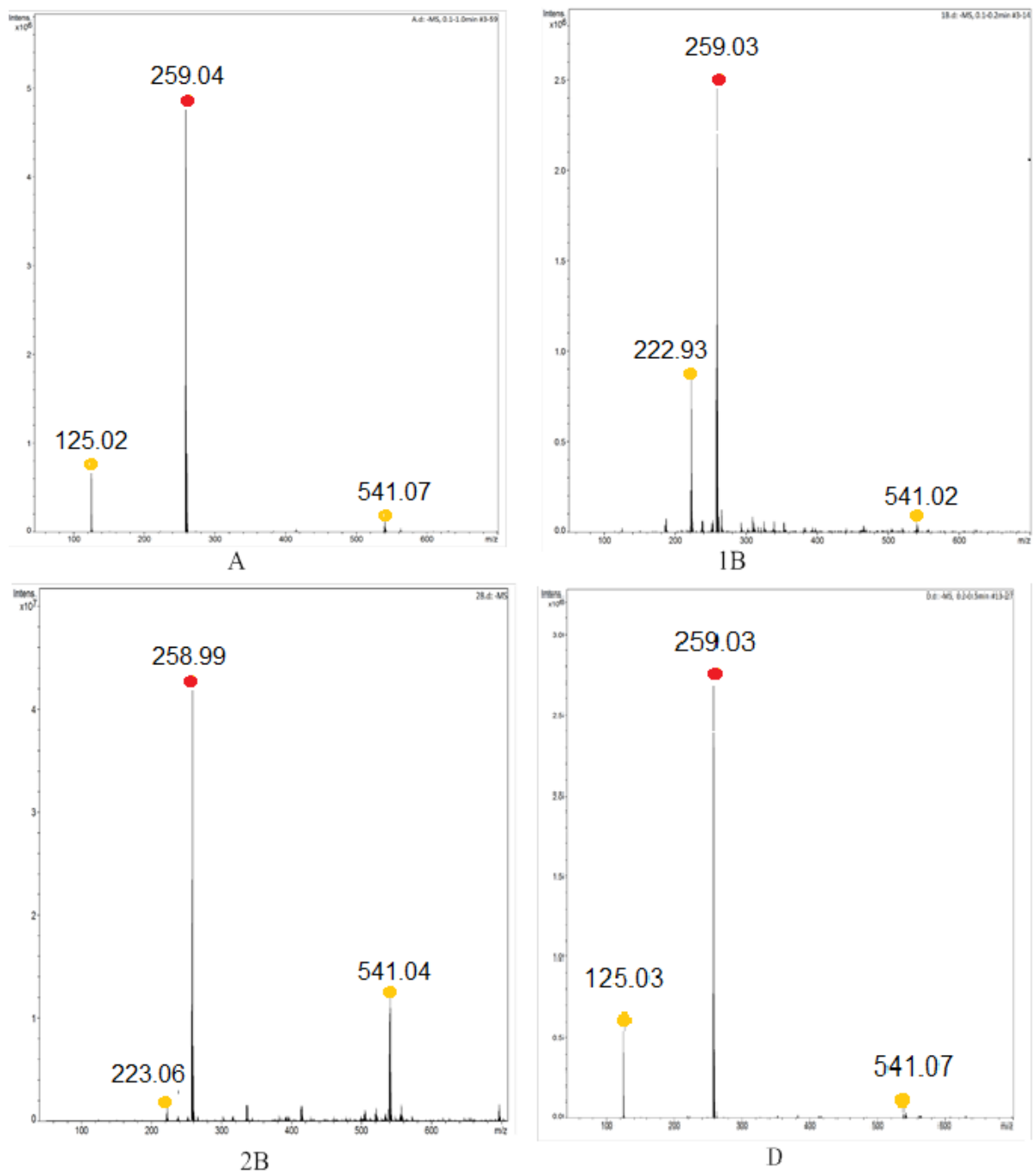
na pyrogallolovém jádře komplexu. Proto je komplikovanější získat pevnou fázi komplexu  $[B(PG)_2]^-$  a produkt je nutné z roztoku srážet.

Jednotlivé směsi produktů reakcí byly studovány pomocí hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením. Jediným postupem, při kterém komplex boru nevznikal, byla příprava komplexu E. Reakce sice poskytovala krystalický produkt, měření hmotnostní spektrometrií však vznik komplexu boru nepotvrdilo. Ze směsi vykryštovala kyselina boritá, což může být způsobeno nedostatečnou alkalizací roztoku. Ve spektru vzorku C bylo přítomno množství nečistot, proto byl vzorek vyřazen.

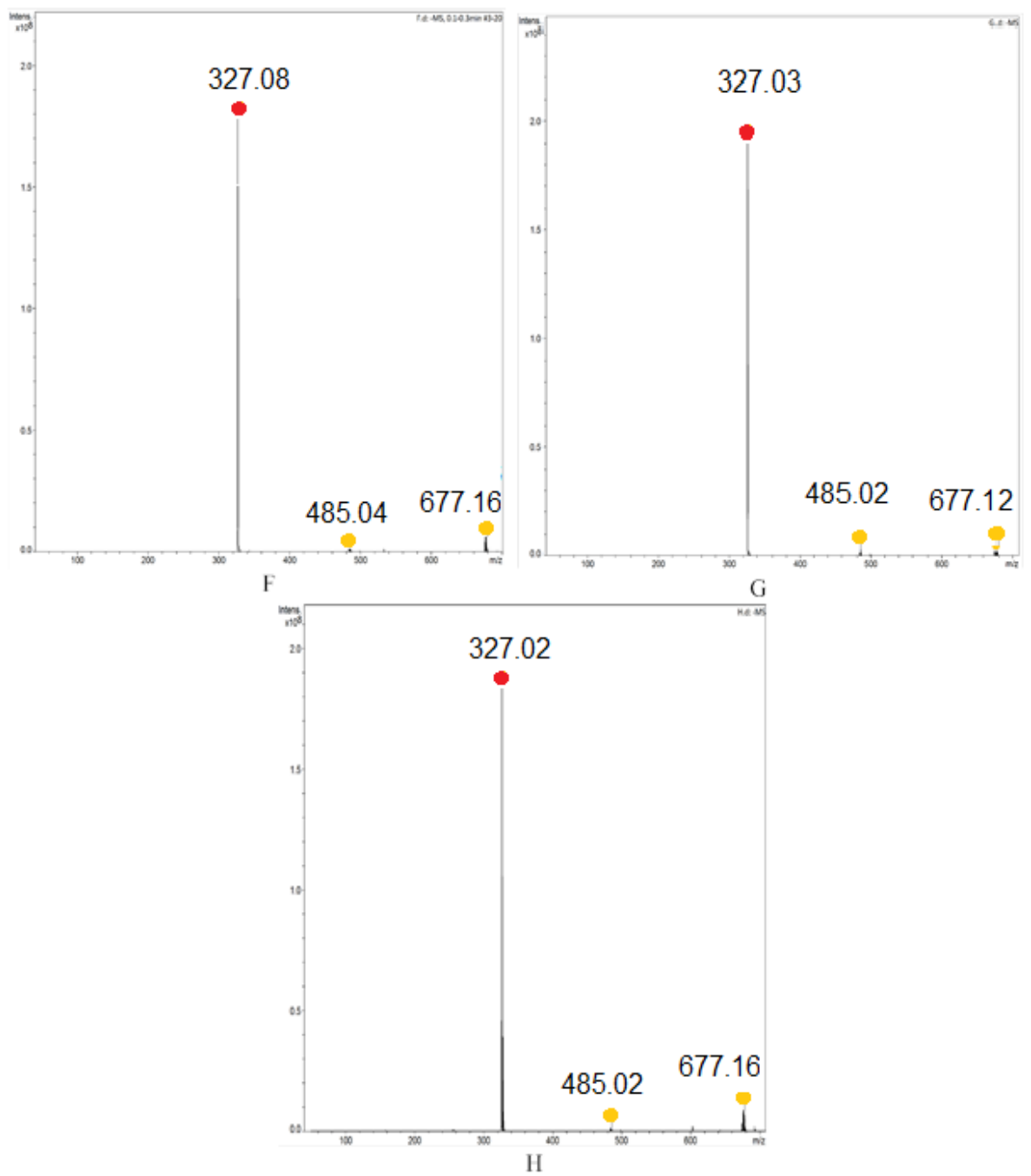
Obrázek 17 a obrázek 18 znázorňuje hmotnostní spektra fází, ve kterých byly komplexy detegovány. Červeně jsou označeny molekulární píky borových komplexů, ověřován byl i charakteristický izotopový profil boru  $^{10}B/^{11}B$ , který odpovídá zastoupení v poměru 20/80 %.

Molekulární pík komplexu  $[B(PG)_2]^-$  odpovídá  $m/z$  259. Ve spektru vzorků A lze rozpoznat iont  $m/z$  125 bez typického izotopového profilu boru, odpovídající nezreagovanému pyrogallolovému ligandu. Ve spektru vzorku 1B lze dále pozorovat ionty s hodnotami  $m/z$  223 a 541. Tyto ionty obsahující charakteristický izotopový profil boru, ale nevznikají fragmentací komplexu  $[B(PG)_2]^-$ . Jedná se buď o nečistoty nebo ionty vznikající v ESI zdroji. Struktura obou sloučenin je více popsána v kapitole 3.3.1.

Molekulární pík komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  odpovídá hmotě  $m/z$  327. Další ionty vyskytující se ve spektrech vzorků F, G a H mají velmi nízkou intenzitu. Jedná se o ionty s hodnotami  $m/z$  485 a 677, obsahující charakteristický izotopový profil boru. Struktura obou iontů je dále řešena v kapitole 3.3.1.



Obrázek 17: Hmotnostní spektra vzorků A, 1B, 2B a D (přípravy komplexu [B(PG)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>) měřená pomocí LR-MS, červeně označován molekulární pík komplexu, žlutě označovány ostatní ionty a fragmenty



Obrázek 18: Hmotnostní spektra vzorků F, G, H (přípravy komplexu  $[B(DHN)_2]^-$ ) měřená pomocí LR-MS, červeně označován molekulární pík komplexů boru, žlutě označovány ostatní ionty a fragmenty

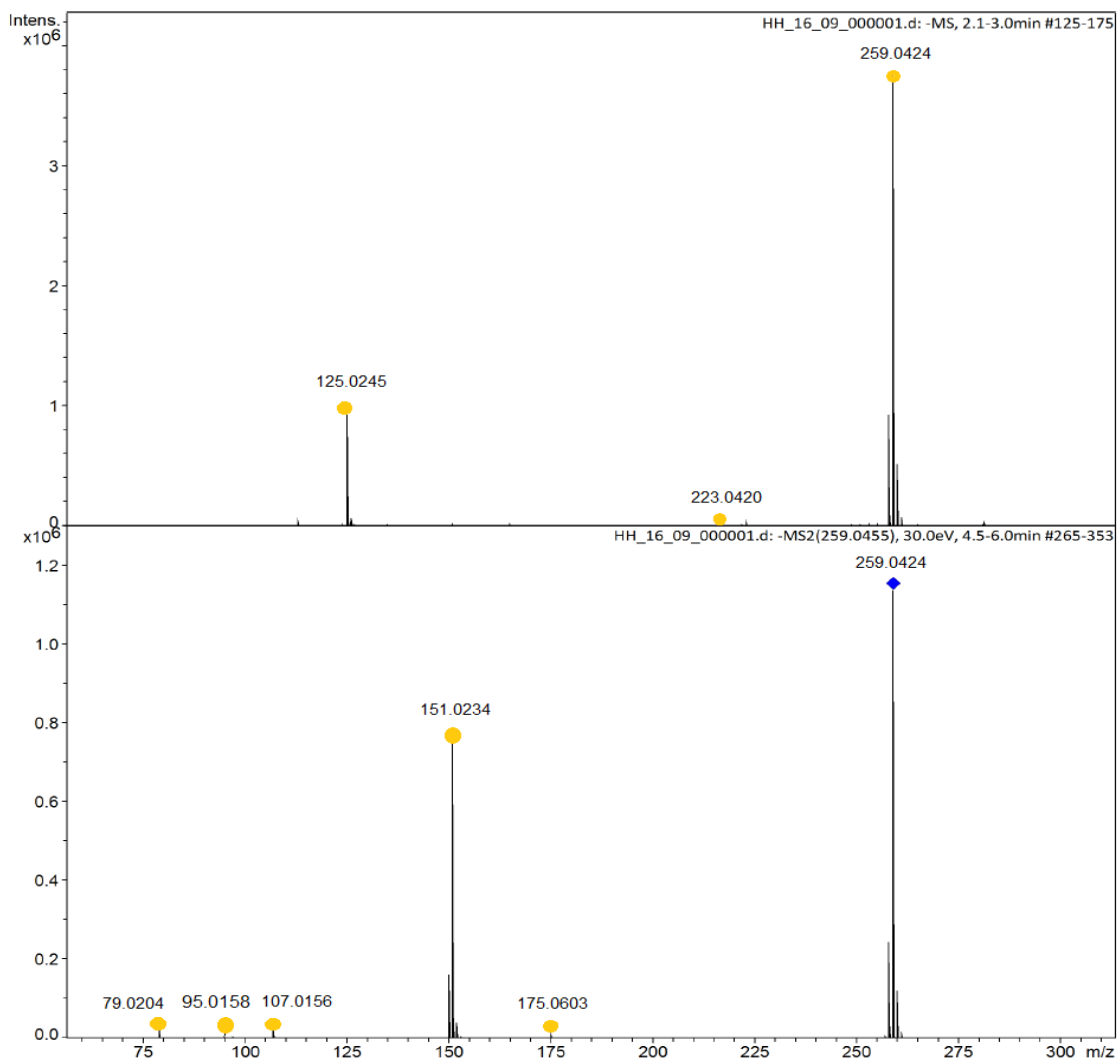
### 3.3 Strukturní charakterizace komplexů boru

#### 3.3.1 Charakterizace sloučenin boru pomocí HRMS

Pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením byla určena přesná hodnota  $m/z$  komplexu  $[B(PG)_2]^-$  a dalších iontů přítomných ve spektrech. Hmotnostní spektrum je znázorněno na obrázku 19. Experimentálně změřené hodnoty  $m/z$  komplexu a dalších iontů přítomných ve vzorku se velmi dobře shodovaly s predikovanými hodnotami, chyba měření nepřesáhla 2 ppm. Dále byl pomocí MS/MS experimentu studován fragmentační mechanismus komplexu boru s pyrogallolem. Jedná se o doplnění informací k bakalářské práci<sup>71</sup>. Přesné hmoty fragmentových iontů byly naměřeny s poněkud větší chybou (do 20ti ppm). Tato chyba může být způsobena nižší přesností měření během MS/MS experimentu, jelikož v MS/MS spektru principiálně nelze použít interní standard. Naměřené hmoty shrnuje tabulka 3.

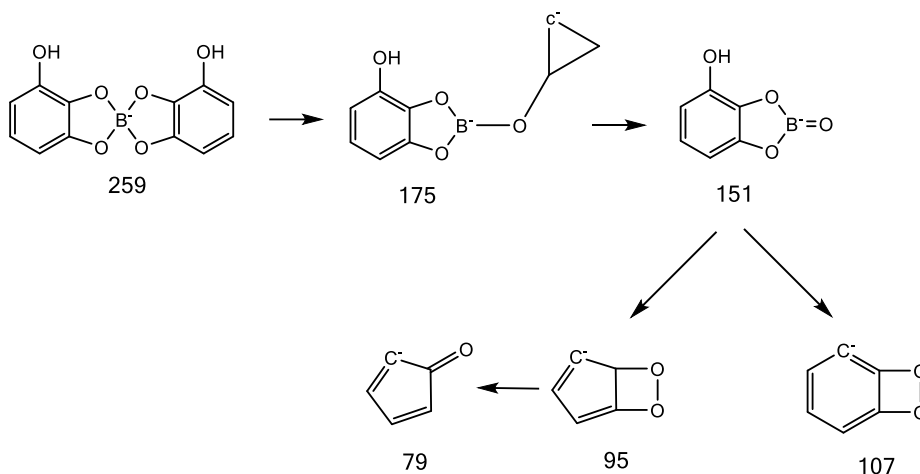
Tabulka 3: Experimentálně získané hodnoty přesných hmot komplexu  $[B(PG)_2]^-$ , ostatních iontů a fragmentů srovnané s predikovanými hodnotami, chyba měření

| Sloučenina  | Vzorec                    | $m/z$<br>experimentální | $m/z$<br>predikovaná | Chyba<br>[ppm] |
|---|---------------------------|-------------------------|----------------------|----------------|
| $[B(PG)_2]^-$                                       | $C_{12}H_8BO_6$           | 259,0424                | 259,0419             | 1,9            |
| <b>Ionty</b>  |                           |                         |                      |                |
| 1   | $C_6H_5O_3$               | 125,0245                | 125,0244             | 0,8            |
| 2   | $C_9H_8BO_6$              | 223,0420                | 223,0419             | 0,4            |
| 3   | $C_{24}H_{16}B_2NaO_{12}$ | 541,0739                | 541,0731             | 1,5            |
| <b>Fragmenty<br/>iontu <math>[B(PG)_2]^-</math></b> |                           |                         |                      |                |
| 1   | $C_9H_8BO_3$              | 175,0603                | 175,0572             | 17,7           |
| 2   | $C_6H_4BO_4$              | 151,0234                | 151,0208             | 17,2           |
| 3   | $C_6H_3O_2$               | 107,0156                | 107,0139             | 15,9           |
| 4   | $C_5H_3O_2$               | 95,0158                 | 95,0139              | 20,0           |
| 5   | $C_5H_3O$                 | 79,0204                 | 79,0189              | 19,0           |



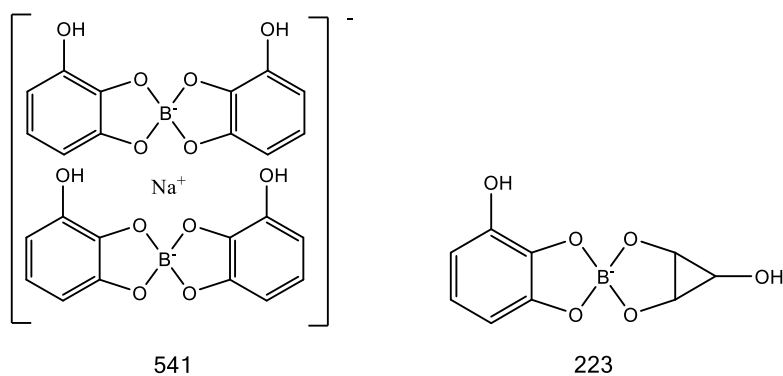
Obrázek 19: Hmotnostní spektra komplexu  $[B(PG)_2]^-$ , měření přesné hodnoty  $m/z$  a MS/MS fragmentace iontu  $m/z$  259

Pomocí MS/MS experimentu jehož spektrum znázorňuje obrázek 19, byl studován mechanismus fragmentace komplexu  $[B(PG)_2]^-$ . Komplex se postupně rozpadá na iont o hodnotě  $m/z$  175, obsahující cyklopropanový zbytek z jednoho pyrogallolového ligandu, vázaný přes kyslík na bor. Dále se iont  $m/z$  175 fragmentuje na iont  $m/z$  151, který vzniká ztrátou uhlíkatého zbytku z pyrogallolového ligandu a tvorbou dvojně vazby kyslíku k boru. Další fragmentace již poskytuje ionty bez charakteristického izotopového profilu boru. Jedná se o iont s hodnotou  $m/z$  107, obsahující benzenové jádro a dva kyslíky, dále o iont  $m/z$  95 vznikající přímo z  $m/z$  151. Ztrátou kyslíku vzniká z iontu  $m/z$  95 iont  $m/z$  79. Fragmentační schéma je znázorněno na obrázku 20.



Obrázek 20: Fragmentační schéma komplexu [B(PG)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

Pro objasnění struktury nečistot byly měřeny MS/MS experimenty dalších iontů přítomných ve spektru. Ve spektru lze ve vyšších oblastech zaznamenat iont o hodnotě  $m/z$  541. Z MS/MS experimentu bylo zjištěno, že tento iont se štěpí na  $m/z$  259, tedy pyrogallolový komplex [B(PG)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>. Vzhledem k nízké hodnotě kolizní energie potřebné k fragmentaci se s nejvyšší pravděpodobností jedná o iontový asociát, vznikající pouze v ESI zdroji hmotnostního spektrometru. Strukturně se jedná se o dimer tvořený dvěma komplexy boru s pyrogallolovým ligandem a se sodným kationtem. Pyrogallolová jádra k sobě poutají slabé vazebné interakce. Další nečistotou přítomnou ve vzorku je iont  $m/z$  223. Navrhnuté struktury obou iontů jsou zobrazeny na obrázku 21.



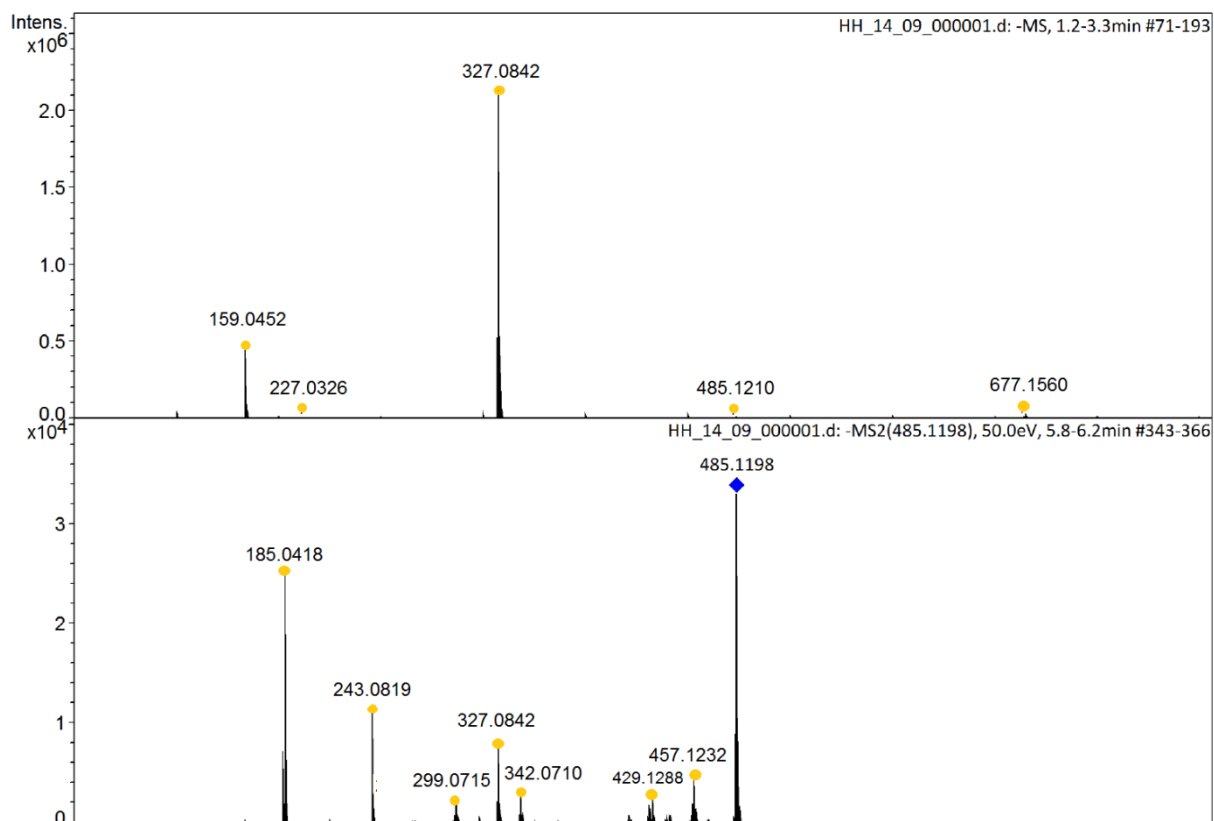
Obrázek 21: Struktura iontů  $m/z$  541 a 223



Pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením byla určena přesná hodnota  $m/z$  borového komplexu  $[B(DHN)_2]^-$ , fragmentů a ostatních iontů přítomných ve spektru. Hmotnostní spektra jsou znázorněna na obrázku 22. Experimentálně změřené hodnoty  $m/z$  komplexu a ostatních iontů přítomných ve spektru se velmi dobře shodují s predikovanými hodnotami, chyba měření nepřesáhla 2 ppm. Výjimkou je iont  $m/z$  227, který se ve spektru vykytuje s velmi nízkou intenzitou a jeho struktura nebyla podrobněji studována. Chyba měření pro fragmentové ionty nepřesahuje 6 ppm, hodnoty se tedy velmi dobře shodují s predikcí. Všechny naměřené hodnoty  $m/z$  jsou uvedeny v tabulce 4. Fragmentační mechanismus komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  není uváděn, neboť výsledky odpovídají literatuře<sup>71</sup>. Pomocí MS/MS experimentů byly studovány ionty  $m/z$  485 a  $m/z$  677.

Tabulka 4: Experimentálně získané hodnoty přesných hmot komplexu  $[B(DHN)_2]^-$ , ostatních iontů a fragmentů srovnané s predikovanými hodnotami, chyba měření

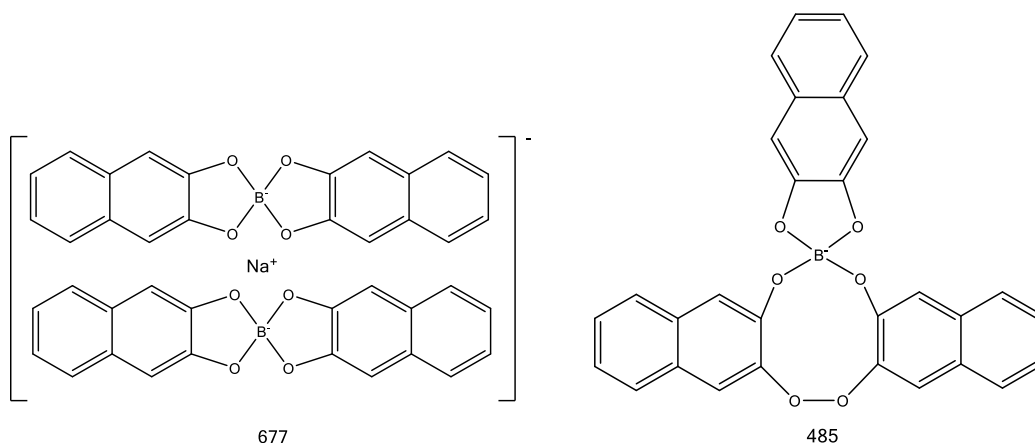
| Sloučenina                                  | Vzorec                 | $m/z$<br>experimentální | $m/z$<br>predikovaná | Chyba<br>[ppm] |
|---|------------------------|-------------------------|----------------------|----------------|
| $[B(DHN)_2]^-$                              | $C_{20}H_{12}BO_4$     | 327,0842                | 327,0834             | 2,4            |
| <b>Ionty</b>                                |                        |                         |                      |                |
| <b>1</b>                                    | $C_{10}H_7O_4$         | 159,0452                | 159,0452             | 0,0            |
| <b>2</b>                                    | $C_{13}H_7O_4$         | 227,0326                | 227,0350             | -10,6          |
| <b>3</b>                                    | $C_{30}H_{18}BO_6$     | 485,1210                | 485,1202             | 1,6            |
| <b>4</b>                                    | $C_{40}H_{24}B_2NaO_8$ | 677,1568                | 677,1560             | 1,2            |
| <b>Fragmenty iontu <math>m/z</math> 485</b> |                        |                         |                      |                |
| <b>1</b>                                    | $C_{29}H_{18}BO_5$     | 457,1232                | 457,1253             | -4,6           |
| <b>2</b>                                    | $C_{28}H_{18}BO_4$     | 429,1288                | 429,1304             | -3,7           |
| <b>3</b>                                    | $C_{20}H_{11}BO_5$     | 342,0710                | 342,0705             | 1,5            |
| <b>4</b>                                    | $C_{20}H_{12}BO_4$     | 327,0842                | 327,0834             | 2,4            |
| <b>5</b>                                    | $C_{15}H_{12}BO_6$     | 299,0715                | 299,0732             | -5,7           |
| <b>6</b>                                    | $C_{18}H_{11}O$        | 243,0819                | 243,0815             | 1,6            |
| <b>7</b>                                    | $C_{10}H_6BO_3$        | 185,0418                | 185,0415             | 1,6            |



Obrázek 22: Hmotnostní spektra komplexu  $[B(DHN)_2]$ , měření přesné hodnoty  $m/z$  a MS/MS fragmentace iontů  $m/z$  485

Pro bližší určení struktury dalších iontů přítomných ve spektru byly provedeny MS/MS experimenty. V prvním experimentu byla sledována fragmentace iontu  $m/z$  677 na iont  $m/z$  327, tedy komplex  $[B(DHN)_2]^-$ . Navržená struktura sloučeniny je zobrazena na obrázku 23. Jedná se o dimer tvořený dvěma molekulami  $[B(DHN)_2]^-$  se sodným kationtem. S nejvyšší pravděpodobností se jedná o iontový asociát, vznikající pouze v ESI zdroji hmotnostního spektrometru, o čemž vypovídá i nízká hodnota kolizní energie potřebná k jeho fragmentaci na monomer.

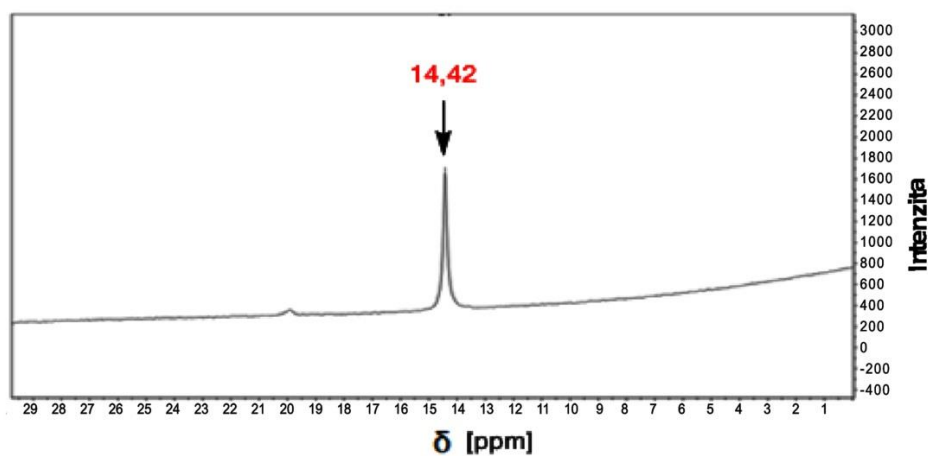
Další iont přítomný ve spektru má hodnotu  $m/z$  485, spektrum MS/MS experimentu je znázorněno na obrázku 22. Navržená struktura sloučeniny je zobrazena na obrázku 23. Hodnota kolizní energie potřebné k fragmentaci činila 50 eV, což vypovídá o kovalentní povaze interakcí ve sloučenině. Pravděpodobně se jedná molekulu, v níž jsou tři dihydroxynaftalenové ligandy vázané na jeden atom boru. Z fragmentačního spektra lze vyčíst opakované odstoupení oxidu uhelnatého. Další fragmentační mechanismy jsou komplikované a nebyly podrobněji studovány.



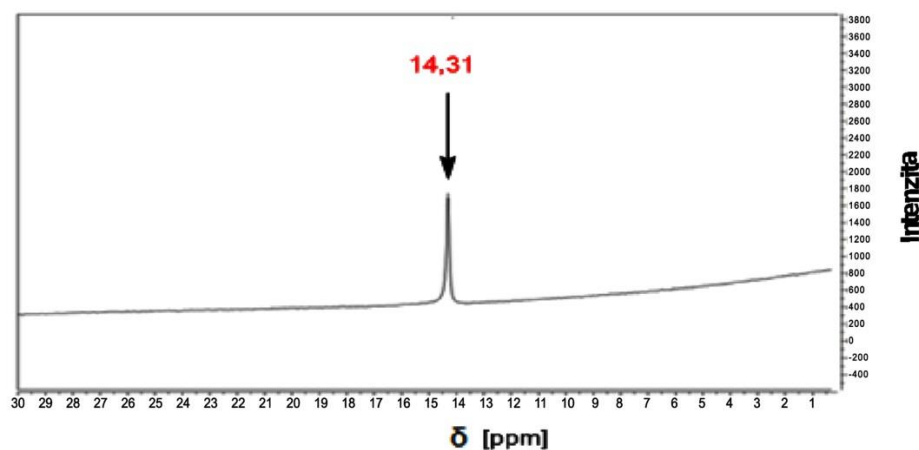
Obrázek 23: Struktura iontu o hodnotě  $m/z$  485 a  $m/z$  677

### 3.3.2 Charakterizace sloučenin boru pomocí NMR

Komplexy  $[B(PG)_2]^-$  a  $[B(DHN)_2]^-$  byly charakterizovány pomocí  $^{11}B$ ,  $^1H$  a  $^1H$ - $^1H$  COSY NMR. Experimenty poskytly informace o koordinačním čísle atomu boru, chemických posunech vodíků vázaných na aromatickém jádře a jejich vzájemných interakcích.  $^{11}B$  NMR spektra jsou znázorněna na obrázku 24 pro  $[B(PG)_2]^-$  a na obrázku 25 pro  $[B(DHN)_2]^-$ .



Obrázek 24:  $^{11}B$  NMR (400 MHz,  $ACN-d_3$ ) spektrum komplexu  $[B(PG)_2]^-$   $\delta = 14,42$  ppm

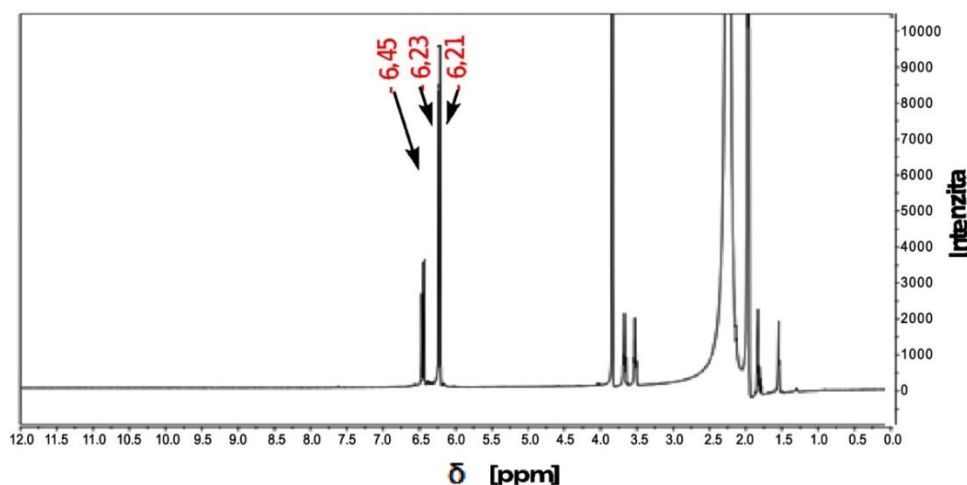


Obrázek 25:  $^{11}\text{B}$  NMR (400 MHz, ACN- $d_3$ ) spektrum komplexu  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$   $\delta = 14,31$  ppm

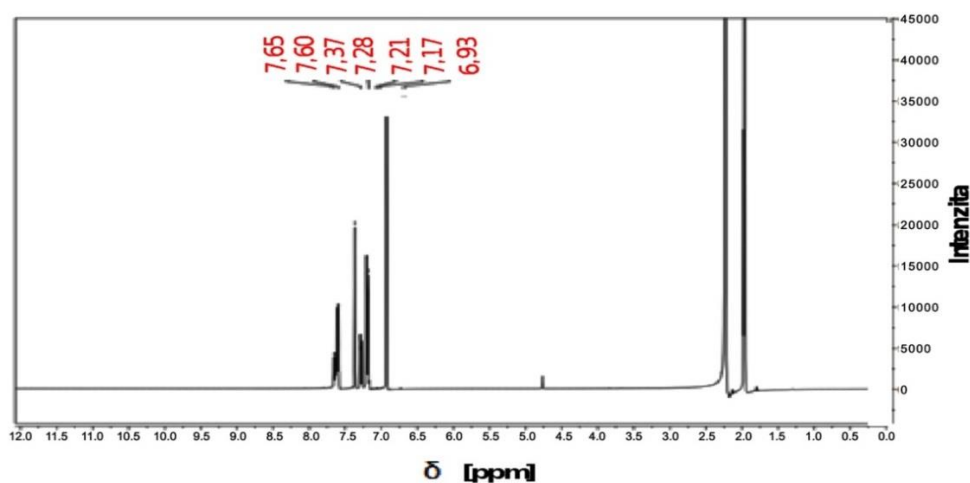
Obě  $^{11}\text{B}$  NMR spektra komplexů  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  a  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$  obsahují ostrý singlet s posunem přibližně 14 ppm. Tento posun odpovídá atomu boru koordinovanému čtyřmi atomy kyslíku.<sup>21</sup> Bor se tedy ve sloučeninách nachází jako čtyřvazný v hybridizaci  $\text{sp}^3$ .

Hodnota experimentálně změřeného posunu pro komplex  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  činí 14,42 ppm. Tato hodnota je ve srovnání s literaturou<sup>21</sup>, která uvádí posun 13,4 ppm, vyšší. Důvodem rozdílů mezi naměřenými hodnotami je s nejvyšší pravděpodobností použité rozpouštědlo. Experimenty byly prováděny v ACN, zatímco dle literatury<sup>21</sup> je pro měření použit THF.

$^1\text{H}$  NMR spektra znázorňuje obrázek 26 pro  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  a obrázek 27 pro  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$ .



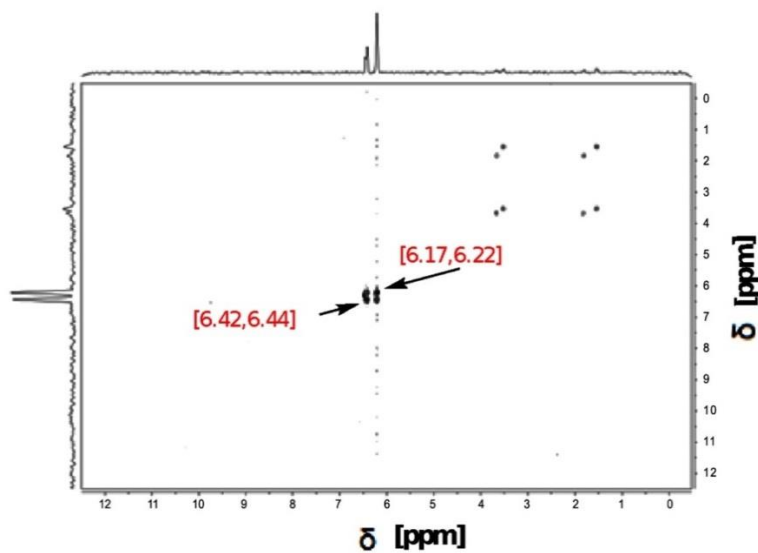
Obrázek 26:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{ACN-d}_3$ ) spektrum komplexu  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$   $\delta = 6,21\text{-}6,24$  (4H, d)  $J = 6,45$  Hz,  $\delta = 6,4$  (2H, t)  $J = 6,2$  Hz



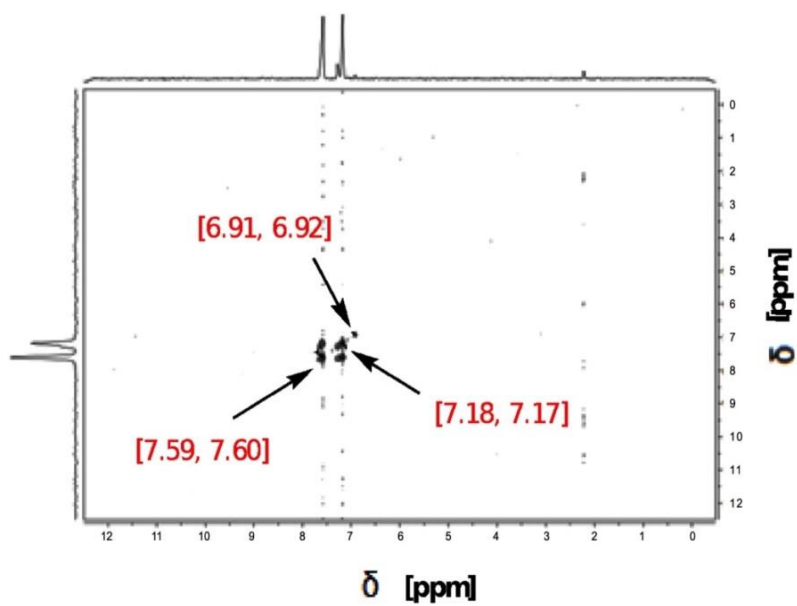
Obrázek 27:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{ACN-d}_3$ ) spektrum komplexu  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$   $\delta = 6,93$  (2H, s),  $\delta = 7,17$  (2H, 2 m),  $\delta = 7,65$  (2H, m)

Protonová spektra nevykazují dle očekávání výraznou změnu chemických posunů oproti nevázaným ligandům. Signály lze nalézt v aromatické oblasti spektra. V  $^1\text{H}$  spektru komplexu  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$ , v jehož vzorku se nachází větší množství nezreagovaného ligandu (viz kapitola 3.4.2), však lze pozorovat signály obou, jak nezreagovaného ligandu, tak komplexu boru, které se nepatrně liší ve svých chemických posunech. Konkrétně signály nezreagovaného ligandu jsou mírně posunuty k vyšším hodnotám chemického posunu. Ostatní píky s nižším chemickým posunem náleží rozpouštědlům.

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spektra jsou zobrazena na obrázku 28 pro  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  a na obrázku 29 pro  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$ .



Obrázek 28:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR (400 MHz,  $\text{ACN-d}_3$ ) spektrum komplexu  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$   $\delta = [6,17; 6,22]$ ,  $\delta = [6,42; 6,44]$



Obrázek 29:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR (400 MHz,  $\text{ACN-d}_3$ ) spektrum komplexu  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$   $\delta = [6,91; 6,92]$ ,  $\delta = [7,18; 7,17]$ ,  $\delta = [7,59; 7,60]$

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR spektra poskytují detailní informaci o vazebných interakcích protonů. Krosníky ve spektru  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  naznačují vazebnou interakci protonů aromatického jádra s posunem 6,2 ppm s protony s posunem 6,4 ppm. Výsledek koresponduje s naměřeným  $^1\text{H}$  NMR spektrem v posunech jednotlivých protonových signálů, pouze signál s posunem 6,21 ppm je velmi špatně rozlišitelný a odpovídá signálům  $^1\text{H}$  NMR spektra s posunem 6,21 a 6,23 ppm. Ve spektru lze tedy kvůli zhoršené citlivosti rozlišit pouze dva druhy protonů vázaných na aromatickém jádře pyrogallolu.

Stejně tak lze díky přítomnosti krosníku u komplexu  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$  předpokládat vazebnou interakci protonů s posunem přibližně 7,2 ppm a 7,7 ppm. Jedná se o protony vázané na sousední uhlíky naftalenového jádra. Signál s posunem 6,93 ppm odpovídá vodíkům na aromatickém jádře v největší blízkosti borového jádra. Tyto protony vazebně neinteragují s ostatními protony, neboť jsou vzdálené přes čtyři vazby (NMR COSY experimenty jsou běžně schopny rozlišit interakci přes tři vazby).

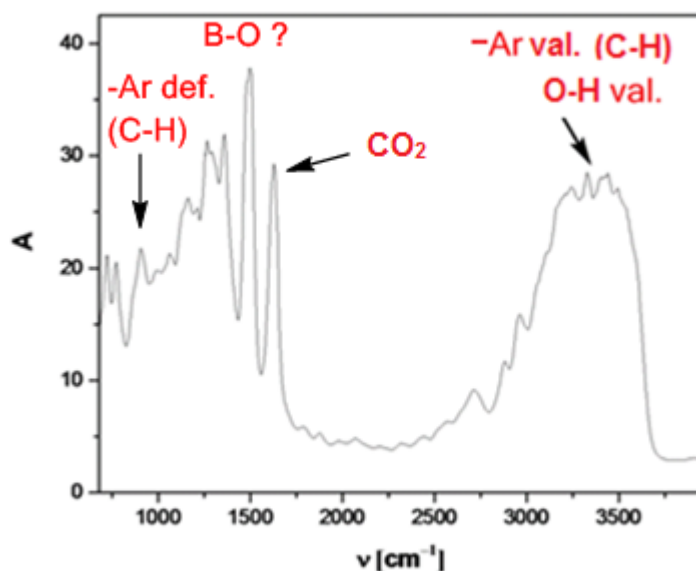
### 3.3.3 Charakterizace sloučenin boru pomocí infračervené spektrometrie

Experimentální reflexní IR spektra měřená v pevné fázi znázorňuje pro komplex  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  obrázek 30 a obrázek 31 pro komplex  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$ . Studovány byly zejména vibrační pásy B-O vazby, O-H vazby přítomné v komplexu  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  a aromatických jader. Naměřená spektra byla porovnávána se spektry získanými predikčními výpočty v programu Gaussian.

V prvním uvedeném spektru, které odpovídá komplexu  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$ , lze pozorovat charakteristické valenční O-H vibrace hydroxylové skupiny vázané na aromatickém jádře a valenční vibrace C-H vazeb aromatického jádra. Jedná se o široký pás s vlnočtem zhruba  $3000 - 3550 \text{ cm}^{-1}$ . Ve spektru lze dále nalézt deformační vibrace C-H vazeb aromatického jádra (v oblasti  $800 - 900 \text{ cm}^{-1}$ ) a vibraci oxidu uhličitého (přibližně  $1600 \text{ cm}^{-1}$ ). Vibraci bor-kyslíkové vazby v očekávané oblasti spektra nelze jasně rozeznat, protože odpovídající pás splývá s ostatními vibracemi (jedná se o oblast přibližně  $1000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ ). Je nutné podotknout, že měření vibrací v reflexním módu bývá problematické a vzhled získaných spekter výrazně závisí na krystalinitě vzorků, zbytkové vlhkosti a dalších faktorech souvisejících s morfologií. Dle predikovaného IR spektra (viz kapitola 3.1.2) pak vibrace B-O vazby molekuly v plynném stavu odpovídá vlnočtu  $1103 \text{ cm}^{-1}$ . Predikované vibrační

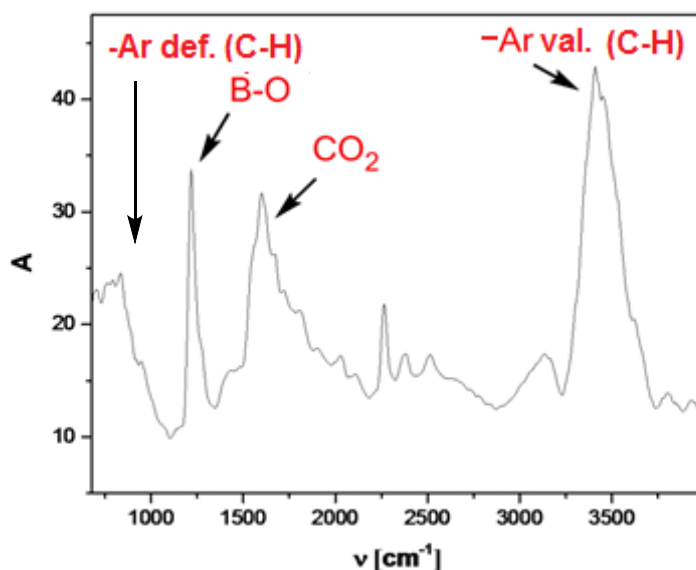
pásky O-H vazby (od 3450 - 3600  $\text{cm}^{-1}$ ) jsou ve srovnání s experimentálními hodnotami mírně posunuty k vyšším hodnotám.

Ve spektru, které náleží komplexu  $[\text{B}(\text{DHN})_2]^-$ , lze naopak velmi jasně rozeznat pás v oblasti 1214  $\text{cm}^{-1}$  odpovídající vibraci bor-kyslíkové vazby. Dále je možné pozorovat signály valenčních vibrací C-H vazeb aromatického jádra s vlnočtem přibližně 3250 - 3700  $\text{cm}^{-1}$  a přítomnost oxidu uhličitého s vlnočtem 1500 - 2000  $\text{cm}^{-1}$ . Ve spektru lze dále nalézt deformační vibrace C-H vazeb aromatického jádra (mimorovinné 800 - 900  $\text{cm}^{-1}$ ). Dle predikovaného IR spektra pak vibrace B-O vazby molekuly v plynném stavu odpovídá vlnočtu 1102  $\text{cm}^{-1}$ . Predikovaný vlnočet vibrace se tedy oproti naměřené hodnotě posunuje směrem k nižším hodnotám, což odpovídá nižší hodnotě energie vazby v plynné fázi.



Obrázek 30: FTIR spektrum komplexu  $[\text{B}(\text{PG})_2]^-$  měřené v pevné fázi (-Ar val. je valenční vibrace aromatického jádra, -Ar def. je deformační vibrace aromatického jádra, -OH val. je valenční vibrace hydroxylové skupiny)





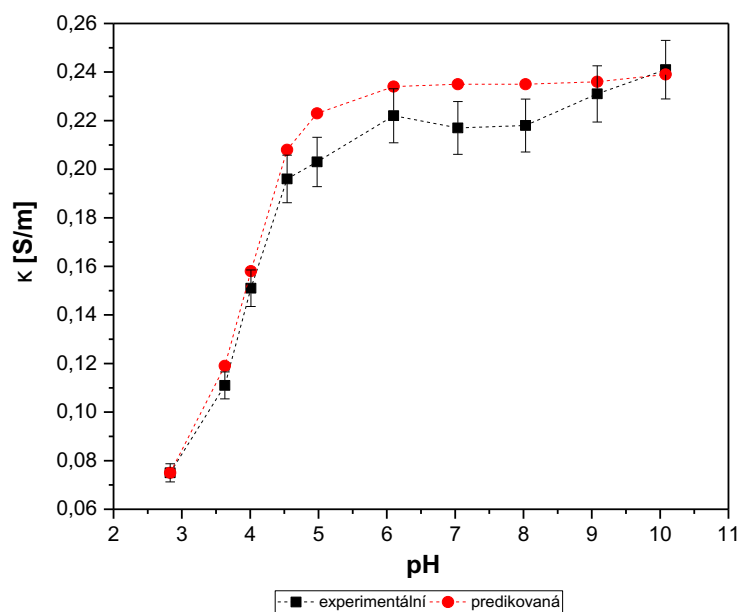
Obrázek 31: FTIR spektrum komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  měřené v pevné fázi (-Ar val. jsou valenční vibrační pásy aromatického jádra, -Ar def. je deformační vibrace aromatického jádra)

### 3.4 Separace komplexů boru ze směsi produktů reakce pomocí CE

#### 3.4.1 Ověření vlastností nosných elektrolytů o hodnotách pH v rozmezí 3,6 - 10,1

##### 1) Měření vodivosti pufrů

Hodnoty experimentálně naměřené specifické vodivosti jednotlivých mravenčnanových pufrů a predikované specifické vodivosti pomocí programu PeakMaster v závislosti na postupně se zvyšujícím pH nosného elektrolytu znázorňuje obrázek 32.



Obrázek 32: Závislost specifické vodivosti na pH pufrů, srovnání teoretických a predikovaných hodnot (experimentální body jsou průměrnými hodnotami ze tří měření, chybová úsečka je vyjádřením směrodatné odchylky)

Experimentální a predikovaná závislost hodnot specifické vodivosti na pH vykazují podobný průběh. Nejvyšší specifickou vodivost vykazují dle očekávání pufrů s nejvyšším pH, které obsahují nejvyšší koncentraci amonných iontů. Obecně bývají pro separace kapilární elektroforézou užívány pufrů s nižší vodivostí, jelikož nedochází k nadměrnému zahřívání kapiláry. Volba nižšího pH je tedy pro separaci analytů v mravenčnanovém pufru vhodnější, při použití pufrů o vyšším pH lze vysokou vodivost kompenzovat ředěním připravených pufrů.

## 2) Určení puфраční kapacity

Jednotlivé nosné elektrolyty byly dále charakterizovány určením puфраční kapacity. Tato veličina je důležitou charakteristikou nosného elektrolytu, neboť změna pH během elektroforetických separací je nežádoucí. Ideální nosný elektrolyt by vykazoval co nejvyšší hodnotu puфраční kapacity, tedy schopnosti udržet pH na konstantní hodnotě po přidání malého množství kyseliny nebo báze do roztoku.

Naměřené hodnoty pH po přidávacích odměrných roztoku NaOH/HCl shrnuje pro Metodu 1 tabulka 5 pro Metodu 2 tabulka 6. Titrační křivky, ve kterých je vynesena změna koncentrace odměrného roztoku oproti měřenému pH, shrnují pro Metodu 1

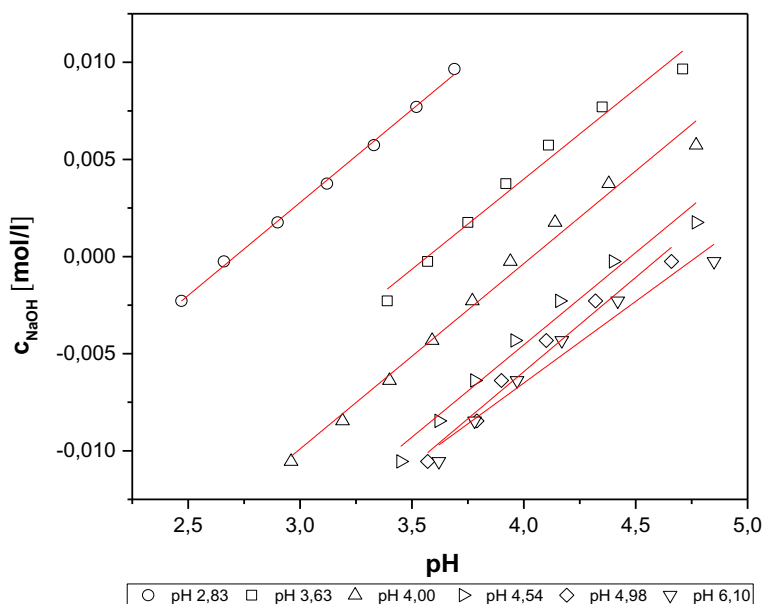
obrázek 33 (kyselé pufrů) a obrázek 34 (bazické pufrů). Pro Metodu 2 jsou titrační křivky znázorněny na obrázku 35 (kyselé pufrů) a na obrázku 36 (bazické pufrů). Závislosti obsahují pouze hodnoty kolem nulového bodu koncentrace báze/kyseliny, které bylo možné proložit lineární funkcí (v tabulkách jsou tyto hodnoty vyznačeny červeně). V tabulce 7 jsou uvedeny rovnice jednotlivých přímků pro obě metody. Obrázek 37 znázorňuje závislost experimentálně určených hodnot pufráční kapacity na pH (Metoda 1 a Metoda 2), závislost predikovaných hodnot pufráčních kapacit získaných pomocí programu PeakMaster a predikovaných hodnot pufráčních kapacit získané výpočtem dle D. van Slykea.

*Tabulka 5: Určení pufráční kapacity - Metoda 1 - koncentrace odměrných roztoků NaOH/HCl v roztocích po 200  $\mu$ l přidavcích odměrných roztoků NaOH/HCl (v hlavičce uvedeny výchozí hodnoty pH jednotlivých pufrů) a naměřené hodnoty pH roztoků při titraci 200  $\mu$ l přidavky NaOH/HCl (nulový bod přidavky NaOH/HCl odpovídá pH po přidavku 1 ml NaOH/HCl), hodnoty pH vyznačené červeně byly použity pro proložení přímkou*

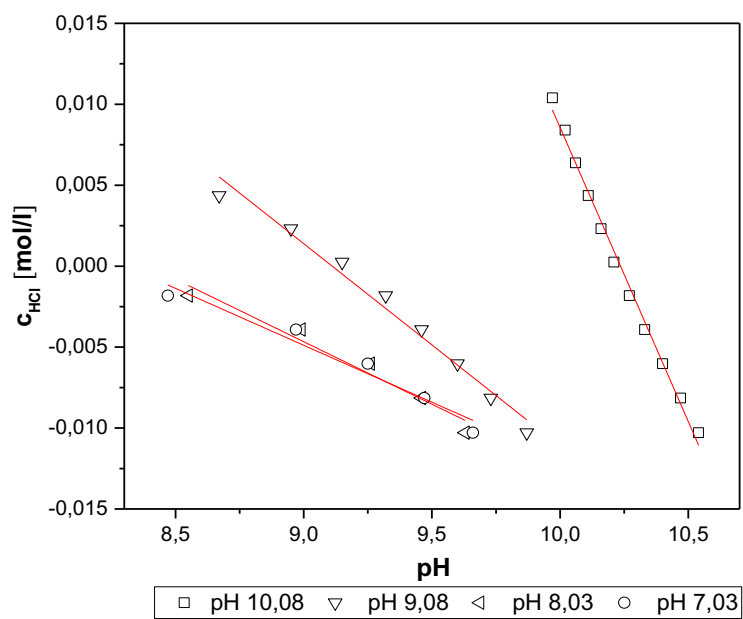
| V<br>NaOH/HCl<br>[ml] | c NaOH<br>[mol/l] | c HCl<br>[mol/l] | pH   | pH   | pH   | pH   | pH   | pH   | pH   | pH   | pH   | pH    |
|-----------------------|-------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
|                       |                   |                  | 2,83 | 3,63 | 4,00 | 4,54 | 4,98 | 6,10 | 7,04 | 8,03 | 9,08 | 10,08 |
| 0,0                   | -0,0105           | -0,0103          | 2,08 | 2,56 | 2,96 | 3,45 | 3,57 | 3,62 | 9,66 | 9,63 | 9,87 | 10,54 |
| 0,2                   | -0,0085           | -0,0081          | 2,13 | 2,73 | 3,19 | 3,62 | 3,79 | 3,78 | 9,47 | 9,46 | 9,73 | 10,47 |
| 0,4                   | -0,0064           | -0,0060          | 2,22 | 2,96 | 3,40 | 3,78 | 3,90 | 3,97 | 9,25 | 9,26 | 9,60 | 10,40 |
| 0,6                   | -0,0043           | -0,0039          | 2,33 | 3,18 | 3,59 | 3,96 | 4,10 | 4,17 | 8,97 | 8,99 | 9,46 | 10,33 |
| 0,8                   | -0,0023           | -0,0018          | 2,47 | 3,39 | 3,77 | 4,16 | 4,32 | 4,42 | 8,47 | 8,55 | 9,32 | 10,27 |
| 1,0                   | -0,0003           | 0,0003           | 2,66 | 3,57 | 3,94 | 4,40 | 4,66 | 4,85 | 5,25 | 5,73 | 9,15 | 10,21 |
| 1,2                   | 0,0018            | 0,0023           | 2,90 | 3,75 | 4,14 | 4,77 | 5,66 | 8,03 | 4,54 | 4,62 | 8,95 | 10,16 |
| 1,4                   | 0,0038            | 0,0044           | 3,12 | 3,92 | 4,38 | 7,80 | 8,60 | 8,77 | 4,21 | 4,26 | 8,67 | 10,11 |
| 1,6                   | 0,0057            | 0,0064           | 3,33 | 4,11 | 4,77 | 8,79 | 9,01 | 9,09 | 3,97 | 4,02 | 8,09 | 10,06 |
| 1,8                   | 0,0077            | 0,0084           | 3,52 | 4,35 | 7,88 | 9,14 | 9,26 | 9,32 | 3,76 | 3,81 | 5,18 | 10,02 |
| 2,0                   | 0,0097            | 0,0104           | 3,69 | 4,71 | 8,96 | 9,39 | 9,47 | 9,50 | 3,56 | 3,61 | 4,50 | 9,97  |

Tabulka 6: Určení pufrční kapacity - Metoda 2 - koncentrace odměrných roztoků NaOH/HCl v roztocích po 200  $\mu$ l přidávcích odměrných roztoků NaOH/HCl (v hlavičce uvedeny výchozí hodnoty pH jednotlivých pufrů) a naměřené hodnoty pH roztoků při titraci 200  $\mu$ l přidávky NaOH/HCl (nulový bod přidávky NaOH/HCl odpovídá pH po přidávku 1 ml NaOH/HCl), hodnoty pH vyznačené červeně byly použity pro proložení přímkou

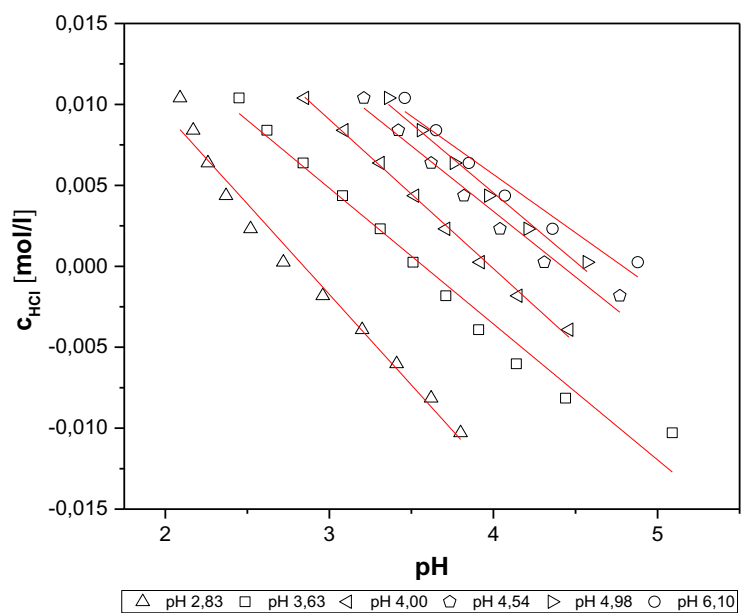
| V<br>NaOH/HCl<br>[ml] | c HCl<br>[mol/l] | c NaOH<br>[mol/l] | pH<br>2,83 | pH<br>3,63 | pH<br>4,00 | pH<br>4,54 | pH<br>4,98 | pH<br>6,10 | pH<br>7,04 | pH<br>8,03 | pH<br>9,08 | pH<br>10,08 |
|-----------------------|------------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 0,0                   | -0,0103          | -0,0105           | 3,80       | 5,09       | 9,04       | 9,32       | 9,41       | 9,43       | 3,59       | 3,65       | 4,40       | 9,84        |
| 0,2                   | -0,0081          | -0,0085           | 3,62       | 4,44       | 8,57       | 9,10       | 9,22       | 9,25       | 3,75       | 3,80       | 4,82       | 9,86        |
| 0,4                   | -0,0060          | -0,0064           | 3,41       | 4,14       | 5,18       | 8,77       | 8,96       | 9,02       | 3,93       | 3,98       | 7,74       | 9,90        |
| 0,6                   | -0,0039          | -0,0043           | 3,20       | 3,91       | 4,46       | 8,02       | 8,58       | 8,73       | 4,14       | 4,19       | 8,42       | 9,94        |
| 0,8                   | -0,0018          | -0,0023           | 2,96       | 3,71       | 4,15       | 4,77       | 6,11       | 8,15       | 4,40       | 4,47       | 8,70       | 9,98        |
| 1,0                   | 0,0003           | -0,0003           | 2,72       | 3,51       | 3,92       | 4,31       | 4,57       | 4,88       | 4,89       | 5,07       | 8,90       | 10,02       |
| 1,2                   | 0,0023           | 0,0018            | 2,52       | 3,31       | 3,71       | 4,04       | 4,21       | 4,36       | 8,00       | 8,16       | 9,06       | 10,06       |
| 1,4                   | 0,0044           | 0,0038            | 2,37       | 3,08       | 3,52       | 3,82       | 3,97       | 4,07       | 8,60       | 8,65       | 9,20       | 10,11       |
| 1,6                   | 0,0064           | 0,0057            | 2,26       | 2,84       | 3,31       | 3,62       | 3,76       | 3,85       | 8,90       | 8,92       | 9,26       | 10,17       |
| 1,8                   | 0,0084           | 0,0077            | 2,17       | 2,62       | 3,09       | 3,42       | 3,56       | 3,65       | 9,11       | 9,13       | 9,44       | 10,22       |
| 2,0                   | 0,0104           | 0,0097            | 2,09       | 2,45       | 2,85       | 3,21       | 3,36       | 3,46       | 9,30       | 9,30       | 9,56       | 10,29       |



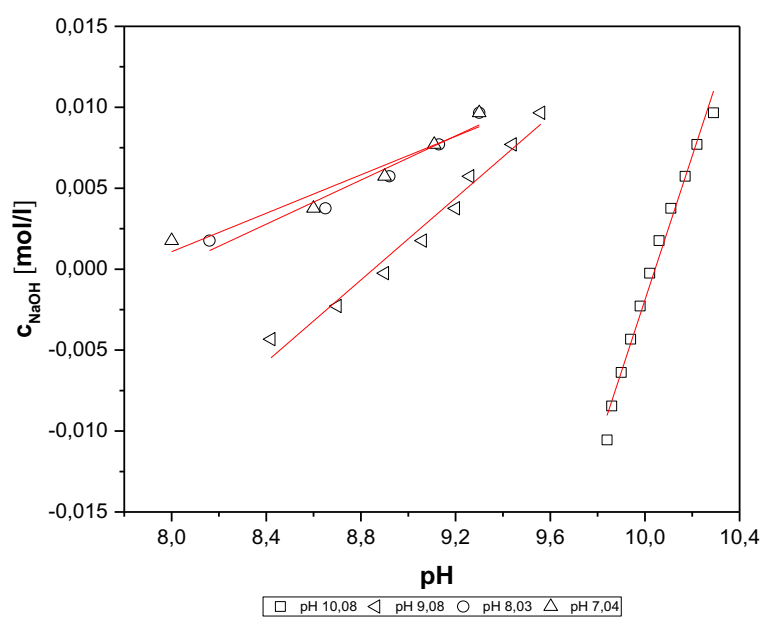
Obrázek 33: Metoda 1 - titrační křivky kyselých mravenčnanových pufrů



Obrázek 34: Metoda 1 - titrační křivky bazických mravenčnanových pufrů



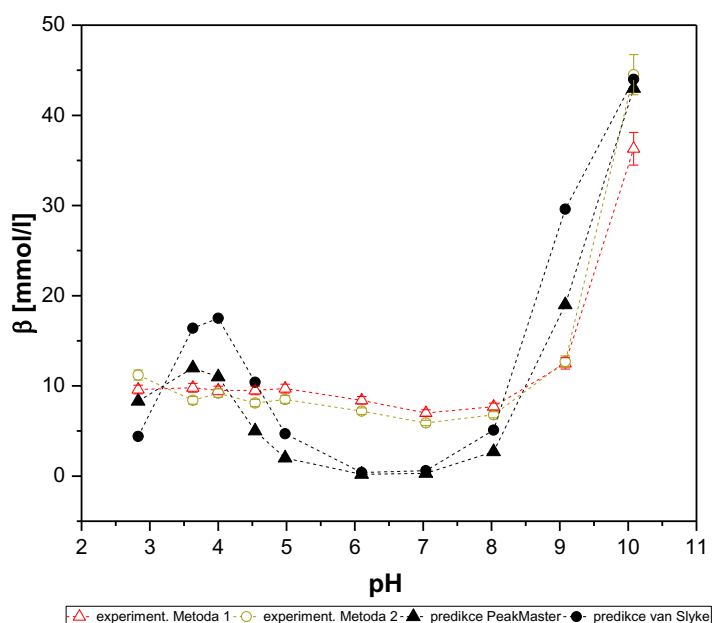
Obrázek 35: Metoda 2 - titrační křivky kyselých mravenčnanových pufrů



Obrázek 36: Metoda 2 - titrační křivky bazických mravenčnanových pufrů

Tabulka 7: Rovnice přímek získané lineárním proložením titračních křivek pro Metodu 1 a Metodu 2

| pH    | Rovnice přímky          |                         |
|-------|-------------------------|-------------------------|
|       | Metoda 1                | Metoda 2                |
| 2,83  | $y = 0,0096x - 0,0259$  | $y = -0,0112x + 0,0318$ |
| 3,63  | $y = 0,0093x - 0,0331$  | $y = -0,0084x + 0,0300$ |
| 4,00  | $y = 0,0095x - 0,0385$  | $y = -0,0092x + 0,0367$ |
| 4,54  | $y = 0,0095x - 0,0425$  | $y = -0,0081x + 0,0357$ |
| 4,98  | $y = 0,0097x - 0,0447$  | $y = -0,0085x + 0,0387$ |
| 6,10  | $y = 0,0084x - 0,0401$  | $y = -0,0072x + 0,0345$ |
| 7,04  | $y = -0,007x + 0,0584$  | $y = 0,0059x - 0,0464$  |
| 8,03  | $y = -0,0077x + 0,0648$ | $y = 0,0068x - 0,0545$  |
| 9,08  | $y = -0,0125x + 0,1141$ | $y = 0,0127x - 0,1121$  |
| 10,08 | $y = -0,0363x + 0,3719$ | $y = 0,0445x - 0,4473$  |



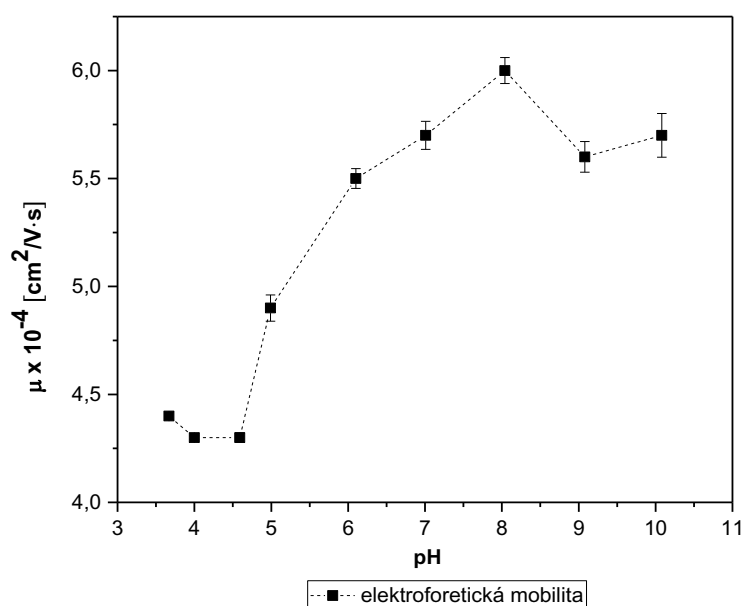
Obrázek 37: Experimentální závislosti pufrací kapacity pufrů na pH určené Metodou 1 a Metodou 2, predikované hodnoty pufrací kapacity určené programem PeakMaster a dle D. van Slykea v závislosti na pH (experimentální body jsou průměrnými hodnotami ze tří měření, chybová úsečka je 5% odchýlení od průměru)

Experimentální hodnoty pufrací kapacity určené Metodou 1 a Metodou 2 se vzájemně poměrně shodují. Výraznější odchýlení od predikovaných hodnot lze pozorovat u pufru s hodnotou pH 3,5. Zde je predikovaná pufrací kapacita vyšší než u experimentálních výsledků. Naopak při dalším zvyšování pH klesají predikované hodnoty pufrací kapacity více než hodnoty získané experimentálně. Nejvyšší hodnotu této veličiny vykazuje nosný elektrolyt o pH 10,08. Praktická měření ukázala, že pufrací kapacita má poměrně vysokou hodnotu i mimo oblast pH odpovídající  $pK_a$  kyseliny mravenčí a  $pK_b$  amoniaku. Rozdíly v chování mohou být způsobeny například rozpouštěním oxidu uhličitého v roztoku, tedy vznikem dalšího pufracího systému.

## 1) Určení elektroforetické mobility EOF markeru v nosných elektrolytech o různých hodnotách pH

Další charakteristikou mravenčnanového pufru je hodnota elektroosmotické mobility generované v nepokryté křemenné kapiláře. Mobilita EOF markeru závisí na pH roztoku, které ovlivňuje deprotonaci silanolových skupin na kapiláře. Také je ovlivňována iontovou silou roztoku, neboť při vysokých koncentracích nosného elektrolytu brání migraci EOF markeru ostatní ionty přítomné v roztoku.

Experimentálně určené hodnoty elektroosmotických mobilit EOF markeru v závislosti na pH mravenčnanových pufrů jsou vyneseny v grafu na obrázku 38.



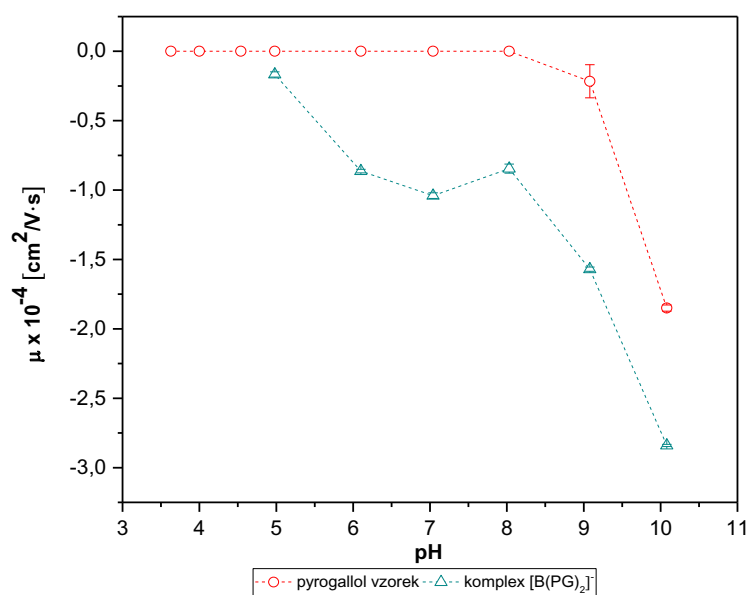
Obrázek 38: Elektroforetická mobilita EOF markeru v závislosti na pH jednotlivých pufrů (experimentální body jsou průměrnými hodnotami ze tří měření, chybová úsečka je vyjádřením směrodatné odchylky)

Závislost elektroosmotické mobility na pH má očekávatelný průběh. S rostoucím pH klesá migrační čas EOF markeru a roste elektroosmotická mobilita v důsledku zvyšující se deprotonace silanolových skupin křemenné kapiláry způsobujících elektroosmózu. Při pH 8 se však začíná uplatňovat i vysoká iontová síla roztoku a elektroosmotický tok slábne.

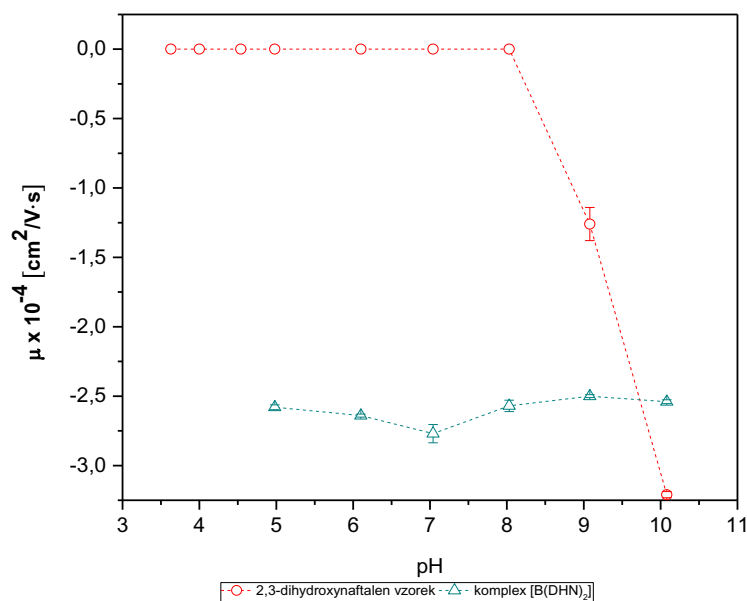


## 2) Závislost elektroforetických mobilit komplexů boru a ligandů na pH nosného elektrolytu

Pro separaci všech hlavních komponent reakčních směsí při přípravě komplexů bylo třeba zvolit optimální pH, při němž složky roztoku migrují jako nabitě ionty s dostatečně rozdílnou efektivní elektroforetickou pohyblivostí a jsou tedy vzájemně separovány a dostatečně odděleny i od elektroneutrálního EOF markeru. Hodnoty efektivních elektroforetických mobilit volných ligandů a vzniklých komplexů v závislosti na pH nosného mravenčnanového elektrolytu znázorňuje obrázek 39 pro komplex boru s pyrogallem a obrázek 40 pro komplex boru s 2,3-dihydroxynaftalenem.



Obrázek 39: Závislost elektroforetické mobility standardu pyrogallolu a jednotlivých komponent vzorku 2B na pH jednotlivých mravenčnanových pufrů (experimentální body jsou průměrnými hodnotami ze tří měření, chybová úsečka je vyjádřením směrodatné odchylky)



Obrázek 40: Závislost elektroforetické mobility standardu 2,3-dihydroxynaftalenu a jednotlivých komponent vzorku H na pH jednotlivých mravenčnanových pufrů (experimentální body jsou průměrnými hodnotami ze tří měření, chybová úsečka je vyjádřením směrodatné odchylky)

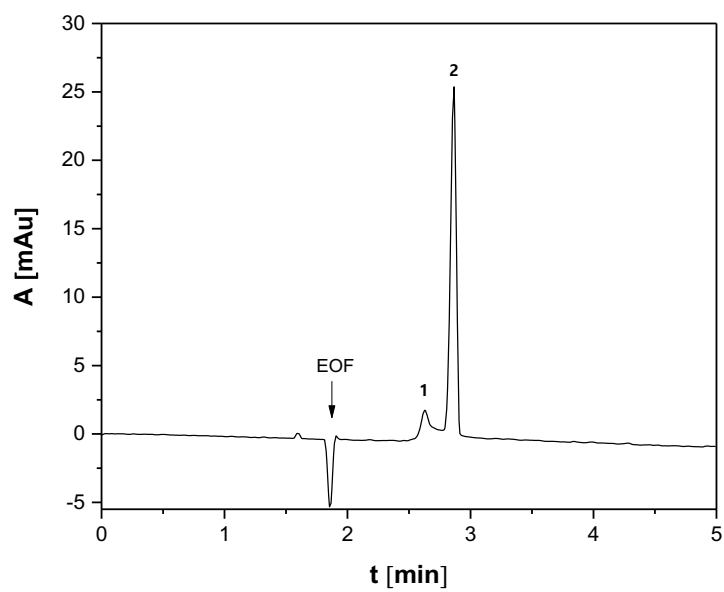
Z Obrázek 39 vyplývá, že pyrogallol je deprotonován a tedy oddělen od EOF markeru (thimočoviny) při použití nosných elektrolytů o pH 9 a 10. To je v souladu se známou hodnotou  $pK_a = 9,01$  dle literatury<sup>72</sup>. Komplex boru  $[B(PG)_2]^-$  se chová jako slabý elektrolyt se sigmoidním průběhem mobilitní závislosti. To je zjevně dáno deprotonací volných hydroxylových skupin, které se nepodílejí na koordinačně kovalentních vazbách v komplexu. Z mobilitních závislostí na obrázku 40 vyplývá, že 2,3-dihydroxynaftalen disociuje a je prokazatelně separován od EOF markeru v nosných elektrolytech nad pH 9. Komplex  $[B(DHN)_2]^-$  se chová jako silný elektrolyt a migruje jako aniont s prakticky konstantní zápornou hodnotou elektroosmotické mobility. Důvodem je zjevně absence volných hydroxylových skupin na jádře dihydroxynaftalenu po navázání do komplexu.

### 3.4.2 Vzorová separace sloučenin pomocí CE-UV

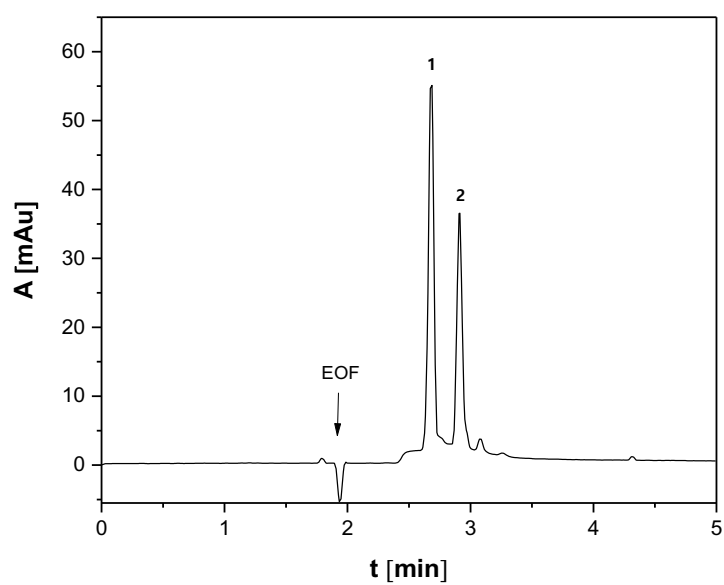
Pro separaci majoritních sloučenin přítomných v reakční směsi při přípravě komplexů byl zvolen 10 mM mravenčnanový pufr o pH 10,08. Tento pufr vykazuje vysokou pufrací kapacitu a schopnost separovat všechny hlavní komponenty směsi u obou komplexů boru (komplex a nezreagovaný ligand). Má vhodnou vodivost, při vloženém separačním napětí 25 kV byl pro danou délku kapiláry generován proud 14  $\mu$ A. Tento nosný elektrolyt byl použit ve všech následujících elektroforetických měřeních. Charakteristiky jednotlivých komponent směsi naměřené pomocí CE-UV jsou uvedeny v tabulce 8, vzorové elektroferogramy znázorňuje obrázek 41 pro vzorek 2B a obrázek 42 pro vzorek H.

Tabulka 8: Průměrné hodnoty ze tří měření a směrodatné odchylky elektroforetických charakteristik komplexu  $[B(PG)_2]^-$ , pyrogalolového ligandu a komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  a 2,3-dihydroxynaftalenu ze tří měření

| Sloučenina     | Veličina  | Migrační čas<br>[min] | Plocha<br>[mAU·min] | Výška píku<br>[mAU] | Šířka píku<br>[min] | Plocha<br>píku [%] | Symetrie<br>píku |
|----------------|-----------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| PG             | $\bar{x}$ | 2,64                  | 8,67                | 1,73                | 0,09                | 7,65               | 1,29             |
|                | SD        | 0,01                  | 1,66                | 0,51                | 0,02                | 2,17               | 0,57             |
| $[B(PG)_2]^-$  | $\bar{x}$ | 2,88                  | 106,83              | 30,20               | 0,06                | 92,35              | 1,26             |
|                | SD        | 0,01                  | 14,86               | 3,70                | 0,01                | 2,17               | 0,12             |
| $[B(DHN)_2]^-$ | $\bar{x}$ | 2,69                  | 166,03              | 55,34               | 0,05                | 56,59              | 0,99             |
|                | SD        | 0,01                  | 6,36                | 4,91                | 0,00                | 7,40               | 0,07             |
| DHN            | $\bar{x}$ | 2,91                  | 110,12              | 34,77               | 0,05                | 37,82              | 0,96             |
|                | SD        | 0,01                  | 4,62                | 0,31                | 0,00                | 2,34               | 0,06             |



Obrázek 41: Vzorové elektroferogramy vzorku  $2B^-$  měřené v 10 mM mravenčnanovém pufru o pH 10,08: 1- nezreagovaný pyrogallolový ligand, 2-komplex  $[B(PG)_2]^-$ , měřeno při  $\lambda_{max} [B(PG)_2]^-$  210 nm



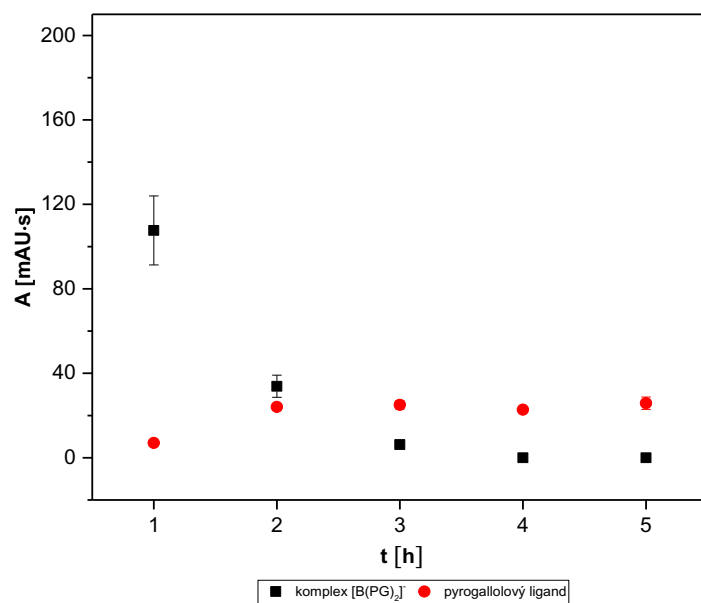
Obrázek 42: Vzorové elektroferogramy vzorků H měřené v 10 mM mravenčnanovém pufru o pH 10,08: 1- komplex  $[B(DHN)_2]^-$ , 2- nezreagovaný 2,3-dihydroxynaftalenový ligand, měřeno při  $\lambda_{max} [B(DHN)_2]^-$  236 nm

Při použití optimalizovaných podmínek je dosahováno dostatečně vysoké separační účinnosti. Píky obou komplexů i ligandů poměrně úzké, symetrické a ostré a za uvedených podmínek migrují do třetí minuty. V případě vzorku 2B je poměrově více zastoupen komplex  $[B(PG)_2]$  s procentuálním zastoupením získaným integrací ploch píků 92,35 %, ligand je přítomen pouze ve velmi malém množství (procentuální zastoupení 7,65 %). V případě vzorku H je produkt  $[B(DHN)_2]$  znečištěn nezreagovaným ligandem více. Procentuální zastoupení komplexu ve vzorku je 56,59 % a ligandu 37,82 %.

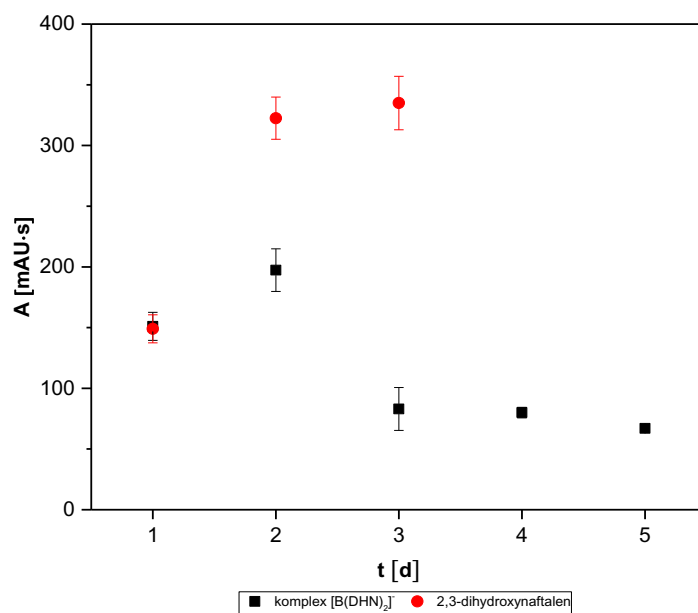
### **3.4.3 Stability a rovnováhy komplexů a nezreagovaných ligandů v roztocích**

V této kapitole byla studována stabilita připravených komplexu a volných ligandů ve vodných roztocích s přidavkem acetonitrilu a v roztoku čistého acetonitrilu. Acetonitril byl ke vzorkům a k vodným roztokům přidáván díky schopnosti komplexu rozpouštět. Bylo předpokládáno, že případný rozklad komplexu je spojen s nárůstem koncentrace volného ligandu. K degradaci komplexu mohou přispět případně i další degradační mechanismy spojené s oxidací či ligandovou výměnou.

Grafy závislosti koncentrace komplexu a ligandu na čase ve vodně-acetonitrilovém roztoku ve směsném poměru ACN/H<sub>2</sub>O (2/3 v/v) znázorňuje pro komplex  $[B(PG)_2]$  obrázek 43 a pro komplex  $[B(DHN)_2]$  obrázek 44.



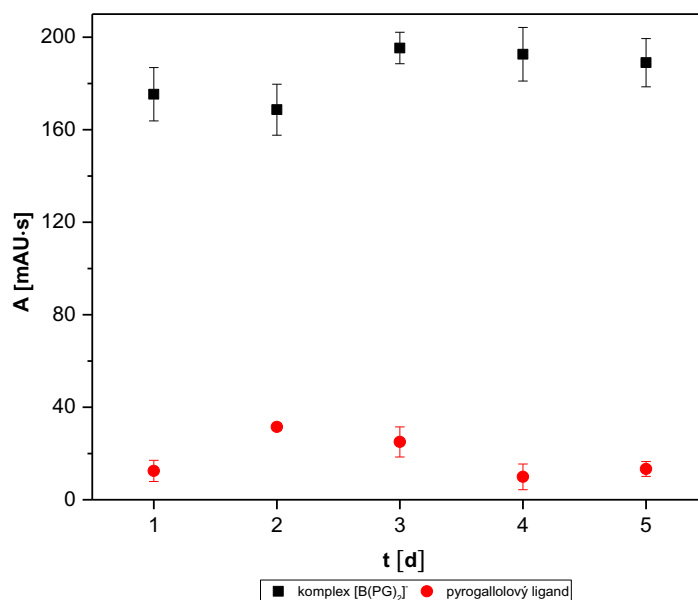
Obrázek 43: Stabilita komplexu  $[B(PG)_2]^-$  ve vodně-acetonitrilovém prostředí ACN/H<sub>2</sub>O (2/3 v/v) (experimentální body jsou průměrnými hodnotami ze tří měření, chybová úsečka je vyjádřením směrodatné odchylky)



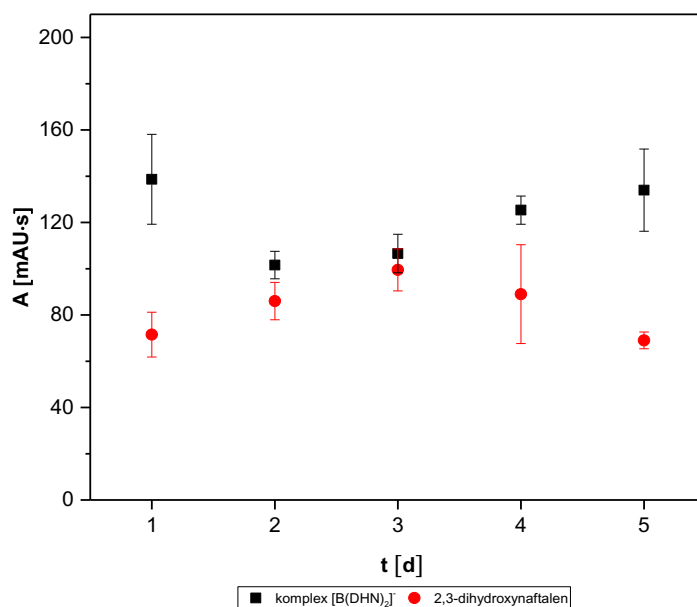
Obrázek 44: Stabilita komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  vodně-acetonitrilovém prostředí ACN/H<sub>2</sub>O (2/3 v/v) (experimentální body jsou průměrnými hodnotami ze tří měření, chybová úsečka je vyjádřením směrodatné odchylky)

Ve vodných roztocích s přidavkem acetonitrilu vykazuje výraznou nestabilitu především komplex  $[B(PG)_2]^-$ , jenž se prakticky úplně rozkládá v průběhu několika hodin. Zároveň lze pozorovat mírný nárůst plochy pyrogallolového ligandu jako primárního produktu při rozkladu komplexu  $[B(PG)_2]^-$ . Komplex  $[B(DHN)_2]^-$  vykazuje ve vodných roztocích s přidavkem acetonitrilu podstatně větší stabilitu. Jeho koncentrace se pouze mírně snižuje a neklesá na nulu ani po pěti dnech. Plocha píku ligandu dihydroxynaftalenu byla odečítána pouze do třetího dne měření, poté se tvar píku značně deformoval, což znemožnilo přesné určení plochy.

Grafy závislosti koncentrace komplexu a ligandu na čase v acetonitrilu znázorňuje pro komplex  $[B(PG)_2]^-$  obrázek 45 a pro komplex  $[B(DHN)_2]^-$  obrázek 46.



Obrázek 45: Stabilita komplexu  $[B(PG)_2]^-$  v acetonitrilu (experimentální body jsou průměrnými hodnotami ze tří měření, chybová úsečka je vyjádřením směrodatné odchylky)



Obrázek 46: Stabilita komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  v acetonitrilu (experimentální body jsou průměrnými hodnotami ze tří měření, chybová úsečka je vyjádřením směrodatné odchylky)

Výraznou stabilitu vykazují oba komplexy i volné ligandy v čistém acetonitrilu. Během pěti dnů se plochy pyrogallolu a komplexu  $[B(PG)_2]^-$  téměř nemění. Plochy píků komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  a dihydroxynaftalenu se mění více, přesto však jejich hodnota během pěti dnů výrazněji neklesá. Připravené komplexy i volné ligandy jsou v prostředí čistého acetonitrilu stabilnější díky absenci rozpuštěného kyslíku.

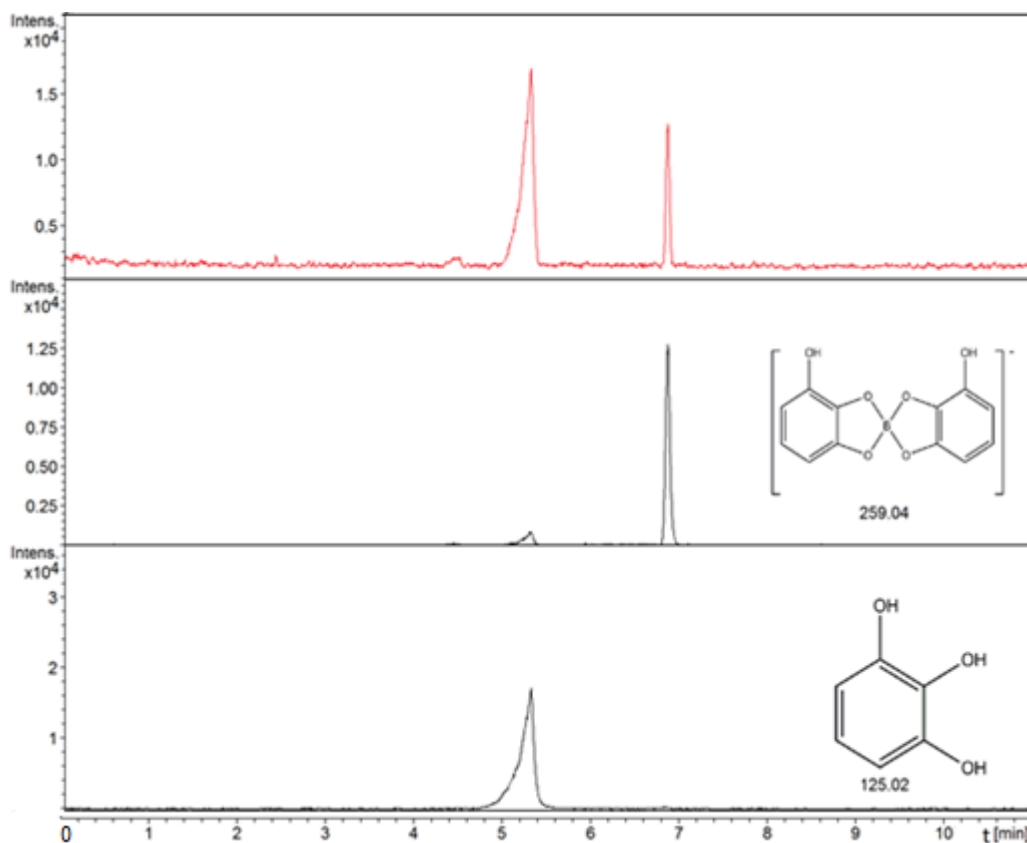
### 3.5 Kapilární elektroforéza s hmotnostní detekcí

Podmínky zvolené pro CE-UV byly úspěšně užity i pro separaci pomocí CE-MS. Touto technikou bylo možno ověřit strukturní identitu a pořadí migrace analytů neboť pro syntetizované komplexy neexistují standardy. Zároveň se jedná o výrazně citlivější metodu detekce, která může přinést hlubší informace o minoritních složkách vzorku. Ukázkový elektroferogram vzorku 2B (komplexu  $[B(PG)_2]^-$ ) je znázorněn na obrázku 47. Měření vzorku H, tedy komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  z časových důvodů nebylo uskutečněno.

Z elektroferogramu je zřejmé, že dominantní složky vzorku jsou komplex a nezreagovaný ligand. Měření ověřilo, že za daného pH jednotlivé analyty migrují v pořadí



ligand (5,2 minuty) a následně komplex  $[B(PG)_2]^-$  (7,1 minuty). Migrační časy složek jsou ale ve srovnání s CE-UV delší (separace obou komponent probíhaly pomocí CE-UV do třetí minuty, pro separaci CE-MS je třeba 8 minut).



Obrázek 47: Ukázkový CE-MS elektroferogram vzorku 2B, červeně vyznačen celkový iontový elektroferogram, černě vyznačeny extrahované iontové elektroferogramy

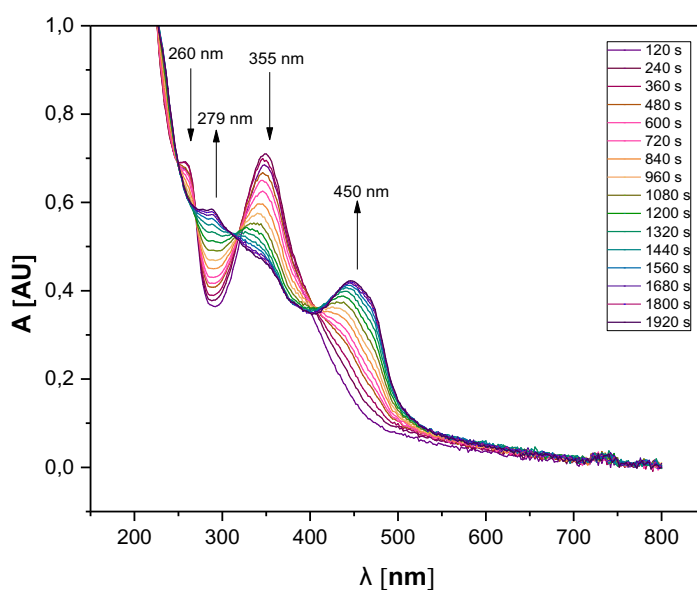
### 3.6 Studium oxidace pyrogallolu

Během experimentů s přípravou pyrogallolového komplexu bylo možné si povšimnout zabarvování reakčních směsí do hnědé barvy. Tento jev je způsoben oxidací samotného ligandu za tvorby produktů absorbujících ve viditelné oblasti spektra. Reakce probíhá zejména v bazických roztocích v důsledku absorpce kyslíku rozpuštěného v roztoku molekulou pyrogallolu. V literatuře bývá popisována jako takzvaná autooxidace pyrogallolu (viz kapitola 1.1.8) a v našem případě je významnou konkurenční reakcí snižující koncentraci volného pyrogallolu při komplexotvorné reakci. V této kapitole je experimentálně studován

rozklad pyrogallolu v bazickém prostředí mravenčnanového pufru o pH 10,08 pomocí UV-VIS absorpční spektrometrie a CE-UV techniky.

### 3.6.1 Sledování oxidace pyrogallolu pomocí UV-VIS absorpční spektrometrie

V experimentu byly pomocí UV-VIS absorpční spektrometrie sledovány časové změny absorpčních spekter pyrogallolu v bazickém roztoku o pH 10,08. Na základě předběžných vizuálních pozorování byl očekáván růst absorpčních maxim ve viditelné části spektra. Z absorpčních spekter uvedených na obrázku 48 je zjevné, jak je proces oxidace pyrogallolu komplikovaný. Určení čtyř isobestických bodů dokazuje rovnováhu mezi pěti sloučeninami.



Obrázek 48: Vybraná UV-VIS spektra roztoku  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pyrogallolového ligandu s přidavkem bazického mravenčnanového pufru naměřená ve dvouminutových intervalech během dvou hodin

Ihned po přidavku báze do roztoku lze pozorovat výrazný pokles absorpčních maxim o vlnových délkách 260 nm a 355 nm. Maxima s vlnovou délkou 279 a 450 nm naopak v čase narůstají a zjevně přísluší zbarveným oxidačním produktům. Vlnové délky pozorovaných absorpčních maxim a isosbestických bodů shrnuje tabulka 9.

Literatura<sup>24</sup> popisuje oxidaci pyrogallolu (0,1 mM) ve fosfátovém pufru (50mM) o pH 8. V pětiminutových intervalech byl pozorován vzrůst absorbance v maximu 440 nm. Dále bylo ve spektru sledováno absorpční maximum o vlnové délce 600 nm, které nejprve prudce vzrostlo a následně s rostoucím časem klesalo. Ve spektru byl indikován isosbestický bod o vlnové délce 480 nm. Dle uvedené literatury existuje v roztoku rovnováha mezi dvěmi sloučeninami. Specie o vlnové délce 600 nm pravděpodobně odpovídá chinonu purpurogallinu. Specie s absorpčním maximem o vlnové délce 440 nm potom s velkou pravděpodobností odpovídají derivátům chinonu purpurogallinu.

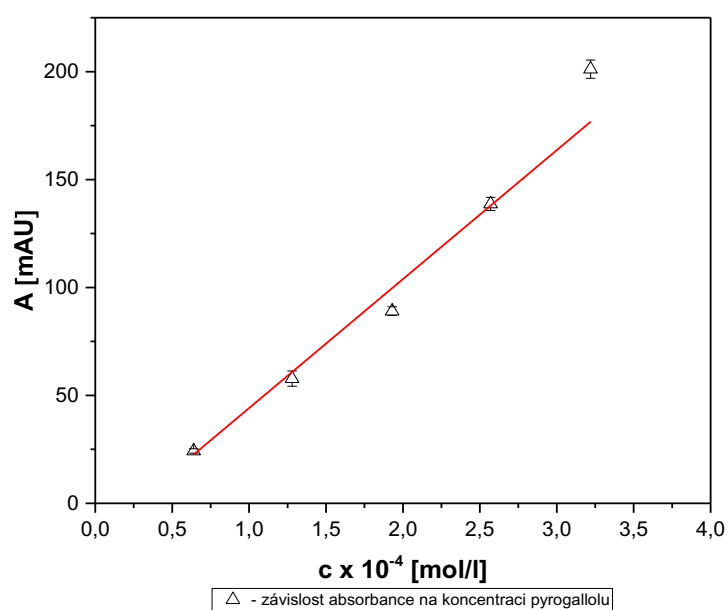
Ve srovnání s tímto experimentem bylo v experimentálně určeném spektru v této diplomové práci registrováno více absorpčních maxim a isosbestických bodů. Maximum 260 nm odpovídá pyrogallolovému ligandu a v čase klesá v důsledku jeho dekompozice. Maximum v oblasti 600 nm, které literatura<sup>24</sup> popisuje jako oxidační prekurzor pro tvorbu specií s vlnovým maximem 440 nm, nebylo ve spektru nalezeno. Specie s vlnovou délkou 440 nm mohou korespondovat se sloučeninami absorbujícími při vlnové délce 450 nm, jednalo by se tedy o deriváty chinonu purpurogallinu (viz Obrázek 8). Rozdíly mezi spektry zřejmě vznikají v důsledku použití odlišného pufru a pH, jehož hodnota může ovlivňovat jak rychlost, tak i reakční mechanismus oxidace.

Tabulka 9: Vlnové délky absorpčních maxim v průběhu času rostoucích/klesajících, vlnové délky isosbestických bodů

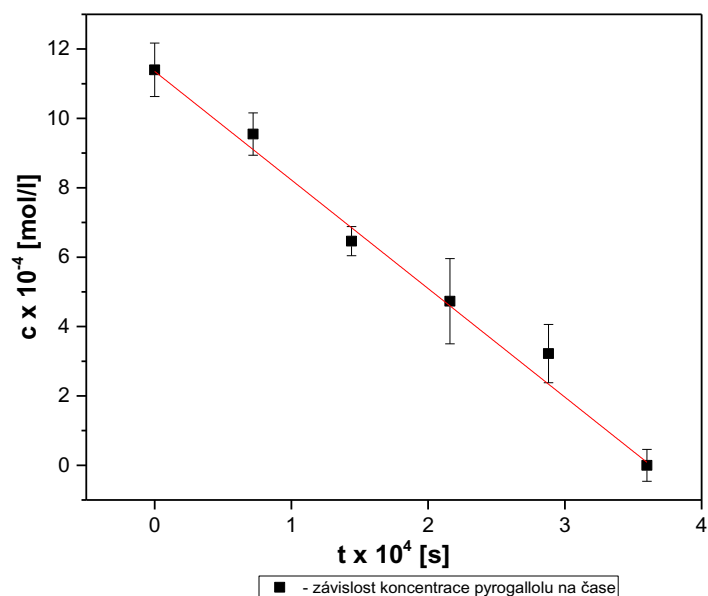
|                                      |     |     |     |     |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| <b>Maximum v čase rostoucí [nm]</b>  | 279 | 450 |     |     |
| <b>Maximum v čase klesající [nm]</b> | 260 | 355 |     |     |
| <b>Isosbestické body [nm]</b>        | 253 | 270 | 321 | 413 |

### 3.6.2 Sledování oxidace pyrogallolu pomocí CE-UV

V experimentu byl pomocí CE-UV studován rozklad pyrogallolu sledováním úbytku plochy píku pyrogallolu během 24 hodin. Nejprve byl sestaven kalibrační graf (viz obrázek 49) umožňující určit koncentraci pyrogallolu v roztoku během vlastního kinetického měření. Přepočtená závislost úbytku koncentrace pyrogallolu v čase je uvedena na obrázku 50.



Obrázek 49: Kalibrační závislost absorpance pyrogallolového ligandu na jeho koncentraci v roztoku, proložení přímkou  $y = 61288x - 13,44$



Obrázek 50: Určení rychlostní konstanty - koncentrace pyrogallového ligandu v roztoku v závislosti na čase, proložení přímkou  $y = -3,01 \cdot 10^{-8}x + 1,10 \cdot 10^{-3}$

Experimentální body byly proloženy přímkou s určenou hodnotou koeficientu determinace 0,98. Plocha píku pyrogallolu a tedy i koncentrace klesá lineárně. Z hlediska reakční kinetiky se jednalo o kinetiku 0. řádu, kdy se rychlost přeměny látky se zvyšující se koncentrací nemění. Rychlostní konstanta takovéto reakce pak odpovídá směrnici přímky závislosti, tedy  $3,01 \cdot 10^{-8}$  mol/l·s. Hodnoty směrnic a úseků přímek kalibrační a kinetické závislosti jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10: Směrnice a úseky přímek proložených kalibrační závislosti a závislosti koncentrace pyrogallolu na čase

| Závislost                   | Směrnice                        | Úsek                         | Koeficient determinace |
|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Kalibrační závislost        | 61288 [mAU· l/mol]              | -13,44 [mAU]                 | 0,97                   |
| Určení rychlostní konstanty | $-3,01 \cdot 10^{-8}$ [mol/s·l] | $1,10 \cdot 10^{-3}$ [mol/l] | 0,98                   |

## 4 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala arylspiroboráty - komplexními sloučeninami boru s aromatickými ligandy odvozenými od katecholu, které jsou využitelné jako potencionální farmaka k léčbě rakovinných onemocnění a v dalších výzkumných a průmyslových aplikacích. Jako ligandy vázané na bor byly užity pyrogallol a 2,3-dihydroxynaftalen.

Struktury obou připravovaných komplexů byly modelované pomocí programu Gaussian, díky čemuž byla získána předběžná představa o geometrii jejich molekul a vypočteny přesné úhly a délky jednotlivých vazeb. Molekulové modelování vyloučilo potenciálně možnou *cis-trans* izomerii borového komplexu s pyrogallem. Dále byla výpočetně predikována IR spektra v plynné fázi, která byla následně porovnána se spektry naměřenými.

V práci byly optimalizovány podmínky přípravy obou komplexů. Podařilo se navrhnout postupy, při kterých příslušný komplex vypadal z reakční směsi ve formě precipitátu. Jako nejvhodnější se pro komplex boru s pyrogallem jeví reakce tetrahydridoboritanu sodného s pyrogallem v roztoku THF. Připravený komplex je v tomto rozpouštědle velmi dobře rozpustný a po reakci jej bylo nutné z roztoku vysrážet přidávkem 1,2-dichlorethanu. Optimální přípravou pro komplex boru s 1,2-dihydroxynaftalem je reakce z tetraboritanu sodného s daným ligandem ve vodě. Veškeré pokusy o rekrystalizaci produktů z vodných a vodně methanolických roztoků, jakož i z bezvodého methanolu a THF nebyly úspěšné.

Součástí práce byla také podrobná strukturní charakterizace jednotlivých komplexů boru s pomocí hmotnostní spektrometrie. Spektra nízkého rozlišení umožnila potvrdit přítomnost vznikajícího komplexu v reakčních směsích a ve vysrážených pevných produktech. Spektra vysokého rozlišení umožnila určit přesnou molekulovou hmotnost komplexů, určit jejich elementární složení a na základě charakteristického izotopového profilu potvrdit přítomnost atomu boru ve struktuře. Provedené MS/MS experimenty umožnily studovat fragmentační mechanismy komplexů a ostatních doprovodných látek vznikajících při přípravě. Další technikou, která umožnila popsat strukturu vybraných komplexů je nukleární magnetická rezonance. Pomocí  $^{11}\text{B}$  NMR byla ve vzorcích potvrzena přítomnost čtyřvázného boru.  $^1\text{H}$  NMR spektra poskytla signály v aromatické oblasti chemického posunu, jenž se nepatrně lišily v hodnotách chemického posunu oproti volným ligandům. Pomocí  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR byla popsána vazebná interakce protonů na aromatických jádrech sloučenin. IR spektra připravených komplexů, měřená v reflexním

módu prokázala přítomnost hydroxylové skupiny na aromatickém jádře komplexu  $[B(PG)_2]^-$ . Ve spektru komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  byla změřena vibrace vazby B-O s vlnočtem  $1214\text{ cm}^{-1}$ . Experimentální IR spektra byla porovnána s predikčními spektry pro plynnou fázi, vypočtenými programem Gaussian.

Práce se dále zabývala vývojem separační metody pro hodnocení čistoty připravených komplexů boru v reakční směsi a po jejich izolaci z roztoku. Byly paralelně optimalizovány podmínky separace v CE-UV a CE-MS s cílem maximálně sjednotit použité experimentální podmínky obou technik. Byl optimalizován výběr společného nosného elektrolytu, jako nejvhodnější se jevílo užití 10 mM mravenčnanového pufru o pH 10,08. Tento elektrolyt vykazuje vysokou puфраční kapacitu a schopnost separovat všechny hlavní složky reakční směsi, je bez problémů použitelný pro hmotnostní spektrometr jako detektor. V optimalizovaném nosném elektrolytu byly proměřeny vzorové elektroferogramy jednotlivých vzorků a určeno relativní zastoupení sloučenin ve vzorku. Následně byla za stejných podmínek prostudována stabilita připravených komplexů a dalších doprovodných látek ve vodných roztocích s přidavkem acetonitrilu a v čistě acetonitrilových roztocích. Jako velmi málo stabilní se jevil komplex  $[B(PG)_2]^-$  ve vodném prostředí (úplně se rozložil v průběhu několika hodin). V tomto prostředí naopak vykazoval vysokou stabilitu komplex  $[B(DHN)_2]^-$ . V prostředí bezvodého acetonitrilu vykazovaly vysokou stabilitu oba připravené komplexy. Experimentální podmínky pro separaci CE-UV byly úspěšně využity v technice CE-MS. Vzorek komplexu  $[B(PG)_2]^-$  byl separován od doprovodných produktů a v chromatogramech byly identifikovány přítomné majoritní složky. CE-MS měření vzorku komplexu  $[B(DHN)_2]^-$  nebylo z časových důvodů uskutečněno.

Poslední část práce je věnována studiu oxidace pyrogallolu. Tato reakce významně konkuruje vlastní komplexační reakci a odebírá přítomný volný ligand z reakční směsi. Pomocí UV-VIS absorpční spektrometrie byly sledovány přeměny pyrogallolového ligandu v bazickém prostředí. V sérii naměřených UV-VIS absorpčních spekter bylo možné určit čtyři isosbestické body, které dokazují rovnováhu mezi pěti sloučeninami (pyrogallem a čtyřmi vznikajícími produkty oxidace). Pomocí CE-UV byla následně určena rychlostní konstanta reakce oxidace pyrogallolu, která činila  $3,01 \cdot 10^{-8}\text{ mol/l}\cdot\text{s}$  pro kinetiku 0. řádu.

## 5 LITERATURA

1. Yang, W., Gao, X. & Wang, B. Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents. *Med. Res. Rev.* **23**, 346–368 (2003).
2. DeFrancesco, H., Dudley, J. & Coca, A. Boron Chemistry: An Overview. in *ACS Symposium Series* (ed. Coca, A.) **1236**, 1–25 (American Chemical Society, 2016).
3. Hall, D. G. Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives. Overview of Their Reactions and Applications. in *Boronic Acids* (ed. Hall, D. G.) 1–99 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006). doi:10.1002/3527606548.ch1
4. Geier, M. J. *et al.* Rhodium complexes containing arylspioborates derived from 3,5-di-tert-butylcatechol and their use in catalyzed hydroborations. *Polyhedron* **52**, 1181–1189 (2013).
5. Hébert, M. J. G. *et al.* Synthesis and Biological Activity of Arylspioborate Salts Derived from Caffeic Acid Phenethyl Ester. *Int. J. Med. Chem.* **2015**, (2015).
6. Webb, M. I. *et al.* Arylspioborates Derived from 4-tert-Butylcatechol and 3,5-Di-tert-butylcatechol and Their Antimicrobial Activities. *J. Heterocycl. Chem.* **51**, 157–161 (2014).
7. Springsteen, G. & Wang, B. A detailed examination of boronic acid–diol complexation. *Tetrahedron* **58**, 5291–5300 (2002).
8. Pappin, B., J., M. & A., T. Boron-Carbohydrate Interactions. in *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* (ed. Chang, C.-F.) (InTech, 2012). doi:10.5772/50630
9. Lee, D. Boron-Diol Interactions as the Basis for Novel Catalytic Transformations. (University of Toronto, 2013).
10. Soloway, A. H. *et al.* The Chemistry of Neutron Capture Therapy. *Chem. Rev.* **98**, 1515–1562 (1998).



11. Nedunchezian, K., Aswath, N., Thiruppathy, M. & Thirugnanamurthy, S. Boron Neutron Capture Therapy - A Literature Review. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **10**, ZE01–ZE04 (2016).
12. Fukuda, H. *et al.* Boron neutron capture therapy (BNCT) for malignant melanoma with special reference to absorbed doses to the normal skin and tumor. *Australas. Phys. Eng. Sci. Med.* **26**, 97–103 (2003).
13. Strebhardt, K. & Ullrich, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 473–480 (2008).
14. Chuaire, L. & Cediél, J. F. Paul Ehrlich: From magic bullets to chemotherapy. *Colomb. Médica* **39**, 291-300–300 (2008).
15. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G. & Shin, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 1310–1316 (2008).
16. Salifoglou, A., Petanidis, S. & Kioseoglou, E. Metallodrugs in targeted cancer therapeutics. Aiming at chemoresistance-related patterns and immunosuppressive tumor networks. *Curr. Med. Chem.* (2017).
17. Mjos, K. D. & Orvig, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Rev.* **114**, 4540–4563 (2014).
18. Barth, R. F., Mi, P. & Yang, W. Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer. *Cancer Commun.* **38**, 35 (2018).
19. Moss, R. L. Critical review, with an optimistic outlook, on Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Appl. Radiat. Isot.* **88**, 2–11 (2014).
20. Sauerwein, W. A. G., Bet, P. M. & Wittig, A. Drugs for BNCT: BSH and BPA. in *Neutron Capture Therapy: Principles and Applications* (eds. Sauerwein, W., Wittig, A., Moss, R. & Nakagawa, Y.) 117–160 (Springer Berlin Heidelberg, 2012). doi:10.1007/978-3-642-31334-9\_8

21. Cormier, K. *et al.* Synthesis, Characterization, and Anticancer Activities of Pyrogallol-Based Arylspiroborates. *J. Heterocycl. Chem.* **53**, 1807–1812 (2016).
22. Fiege, H. *et al.* Phenol Derivatives. in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (American Cancer Society, 2000). doi:10.1002/14356007.a19\_313
23. Abrash, H. I. The air oxidation of 4,6-di (2-phenyl-2-propyl) pyrogallol. Spectroscopic and kinetic studies of the intermediates. *Carlsberg Res. Commun.* **42**, 11–25 (1977).
24. Ramasarma, T. *et al.* New insights of superoxide dismutase inhibition of pyrogallol autoxidation. *Mol. Cell. Biochem.* **400**, 277–285 (2015).
25. Timerbaev, A. R., Hartinger, C. G. & Keppler, B. K. Metallodrug research and analysis using capillary electrophoresis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **25**, 868–875 (2006).
26. Holtkamp, H., Grabmann, G. & Hartinger, C. G. Electrophoretic separation techniques and their hyphenation to mass spectrometry in biological inorganic chemistry. *Electrophoresis* **37**, 959–972 (2016).
27. Holtkamp, H. U. & Hartinger, C. G. Advanced metallomics methods in anticancer metallodrug mode of action studies. *TrAC Trends Anal. Chem.* **104**, 110–117 (2018).
28. Corr, J. J. & Anacleto, J. F. Analysis of Inorganic Species by Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry and Ion Exchange Chromatography–Mass Spectrometry Using an Ion Spray Source. *Anal. Chem.* **68**, 2155–2163 (1996).
29. Kapp, T., Dullin, A. & Gust, R. Mono- and polynuclear [alkylamine]platinum(II) complexes of [1,2-bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II): synthesis and investigations on cytotoxicity, cellular distribution, and DNA and protein binding. *J. Med. Chem.* **49**, 1182–1190 (2006).
30. Zenker, A., Galanski, M., Bereuter, T. L., Keppler, B. K. & Lindner, W. Kinetics of binding properties of 5'-GMP with cisplatin under simulated physiological conditions by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **745**, 211–219 (2000).
31. Wenclawiak, B. W. & Wollmann, M. Separation of platinum(II) anti-tumour drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A* **724**, 317–326 (1996).

32. Timerbaev, A. R., Rudnev, A. V., Semenova, O., Hartinger, C. G. & Keppler, B. K. Comparative binding of antitumor indazolium [trans-tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] to serum transport proteins assayed by capillary zone electrophoresis. *Anal. Biochem.* **341**, 326–333 (2005).
33. Küng, A., Pieper, T., Wissiack, R., Rosenberg, E. & Keppler, B. K. Hydrolysis of the tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes HIm trans-[RuCl<sub>4</sub>(im)<sub>2</sub>] and HInd trans-[RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>] investigated by means of HPCE and HPLC-MS. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 292–299 (2001).
34. Wittrisch, H., Schröer, H. P., Vogt, J. & Vogt, C. Determination of titanocene, a new drug with anticancer potential, and its metabolism in solution by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 3012–3017 (1998).
35. Holtkamp, H. & Hartinger, C. G. Capillary electrophoresis in metallodrug development. *Drug Discov. Today Technol.* **16**, 16–22 (2015).
36. Hartinger, C. G., Groessl, M., Meier, S. M., Casini, A. & Dyson, P. J. Application of mass spectrometric techniques to delineate the modes-of-action of anticancer metallodrugs. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6186–6199 (2013).
37. Schaumlöffel, D. & Prange, A. A new interface for combining capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **364**, 452–456 (1999).
38. Niessen, W. M. A., Tjaden, U. R. & van der Greef, J. Capillary electrophoresis—mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **636**, 3–19 (1993).
39. Walbroehl, Y. & Jorgenson, J. W. On-column UV absorption detector for open tubular capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **315**, 135–143 (1984).
40. Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M. & Verheggen, Th. P. E. M. High-performance zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **169**, 11–20 (1979).
41. Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Yonker, C. R. & Smith, R. D. On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* **59**, 1230–1232 (1987).

42. Cai, J. & Henion, J. Capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **703**, 667–692 (1995).
43. Smith, R. D. & Udseth, H. R. Chapter 5 Capillary electrophoresis/Mass spectrometry. in *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (eds. Lunte, S. M. & Radzik, D. M.) **2**, 229–275 (Elsevier, 1996).
44. Banks, J. F. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray/mass spectrometry. *Electrophoresis* **18**, 2255–2266 (1997).
45. Mamyrin, B. A. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). *Int. J. Mass Spectrom.* **206**, 251–266 (2001).
46. Pleil, J. D. & Isaacs, K. K. High-resolution mass spectrometry: basic principles for using exact mass and mass defect for discovery analysis of organic molecules in blood, breath, urine and environmental media. *J. Breath Res.* **10**, 012001 (2016).
47. Klampfl, C. W. & Buchberger, W. Recent Advances in the Use of Capillary Electrophoresis Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for the Analysis of Small Molecules. (2010). doi:info:doi/10.2174/157341110790945481
48. Amster, I. J. Fourier Transform Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**, 1325–1337 (1996).
49. Makarov, null. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156–1162 (2000).
50. Fonslow, B. R. & Yates, J. R. Capillary Electrophoresis Applied to Proteomic Analysis. *J. Sep. Sci.* **32**, 1175–1188 (2009).
51. Ramautar, R., Somsen, G. W. & Jong, G. J. de. CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis* **30**, 276–291 (2009).
52. Norková, R. & Jaklová, J. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektro-migračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chem Listy* **7** (2013).

53. Týčová, A., Ledvina, V. & Klepárník, K. Recent advances in CE-MS coupling: Instrumentation, methodology, and applications. *Electrophoresis* **38**, 115–134 (2017).
54. Klampfl, C. W. Review coupling of capillary electrochromatography to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1044**, 131–144 (2004).
55. Aggarwal, S. K. & You, C.-F. A review on the determination of isotope ratios of boron with mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **36**, 499–519 (2017).
56. El-Aneed, A., Cohen, A. & Banoub, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.* **44**, 210–230 (2009).
57. Moriwaki, Y., Tachikawa, M., Maeno, Y. & Shimizu, T. Collision Cooling of Ions Stored in Quadrupole Radio-Frequency Trap. *Jpn. J. Appl. Phys.* **31**, L1640 (1992).
58. Chernushevich, I. V., Loboda, A. V. & Thomson, B. A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **36**, 849–865 (2001).
59. Glish, G. L. & Burinsky, D. J. Hybrid Mass Spectrometers for Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 161–172 (2008).
60. Zapletalová, P. Studium nekovalentních interakcí protein-ligand pomocí hmotnostní spektrometrie. (Univerzita Palackého v Olomouci, Faculty of Science, 2016).
61. Smith, W. L. Boron-11 nmr. *J. Chem. Educ.* **54**, 469 (1977).
62. Geier, M. J. *et al.* Synthesis and Biological Activities of Arylspioborates Derived from 2,3-Dihydroxynaphthalene. *Heteroat. Chem.* **24**, 116–123 (2013).
63. Faniran, J. A. & Shurvell, H. F. Infrared spectra of phenylboronic acid (normal and deuterated) and diphenyl phenylboronate. *Can. J. Chem.* **46**, 2089–2095 (1968).
64. Bellamy, L. J., Gerrard, W., Lappert, M. F. & Williams, R. L. 481. Infrared spectra of boron compounds. *J. Chem. Soc. Resumed* **0**, 2412–2415 (1958).

65. Wang, Q. & Zhou, H. Ammonium Arylspiroborate Compounds: Synthesis, Crystal Structure, Fluorescence Properties, and Antibacterial Activity. *Organometallics* **36**, 3293–3303 (2017).
66. Larkin, P. *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. (Elsevier, 2011).
67. Zusková, I. & Ušelová, K. Skripta: Praktikum z fyzikální chemie. (Univerzita Karlova, 2000).
68. Chiriac, V. & Balea, G. Buffer Index and Buffer Capacity for a Simple Buffer Solution. *J. Chem. Educ.* **74**, 937 (1997).
69. Sleno, L. & Volmer, D. A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **39**, 1091–1112 (2004).
70. Hanwell, M. D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminformatics* **4**, 17 (2012).
71. Sedláčková, S. Příprava a charakterizace arylspirocyklických komplexů boru. (Univerzita Karlova, 2018).
72. Pubchem - dostupné ze zdroje: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1057>.