

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Medicinální chemie



**Petra Šoleová**

Modifikace cyklických fosfazenů pro adsorpci a desorpci léčiv s NMR a fluorescenční detekcí

Modification of Cyclic Phosphazenes for Drug Adsorption and Desorption with NMR and  
Fluorescence Detection

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel:

prof. Ing. Aleš Růžička, Ph.D.

Praha, 2025

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze, 11.5. 2025

Petra Šoleová

# Abstrakt

Fosfazeny představují organofosforové sloučeniny obsahující dusík, které se vyskytují v lineární i cyklické formě. Díky své vysoké stabilitě a biokompatibilitě si v současnosti získávají značnou pozornost. Jejich deriváty nacházejí uplatnění v celé řadě oblastí — od vývoje ohnivzdorných látek a fluorescenčních zobrazovacích prostředků až po medicínu. V lékařském výzkumu jsou ceněny především pro svou degradovatelnost na netoxické produkty a schopnost generovat látky s antimikrobiálním nebo antitumorózním účinkem. Zajímavý potenciál vykazují rovněž díky možnosti vytvářet HOF struktury (hydrogen-bonded organic frameworks), zejména jejich spirocyklické deriváty, které se tak jeví jako perspektivní hostitelské molekuly v oblasti host–guest chemie.

Tato práce popisuje syntézu spirocyklických derivátů hexachlorocyklotrifosfazenu a octachlorocyklotetrafosfazenu s *N,N*-dibenzylethylendiaminem za účelem jejich dalšího využití při konstrukci HOF systémů. Z celkového počtu sedmi teoreticky možných produktů se podařilo izolovat tři, a to vzhledem k obtížné separaci jednotlivých složek ze směsi.

Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR spektroskopie ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  a  $^{15}\text{N}$ ), hmotnostní spektrometrie a rentgenové strukturní analýzy. Dále byly zkoumány jejich absorpční a emisní vlastnosti a byly podrobeny biologickému testování.

**Klíčová slova:** fosfazen, spirocyklické deriváty, host-guest chemie, NMR spektroskopie

# Abstract

Phosphazenes are organophosphorus compounds containing nitrogen, occurring in both linear and cyclic forms. Due to their high stability and biocompatibility, they have attracted considerable attention in recent years. Their derivatives find applications across a wide range of fields — from the development of flame-retardant materials and fluorescent imaging agents to medicine. In biomedical research, they are valued particularly for their ability to degrade into non-toxic products, as well as for producing compounds with antimicrobial or even antitumor activity. Another intriguing feature is their capacity to form hydrogen-bonded organic frameworks (HOFs), especially through their spirocyclic derivatives, which show promise as host molecules in host–guest chemistry.

This bachelor's project describes synthesis of spiro-derivatives of hexachlorocyclotriphosphazene and octachlorocyclotetraphosphazene with *N,N*-dibenzylethylenediamine for their potential use in HOF material development. Out of seven theoretically possible derivatives, three were successfully isolated due to the challenging separation of components from the mixture.

The synthesized compounds were characterized using NMR spectroscopy ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ , and  $^{15}\text{N}$ ), mass spectrometry, and X-ray crystallography. Additionally, their absorption and emission properties were examined, and the substances were subjected to biological testing

**Key words:** phosphazenes, spirocyclic derivatives, host-guest chemistry, NMR spectrometry

# Poděkování

První poděkování bezpochyby patří mému školiteli za nesmírně milý přístup, velikou ochotu poradit a vše trpělivě vysvětlit.

Další dík patří Alžbětě Hörnerové, která se mnou všechny dny v laboratoři trávila, pomohla mi osvojit si všechny základy laboratorních technik a byla mi velmi milou společností.

Robertu Willimetzovi děkuji nejen za pomoc s měřením a zpracováním absorpčních a emisních spekter, ale také za přátelské a uvolněné prostředí, ke kterému v laboratoři významně přispíval.

Díky patří paní doktorce Elišce Procházkové a Lucii Černé z ÚOCHB nejen za měření NMR a MS spekter a pomoc s jejich interpretací.

Na závěr nesmí chybět poděkování mé rodině a mému příteli, kteří trpělivě celý rok naslouchali mým strastem a pomáhali mi neztratit hlavu.

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Seznam použitých zkratk                                 | 7  |
| 1 Přehled problematiky                                  | 9  |
| 1.1 Chemie prvků  | 9  |
| 1.1.1 Dusík   | 9  |
| 1.1.2 Fosfor  | 9  |
| 1.2 Fosfazeny   | 12 |
| 1.2.1 Vlastnosti fosfazenů                              | 12 |
| 1.2.2 Třídy fosfazenů                                   | 13 |
| 1.2.3 Příprava fosfazenových struktur                   | 15 |
| 1.3 Aplikace fosfazenů                                  | 18 |
| 1.3.1 Zpomalovače hoření                                | 18 |
| 1.3.2 Fluorescenční materiály                           | 19 |
| 1.3.3 Biomedicína                                       | 19 |
| 1.4 Bioaktivita   | 23 |
| 1.5 Host-guest chemie                                   | 25 |
| 1.6 Metody strukturního výzkumu fosfazenových sloučenin | 27 |
| 1.6.1 NMR spektroskopie                                 | 27 |
| 1.6.2 Hmotnostní spektrometrie                          | 30 |
| 1.6.3 Rentgenostrukturní analýza                        | 32 |
| 1.6.4 Absorpční spektroskopie                           | 34 |
| 1.6.5 Emisní spektroskopie                              | 34 |
| 2 Cíl práce   | 35 |
| 3 Experimentální část                                   | 37 |
| 3.1 Obecná část   | 37 |
| 3.2 Syntetická část                                     | 41 |
| 3.2.1 Optimalizovaný obecný postup                      | 41 |
| 3.2.2 Příprava látky 1 – monospirotrimer                | 41 |
| 3.2.3 Příprava látky 6 – dispirotetramer                | 42 |
| 3.2.4 Příprava látky 8 – perspirotetramer               | 44 |

|   |    |
|---|----|
| 4 Výsledky a diskuze.....                   | 45 |
| 4.1 Optimalizace syntetických postupů.....  | 45 |
| 4.2 Charakterizace látek .....              | 47 |
| 4.2.1 Teplota tání .....                    | 47 |
| 4.2.2 NMR spektroskopie.....                | 47 |
| 4.2.3 Rentgenostrukturní analýza.....       | 51 |
| 4.2.4 Absorpční a emisní spektroskopie..... | 53 |
| 4.2.5 Biologická aktivita .....             | 54 |
| 5 Závěr.....                                | 55 |
| Použitá literatura .....                    | 56 |

## Seznam použitých zkratk

|          |  |
|----------|--|
| HCCP     | hexachlorocyklotrifosfazen                 |
| POP      | polydichlorofosfazen                       |
| HOF      | Hydrogen-bonded Organic Framework          |
| NMR      | nukleární magnetická rezonance             |
| ssNMR    | solid-state nukleární magnetická rezonance |
| RTG      | rentgen                                    |
| MS       | hmotnostní spektrometrie                   |
| HRMS     | High Resolution Mass Spectrometry          |
| ESI      | ionizace elektronsprejem                   |
| UV       | ultrafialový                               |
| VIS      | viditelný                                  |
| tetramer | octachlorocyklotetrafosfazen               |
| trimer   | hexachlorocyklotrifosfazen                 |
| benzatin | <i>N,N</i> -dibenzylethylendiamin          |
| DIPEA    | diisopropylethylamin                       |
| RVO      | rotační vakuová odparka                    |

# 1 Přehled problematiky

## 1.1 Chemie prvků

### 1.1.1 Dusík

Dusík je členem 15. skupiny a 2. periody periodické tabulky, řadí se mezi *p*-prvky. Vyskytuje se ve dvou stabilních isotopech:  $^{14}\text{N}$  (zastoupení 99,634 %) a  $^{15}\text{N}$  (zastoupení 0,366 %). Na Zemi se vyskytuje jako bezbarvý, diamagnetický plyn bez zápachu, dominantně jako 78,1 % objemu atmosféry. Jeho nejběžnější anorganickou formou je chilský ledek. [1][2] Mimoto je obsažen například v aminokyselinách a nukleových kyselinách a tvoří tak nedílnou součást i živé přírody.

Elektronovou konfiguraci dusíku lze reprezentovat zápisem  $[\text{He}] 2s^2 2p^3$ , což značí přítomnost pěti valenčních elektronů. Atom dusíku je proto poměrně malý, zatímco efektivní jaderný náboj ve vzdálenosti kovalentního poloměru naopak poměrně vysoký. Výsledkem je jeho vysoká elektronegativita (3,04 podle Pauligovy stupnice). [2]

V případě vazby s atomem o nižší elektronegativitě získává dusík parciální záporný náboj a může tak tvořit koordinační vazbu prostřednictvím svého volného elektronového páru. [1][2] Váže-li se na elektronegativnější prvek, kladný parciální náboj jeho donorní schopnosti omezuje. Při srovnatelné elektronegativitě partnerů je upřednostňována tvorba násobných vazeb. Dusík běžně vystupuje v oxidačních stavech od  $-3$  až do  $+5$ .

Přestože je dusík výrazně elektronegativní prvek, je molekulární dusík,  $\text{N}_2$ , velmi inertní. Důvodem je extrémně silná trojná vazba s disociační konstantou okolo 950 kJ/mol. Například reakce s kyslíkem probíhá až při teplotách nad 1000 °C, a i tehdy běží s velmi malou mírou konverze. Díky této vlastnosti je hojně využíván jako inertní atmosféra.

### 1.1.2 Fosfor

Fosfor je rovněž součástí prvků *p*-bloku – nachází se také v 15. skupině, 3. periodě, jeho protonové číslo je 15. V přírodě se vyskytuje v hojném množství – tvoří zhruba 0,1 % objemu zemské kůry. Stejně jako dusík se nejčastěji vyskytuje v oxidačních stavech od  $-3$  do  $+5$ . [3]

Mezi nejvýznamnější přirozeně se vyskytující minerály fosforu se řadí fosforit ( $3 \text{ Ca}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaOH}$ ) a apatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$ , kde X je fluor, chlor nebo hydroxid). Fosfor je stejně jako dusík důležitým biogenním prvkem jakožto základní stavební složka organických (biomakromolekuly – ATP, DNA, RNA, fosfolipidy, buněčné membrány atd.) i anorganických ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  v kostech a zubech) sloučenin. Elementární fosfor existuje v přírodě ve třech alotropických modifikacích: bílý, červený a černý fosfor. Tyto formy se liší strukturou, stabilitou a rozpustností, ale také toxicitou, zápachem či chemiluminiscencí. [10]

Fosfor má nižší elektronegativitu než dusík (2,19 podle Paulingovy stupnice) a typicky tvoří kovalentní vazby. Má tři nepárové elektrony, které mu umožňují tvořit tři vazby, ale na rozdíl od dusíku může díky dostupnosti *d*-orbitalů rozšířit svůj valenční oktet a vytvářet i pěti- až šestivazné sloučeniny.

|     | <b>Dusík</b>  | <b>Fosfor</b>  |
|-----|---|--|
| - 3 | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{N} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad / \\ \text{H} \end{array}$ amoniak  | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{P} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad / \\ \text{H} \end{array}$ fosfan  |
| - 2 | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{H} \\ \diagdown \quad / \\ \text{N} - \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \quad \text{H} \end{array}$ hydrazin | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{H} \\ \diagdown \quad / \\ \text{P} - \text{P} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \quad \text{H} \end{array}$ difosfan  |
| - 1 | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagdown \\ \text{N} - \text{OH} \\ \diagup \\ \text{H} \end{array}$ hydroxylamin  | $\begin{array}{c} \text{Me} \\ \diagdown \\ \text{Me} - \text{P} = \text{O} \\ \diagup \\ \text{Me} \end{array}$ trimethylfosfinoxid   |
| 0   | $\text{N} \equiv \text{N}$ dusík  | $\begin{array}{c} \text{P} \\ \diagdown \quad / \\ \text{P} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{P} \end{array}$ bílý fosfor  |
| + 1 | $\text{N} \equiv \text{N}^{\oplus} - \text{O}^{\ominus}$ oxid dusný   | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagdown \\ \text{H} - \text{P} = \text{O} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{array}$ kyselina fosformá   |
| + 2 | $\text{N}^{\cdot} = \text{O}$ oxid dusnatý  | $\begin{array}{c} \text{HO} \quad \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{O} = \text{P} - \text{P} = \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \quad \text{H} \end{array}$ kyselina hypodifosforečná |
| + 3 | $\begin{array}{c} \text{O}^{\ominus} \quad \quad \text{N} = \text{O} \\ \diagdown \quad / \\ \text{N}^{\oplus} \\ \diagup \\ \text{O} \end{array}$ oxid dusitý                | $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagdown \\ \text{O} = \text{P} - \text{H} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{array}$ kyselina fosforitá   |
| + 4 | $\text{O} = \text{N} - \text{O}^{\ominus}$ oxid dusičitý  | $\begin{array}{c} \text{HO} \quad \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{O} = \text{P} - \text{P} = \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{HO} \quad \quad \text{OH} \end{array}$ kyselina hypofosforečná |
| + 5 | $\begin{array}{c} \text{O}^{\ominus} \\ \diagdown \\ \text{O}^{\oplus} - \text{N} - \text{OH} \\ \diagup \\ \text{O} \end{array}$ kyselina dusičná                            | $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagdown \\ \text{O} = \text{P} - \text{OH} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{array}$ kyselina fosforečná   |

Obr. 1: Oxidační stavy dusíku a fosforu

## 1.2 Fosfazený

Sloučeniny, které mají mezi oběma prvky přímou vazbou, do jisté míry kopírují extrémní vazebné možnosti, ale v přírodě se nevyskytují, se nazývají fosfazený. Tyto sloučeniny mohou vykazovat lineární nebo cyklické struktury tvořené střídajícími se atomy fosforu a dusíku, konkrétně opakujícími se kánonickými jednotkami  $-P=N-$ . Nejčastěji jsou pozorovatelné jako pevné, bezbarvé látky rozpustné v organických rozpouštědlech.

První syntéza fosfazenů se datuje do roku 1834. [4] V této době reakci chloridu fosforečného ( $PCl_5$ ) s amoniakem zkoumali němečtí vědci Justus von Liebig a Friedrich Wohler. Touto reakcí se jim podařilo získat hexachlorocyklotrifosfazen, ovšem dalším vědcům zabralo dalších více než 100 let tuto molekulu plně charakterizovat z hlediska struktury a také reaktivity.

### 1.2.1 Vlastnosti fosfazenů

V molekulách fosfazenů je atom fosforu pětivazný, vystupuje v oxidačním stavu +5 a má koordináční číslo 4. Jeho hybridizace odpovídá typu  $sp^3$ , což vede k přibližně tetraedrické geometrii.

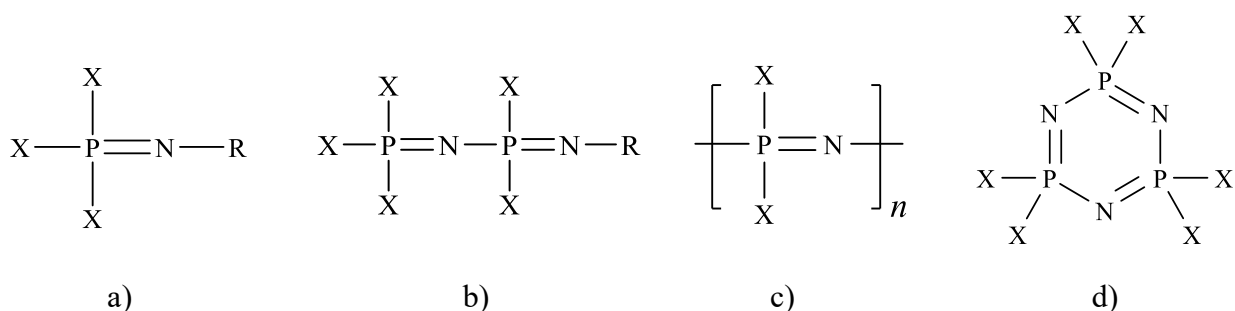
Je vázán ke dvěma atomům dusíku prostřednictvím dvou  $\sigma$  a jedné delokalizované  $\pi$  vazby. Jejím důkazem je délka vazeb, které jsou kratší než běžné jednoduché vazby, ale delší než vazby dvojné. Delokalizace je způsobena překryvem  $p$ -orbitalů dusíku s  $d$ -orbitaly fosforu. Zbývající dvě  $\sigma$  vazby pojí fosfor s vnějšími partnery, nejčastěji halogeny nebo jinými organickými skupinami.

Atomy dusíku mají ve fosfazenech formálně oxidační číslo  $-3$  a jsou trojvazné. Jejich vazebné uspořádání – dvě  $\sigma$  a jedna delokalizovaná  $\pi$  vazba – odpovídá  $sp$  hybridizaci a vede k téměř lineární geometrii.

Obecnou strukturu fosfazenů lze zapsat vzorcem  $[-P(X_2)=N-]_n$ , kde  $n$  vyjadřuje stupeň polymerace. Symbol  $X$  označuje substituenty navázané na atom fosforu, nejčastěji atomy halogenů – chloru či fluoru – které snadno podléhají právě nukleofilní substituci. V derivátech fosfazenů poté  $X$  často představuje  $-OR$  nebo  $-NR_2$ , kde  $R$  je alkyl nebo aryl.

## 1.2.2 Třídy fosfazenů

Fosfazený lze dělit nejen podle stupně (oligo)polymerace, tedy podle počtu opakujících se  $[-P(R_2)=N-]$  jednotek, ale také podle jejich geometrické sktruktury.

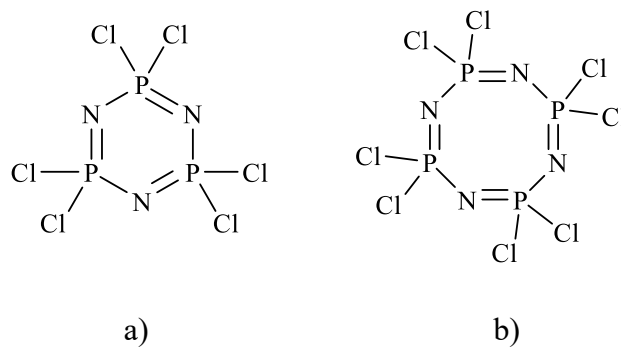


Obr. 2: Varianty molekul fosfazenů

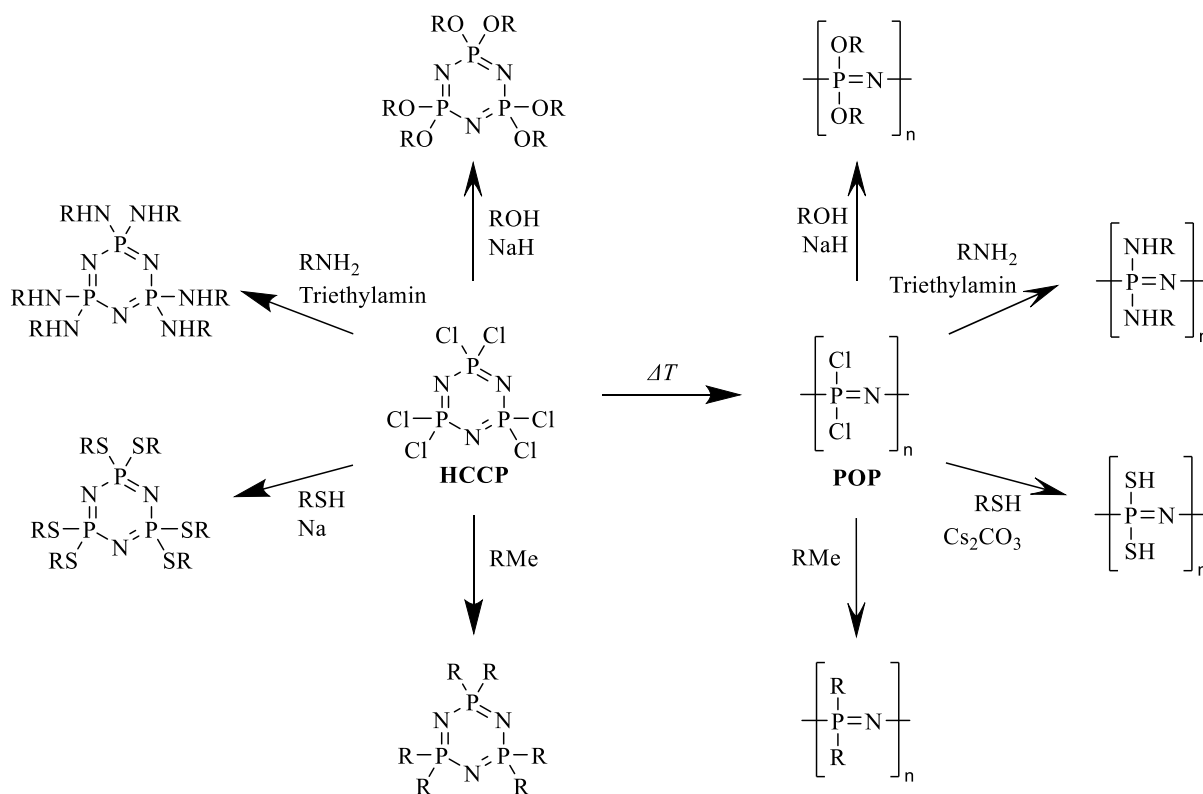
a) monofosfazen, b) difosfazen, c) polyfosfazen, d) cyklotrifosfazen

Acyklickými fosfazený, jindy také označované jako fosfiniminy nebo fosforaniminy, se nazývají lineární fosfazený s krátkým řetězcem. [5] [6] Do této skupiny patří zejména monofosfazený se strukturou  $X_3P=NR$  (**Obr. 2 a**), které často slouží jako výchozí sloučeniny pro syntézu polymerních fosfazenů. Tyto sloučeniny lze tedy považovat za monomery nebo základní prvky vazeb uvnitř dlouhého řetězce či mezi řetězci polyfosfazenů. Kromě monofosfazenů sem patří také difosfazený ( $[-P(X_2)=N-]_2$ ) (**Obr. 2 b**) nebo složitější  $R_3PNPR_3^+$  kationty. Přestože posledně jmenovaný kation není klasickým fosfazenem, přítomnost funkční jednotky  $-P-N-P-$  umožňuje jeho zařazení do této kategorie. Tyto sloučeniny jsou zajímavé zejména svým chováním jakožto superbáze – tedy látky s vyšší hodnotou  $pK_A$  než tzv. *proton sponge* ( $pK_A = 12,1$  [7]).

Cyklofosfazený představují důležité zástupce heterocyklických systémů. Jejich cyklické struktury se skládají z opakujících se jednotek  $[-P(X_2)=N-]_n$ . Sloučeniny, které jsou dominantně studované, obsahují šestičlenné ( $n = 3$  – hexachlorocyklotrifosfazený) (**Obr. 3 a**) cykly a v menší míře se objevují i studie sloučenin s cykly osmičlennými ( $n = 4$  – oktachlorocyklotetrafosfazený) (**Obr. 3 b**). Tyto molekuly přitahují pozornost zejména díky snadné substituci na atomech fosforu (**Obr. 4**) – substituenty navázané v této pozici lze snadno zaměnit působením nukleofilů, jako jsou aminy, alkoholy, thioily a další. [8] Další zájem vyvolává snadné otevírání jejich cyklů již při teplotách okolo  $250\text{ }^\circ\text{C}$ , čímž vznikají lineární makromolekuly typu  $[NPR_2]_n$ .



Obr. 3: a) hexachlorocyklotrifosfazen (**trimer**)  
b) octachlorocyklotetrafosfazen (**tetramer**)



Obr. 4: Reaktivita fosfazenů: otevírání kruhu hexachlorocyklotrifosfazenu (HCCP) na polydichlorofosfazen (POP) a jejich derivatizace nukleofilní substitucí [9]

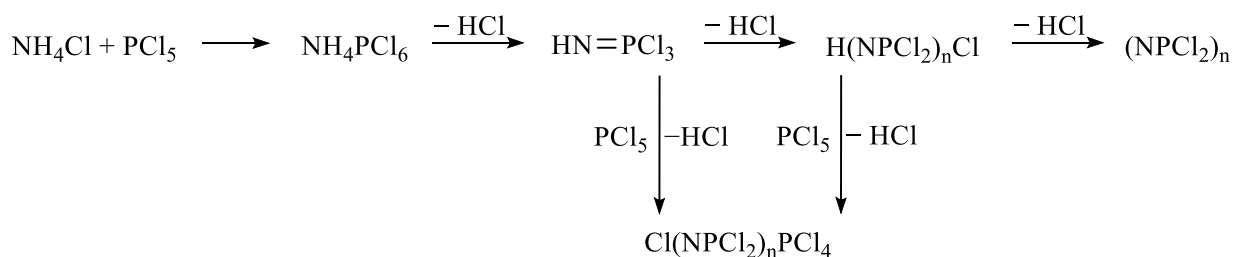
Mateřský polymer není prakticky využitelný kvůli vysoké citlivosti vůči hydrolyze P–Cl vazby. Tato slabina se však stala výhodou – nukleofilní substituce atomů chloru umožňuje přípravu chemicky stabilnějších polymerů. [1]

Polyfosfazeny jsou polymery s flexibilním anorganickým řetězcem, který obsahuje od několika jednotek až po desítky tisíc  $[-P(X_2)=N-]$  článků (*Obr. 2 c*). Společně s cyklofosfazeny patří k nejlépe zkoumaným sloučeninám fosforu s dusíkem. Tyto deriváty poskytují široké možnosti pro návrh a syntézu biologicky odbouratelných polymerů, stejně jako pro vývoj biologicky aktivních makromolekul s vysokou funkčností, strukturní rozmanitostí a cílenou biologickou kompatibilitou.

Mimo to vynikají ohnivzdornými vlastnostmi, vysokou chemickou odolností a možností ladění fyzikálně-chemických vlastností prostřednictvím volby postranních skupin. [5] Jsou charakteristické nenasyčeným, konjugovaným řetězcem s ekvivalentními vazbami. Polymery s delšími řetězci mohou vykazovat vlastnosti elastomerů nebo termoplastů a často disponují optickými, protonově vodivými, elektrochemickými či ohnivzdornými vlastnostmi. Většina z nich je stabilní na vzduchu. [9] [10]

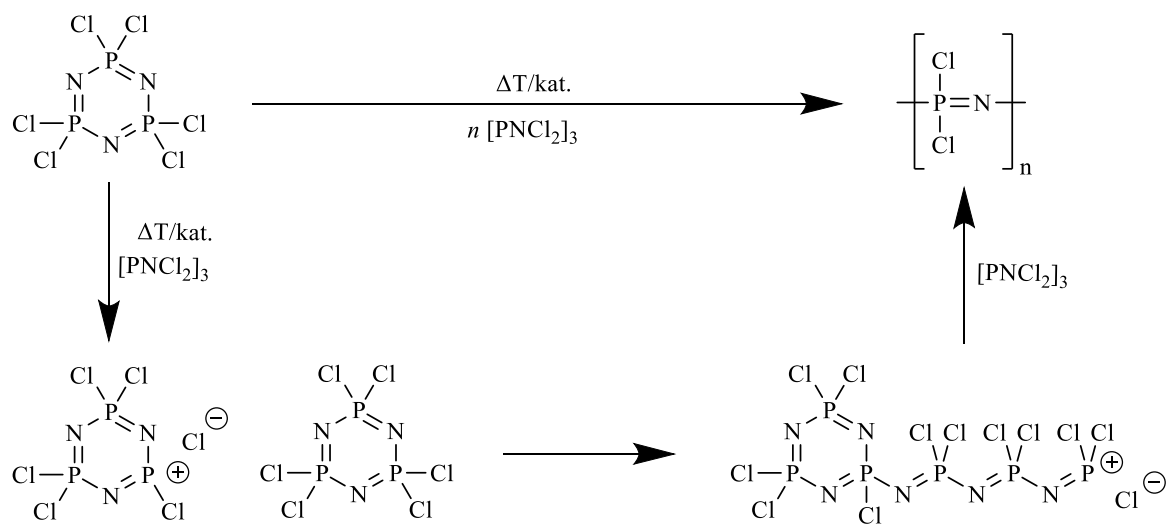
### 1.2.3 Příprava fosfazenových struktur

Pro téměř všechny fosfazeny s různým stupněm polymerace lze použít stejný syntetický postup, který zahrnuje amonolýzu. [11] Amonolýza je zvláštní typ aminolýzy, při níž dochází k reakci v kapalném roztoku amoniaku. Amoniak díky svému volnému elektronovému páru provádí nukleofilní ataku a způsobuje substituci mechanismem  $S_N2$ . Výchozími látkami bývají chlorid fosforečný ( $PCl_5$ ) a chlorid amonný ( $NH_4Cl$ ) (*Obr. 5*). [9] Chlorid amonný se při zahřívání rozkládá na amoniak ( $NH_3$ ) a chlorovodík ( $HCl$ ). Uvolněný amoniak poté umožňuje amonolýzu chloridu fosforečného za vzniku  $NHPCl_6$ . Tento produkt je nestabilní a rozkládá se na  $NH=PCl_3$  (monofosfazen). Tento produkt může dále polymerovat za současné eliminace  $HCl$ , nebo opět reagovat s  $PCl_5$ .



*Obr. 5:* Příprava fosfazenů amonolýzou  $PCl_5$  [12]

V tomto bodě je vhodné odkázat na **Obr.4**, kde je znázorněn významný způsob přípravy polyfosfazenů s dlouhými řetězci. Prvním krokem tohoto procesu je otevírání kruhů cyklických fosfazenů působením vysokých teplot (**Obr. 6**). Ty v přítomnosti katalyzátoru vyvolají odstup chloridového aniontu z atomu fosforu, čímž vzniká kation  $[P_3N_3Cl_5]^+$ . Tento kation iniciuje otevření další molekuly cyklofosfazenu a následnou polymeraci. Na terminálním atomu fosforu se opět nachází kladný náboj, který umožňuje připojení další jednotky.



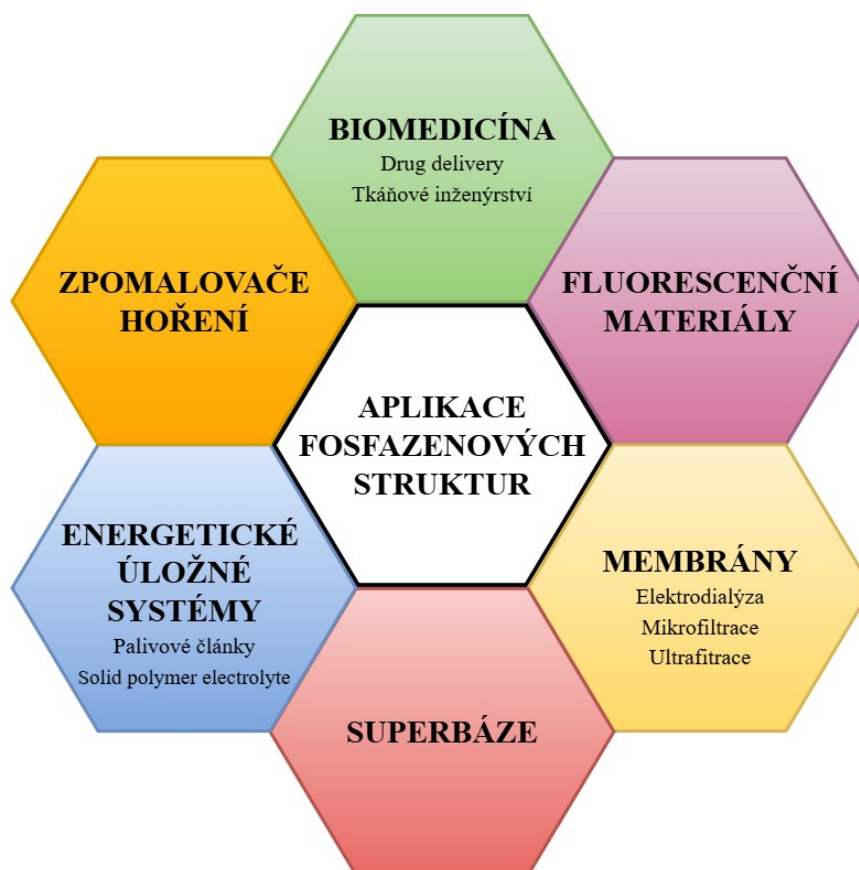
**Obr. 6:** Mechanismus přípravy lineárních polyfosfazenů vycházející z cykloderivátů [9]

Touto metodou otevírání kruhu (ring-opening polymeraci) jsou připravovány primárně lineární polyfosfazenové struktury. Polymerní fosfazenové struktury však nejsou omezeny jen na lineární makromolekuly. Živou kationtovou polymerací monofosfazenů (například  $Cl_3P=N-Si(CH_3)_3$ ) lze připravit rozvětvené a různorodé makromolekuly, jako blokové kopolymery nebo útvary s dendritickým, hvězdicovitým nebo hřebenovitým uspořádáním (**Obr. 7**). [13]



## 1.3 Aplikace fosfazenů

Polyfosfazeny se řadí mezi nejvšestrannější makromolekuly. [14] Díky vysoké strukturní rozmanitosti nacházejí uplatnění v mnoha odvětvích. Vlastnosti těchto molekul určují jak –P–N– kostry polymerního řetězce, tak připojené boční skupiny. Právě díky možnosti rozsáhlých postsyntetických modifikací poskytují polyfosfazeny vědě k dispozici velké množství polymerních materiálů se širokou škálou kvalit, jako jsou vysoká tepelná stabilita a ohnivzdornost, biodegradibilita, propustnost pro ultrafialové a viditelné světlo a další.



Obr. 9: Aplikace fosfazenových struktur [6]

### 1.3.1 Zpomalovače hoření

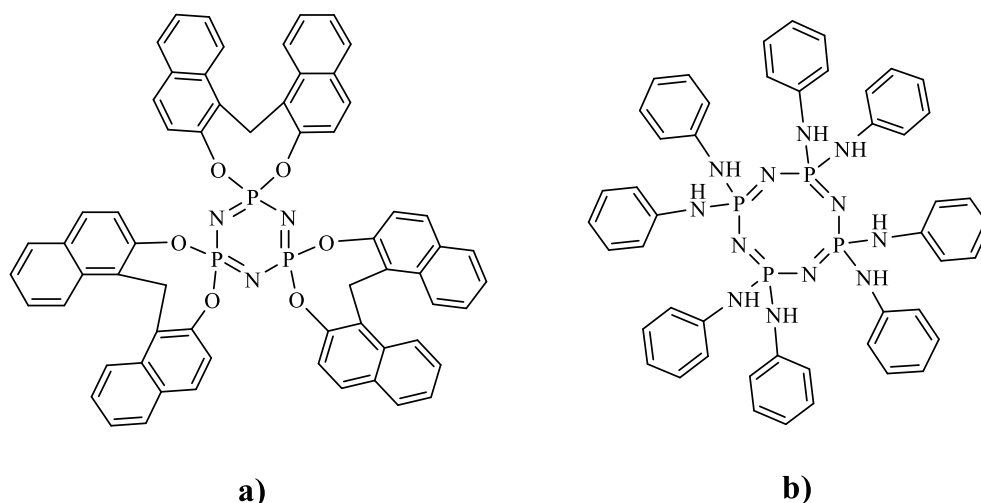
Sloučeniny fosforu se řadí mezi běžně komerčně využívané zpomalovače hoření. Ačkoli se využívá řada sloučenin fosforu (červený a černý fosfor, fosforečnan amonný aj.), nejefektivnější se ukázaly být právě fosfazenové retardanty. [15] Fosfazeny vykazují vysokou tepelnou stabilitu a brání tak samotnému vzplanutí. Při teplotách, které způsobí rozklad molekul, vznikají netěkavé látky (například kyselina fosforečná ( $H_3PO_3$ )), které na povrchu materiálu vytvoří film bránící přístupu kyslíku. [16] [17] Dále vznikající  $CO_2$ ,  $N_2$  a další plyny ředí okolní  $O_2$  a snižují tím jeho koncentraci v okolí materiálu. Vznikající  $H\cdot$  a  $HO\cdot$  radikály

neutralizují  $\text{PO}\cdot$ ,  $\text{HPO}_2\cdot$  a další radikálové produkty tepelného rozkladu fosfazenu, čímž také dochází k tlumení hoření. Fosfazénové retardanty navíc vykazují dobrou kompatibilitu s jinými polymery, což umožňuje jejich snadné začlenění do polymerních směsí bez negativního vlivu na mechanické vlastnosti či zpracovatelnost. V posledních letech deriváty fosfazenu (hexafenoxycyklotrifosfazeny, pentafluoro(fenoxy)cylotrifosfazeny a další) díky velmi malé produkci toxických produktů nahrazují halogenované zpomalovače, které jsou zdraví nebezpečné.

### 1.3.2 Fluorescenční materiály

Polyfosfazeny mohou sloužit jako platforma pro syntézu fluorescenčních materiálů. [6] Samy o sobě nejsou fosfazeny opticky aktivní v UV-VIS oblasti [18], avšak jejich vysoká stabilita a snadná modifikovatelnost je činí vhodnými nosiči optických vlastností, např. pro fluorofory, kvantové tečky či barviva. Díky rigiditě řetězce mohou tyto materiály sloužit jako biosenzory, detektory a další biomateriály.

Jako základní jednotky materiálů s fluorescenčními vlastnostmi jsou intenzivně zkoumány oxo- [18] (**Obr. 10 a**) a aminoderiváty [19] (**Obr. 10 b**) cyklotrifosfazenu

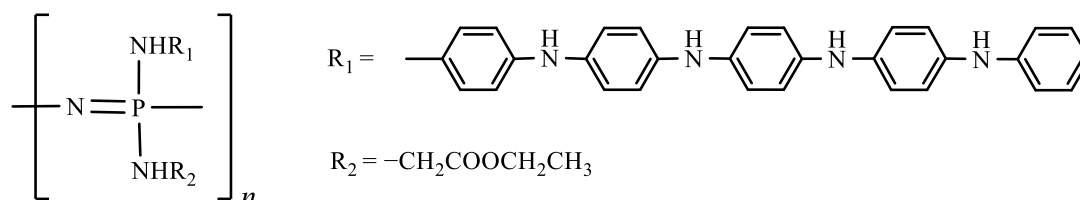


*Obr. 10:* Příklady a) oxoderivátu a b) aminoderivátu fosfazenu s fluorescenční aktivitou [18] [19]

### 1.3.3 Biomedicína

V posledních letech získaly fosfazénové materiály značnou pozornost také v oblasti biomedicíny. Vedle lineárních polymerů se také cyklické deriváty uplatňují v různých aplikacích. Díky značné variabilitě struktur umožňují přípravu biomateriálů přesně přizpůsobených požadovaným funkcím a jejich snadná degradovatelnost na netoxické produkty je činí zvláště vhodnými pro medicínské využití. Významnými aplikacemi jsou například cílené

podávání léčiv (drug delivery) [20] či tvorba polymerů pro použití v tkáňovém inženýrství [21]. Příkladem fosfazenových derivátů, které mají velký potenciál v tkáňovém inženýrství je polyfosfazen-hydroxyapatit v inženýrství kostní tkáně [22] nebo poly[(ethylester glycinu) (anilinpentamer)fosfazenu] (**Obr. 11**) v nervovém inženýrství, jakožto elektroaktivní fosfazen. [23]

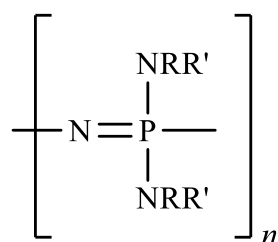


*Obr. 11:* Strukturální vzorec poly[(ethylester glycinu) (anilin pentamer)fosfazenu] [22]

Polyfosfazenový řetězec je obecně málo náchylný k enzymatickému či hydrolytickému rozkladu. **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** Volba substituentů však zásadně ovlivňuje jeho stabilitu ve vodném prostředí a možnost biodegradace na netoxické produkty, a to na netoxický fosforečnan amonný,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ , respektive amoniak a fosfát.

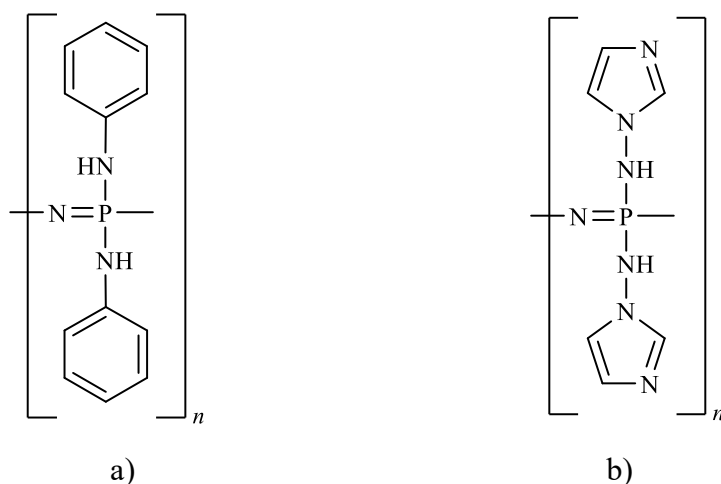
Stabilita vůči hydrolyze závisí na povaze bočních skupin (jejich velikosti, schopnosti odstupu) i na typu P–X vazby. [9] Například bylo zjištěno, že polymery  $-\text{NR}_2$  bočními skupinami podléhají biodegradaci snáze než polymery s  $-\text{OR}$  skupinami.

Zmíněné aminofosfazeny (**Obr. 12**) jsou zkoumány jako potenciální nosiče bioaktivních látek. Proto je studium jejich odolnosti vůči hydrolyze důležité.

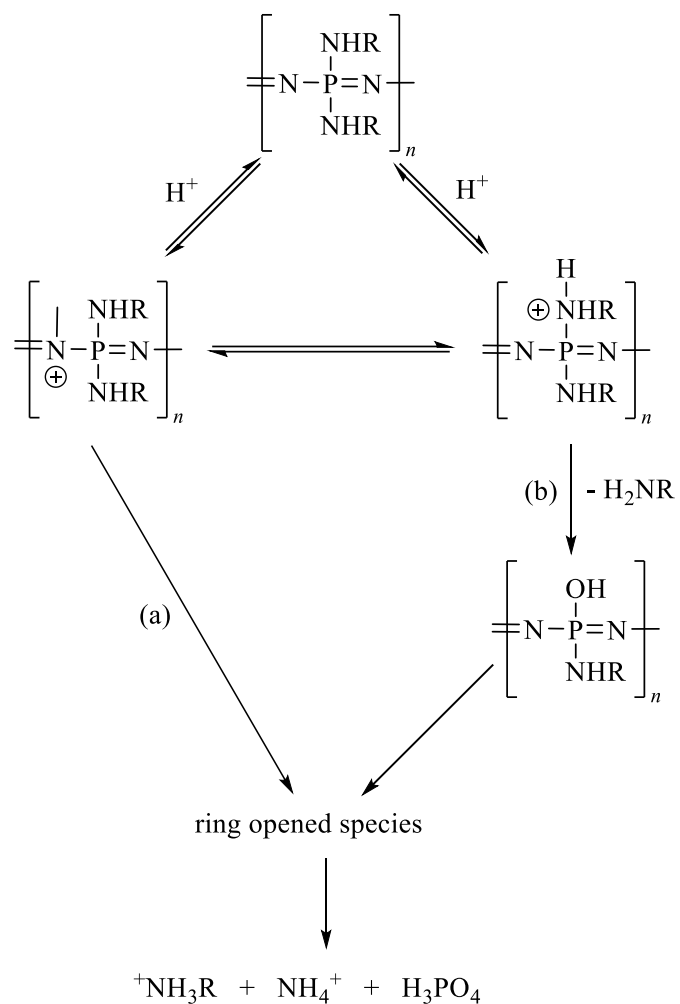


*Obr. 12:* Strukturální jednotka aminoderivátů fosfazenu [25]

Studium rozpustnosti vysokomolekulárních aminocyklotrifosfazenů provedl Allock se svým týmem. [25] Zkoumána byla rozpustnost fosfazenů s různými substituenty R ve vodě, vodném dioxanu, kyselinách a bázích. Výsledky ukázaly, že odolnost vůči hydrolyze i stabilitu v kyselém i bazickém prostředí těchto derivátů ovlivňuje nejen velikost a stálost odstupující skupiny, ale také míra elektronové donace exocyklického dusíku. Silná elektronová donace podporovala protonaci dusíkových atomů v kruhu, což vedlo k okamžitému štěpení kruhové struktury. Při slabé donaci docházelo k protonaci exocyklického dusíku, která umožnila odstup dané skupiny, přičemž štěpení kruhu nastávalo až v pozdějších fázích hydrolyzy. Typickým příkladem substituentu vyvolávajícího okamžité štěpení byl anilinový zbytek (**Obr. 11 a**), zatímco imidazolylová skupina (**Obr. 11 b**) představovala zástupce snadno odstupující skupiny ve vodném prostředí.



*Obr. 13:* a) anilinový substituent vyvolávající hydrolyzu  
 b) imidazolylová skupina jako dobrá odstupující skupina [25]



Obr. 14: Mechanismus protolýzy polymerních fosfazenů [25]

a) hydrolýza vyvolaná protonací atomu dusíku v řetězci fosfazenu

b) uvolnění protonované odstupující skupiny

## 1.4 Biologická aktivita

Zajímavým odvětvím výzkumu vlastností fosfazenů pro medicínské využití je jejich bioaktivita. S rostoucí pozorností věnovanou chemii těchto organofosforových sloučenin přirozeně roste zájem také o průzkum jejich biologických účinků, přičemž řada vědeckých skupin ukazuje, že se nejedná o slepou uličku.

Významnou oblastí je zejména jejich antimikrobiální aktivita. Patogenní bakterie vykazují rostoucí odolnost vůči běžně dostupným léčivům. [26] Určité deriváty fosfazenů by však mohly představovat novou alternativu v boji proti těmto infekcím. Výzkum se zaměřuje jak na polyfosfazeny, tak na cyklopolyfosfazeny. Deriváty cyklopolyfosfazenů, primárně trimerů a tetramerů, mohou v závislosti na typu zavedeného substituentu vykazovat antimikrobiální i antifungální účinky.

Například byly zkoumány ansa- a spiro-deriváty s oxo- a aminoskupinami [27] nebo fosfazeny s navázanými tetradentátními ligandy ve spojení s dusíkatými heterocykly [28]. Další zajímavé výsledky přináší studie zaměřené na využití polyfosfazenů jako platformy schopných koordinovat ionty stříbra ( $\text{Ag}^+$ ), které jsou samy o sobě známé svými antibakteriálními vlastnostmi. Laboratoře hlásí vynikající výsledky také při přípravě komplexů amino(cyklofosfazenů) s  $\text{Ag}^+$  ionty, které vykazují výjimečné antibakteriální účinky. [29]

Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtí na celém světě a její léčba je předmětem intenzivního výzkumu. Mezi významné aktéry tohoto vývoje patří i deriváty fosfazenů, a to zejména díky své nízké toxicitě a v případě cyklofosfazenů také monodisperzitě. Příkladem úspěšného výzkumu jsou již zmíněné metalofosfazeny testované na buněčné linii MCF-7 (lidské buňky karcinomu prsu). [29] Nicméně stříbrné částice, přítomné v některých komplexech, mohou ve vyšších koncentracích způsobovat intoxikaci okolních tkání.

Cytotoxické deriváty byly rovněž připraveny v experimentech, které substituovaly hexachlorocyklotrifosfazen heterocyklickými deriváty chalkonu. [30] Chalkon je aromatický keton získávaný z rostlin a je známý pro své pozitivní bioaktivní vlastnosti. Rakovinné buněčné linie lidských karcinomů vaječníků a prostaty (A2780, PC-3, LNCaP) byly vystaveny různým koncentracím těchto derivátů, přičemž došlo k výraznému snížení životaschopnosti rakovinných buněk. Důležitým zjištěním bylo, že tyto velké molekuly měly oproti volným chalkonům větší afinitu k enzymům ovlivňujícím přežití buněk (například Bcl-2, kaspáza-3). Navíc se tyto flexibilní struktury mohly snadno začlenit do řetězce DNA, a tím jej významně poškodit. Je však třeba podotknout, že experimenty byly zatím provedeny pouze *in vitro*.

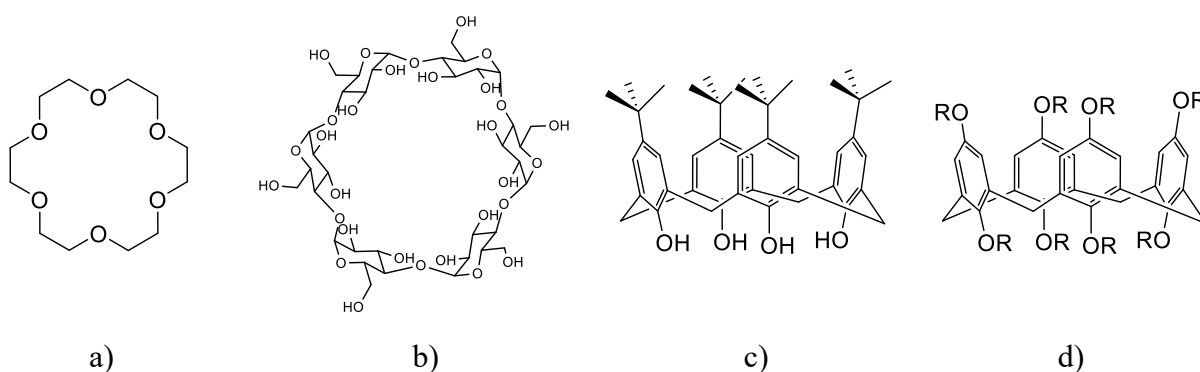
Derivátů fosfazenů s potenciální antitumorovou aktivitou bylo prozkoumáno mnoho [31], přičemž každý derivát přináší své specifické výhody, ale bohužel i určité nevýhody. V některých případech byla dokonce zaznamenána podpora proliferace buněk. [27] Přesto současné experimenty poskytují důležité informace a tvoří pevný základ pro budoucí výzkum.

## 1.5 Host-guest chemie

Vzhledem k jejich bioaktivitě a strukturální variabilitě se fosfazeny ukazují jako slibné nejen v oblasti medicíny, ale i v designu sofistikovaných materiálů. Jednou z oblastí, kde nacházejí stále větší uplatnění, je host-guest chemie.

Host-guest chemie je odvětvím supramolekulární chemie, které se zabývá tvorbou a chováním komplexů složených ze dvou a více molekul či iontů, jejichž vazba je velmi specifická. Částice jsou poutány nekovalentními interakcemi, které se často podílejí na tvorbě trojrozměrných struktur makromolekul, jako jsou například proteiny. Typickými nekovalentními interakcemi jsou vodíkové vazby, iontové vazby, van der Waalsovy síly a hydrofobní interakce.

Příklady host-guest systémů jsou běžné v přírodě a mnohé z nich zastávají nenahraditelnou roli. Patří k nim například komplexy enzymů se substráty, které spolu interagují prostřednictvím reverzibilních nekovalentních sil. Dalším příkladem je hemoglobin, kde atomy železa fungují jako "guest" částice. Přítomnost těchto systémů v přírodních procesech přilákala značnou pozornost výzkumných skupin a v posledních letech získává chemie těchto komplexů na popularitě. Běžně používanými „host“ molekulami jsou například crown-ethery, cyklodextriny, kalixareny nebo pillarareny (**Obr. 15**). [32]

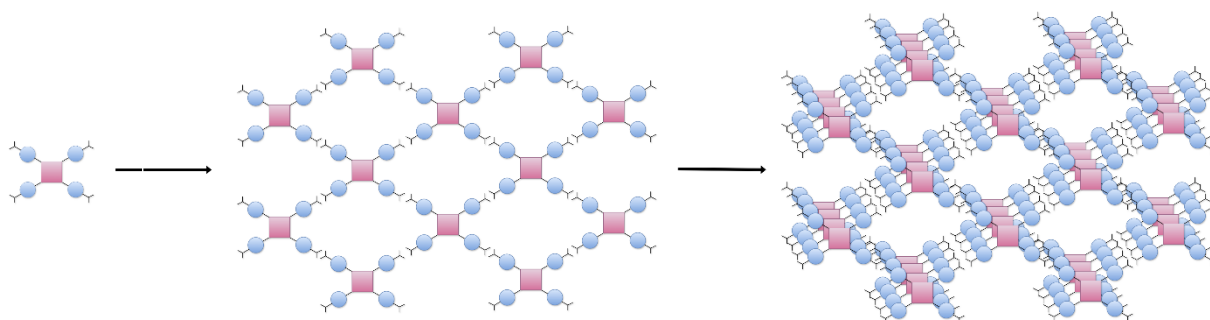


Obr. 15: Supramolekuly využívané v host-guest chemii

a) 18-crown-6, b)  $\beta$ -cyklodextrin, c) kalix[4]aren d) pillar[4]aren

Kromě makrocyclických molekul mohou nacházet uplatnění v host-guest chemii také mikroporézní materiály, tedy látky s póry menšími než 2 nm. Tato jemná porézní struktura jim uděluje unikátní vlastnosti, jako vysoký měrný povrch a výborné adsorpční schopnosti. Díky těmto vlastnostem nachází široké uplatnění v katalýze, jako molekulová síta, nebo v medicínských aplikacích. Patří mezi ně například aktivní uhlí nebo zeolity.

Substituované molekuly fosfazenů mohou sloužit jako stavební kameny pro vytváření těchto materiálů, konkrétně materiálů ze skupiny HOF (Hydrogen-bonded Organic Frameworks) (*Obr. 16*). [33] Jedná se o novou třídu porézních krystalických látek, v nichž jsou organické molekuly propojeny vodíkovými vazbami, čímž vznikají až trojrozměrné struktury.



*Obr. 16:* Samospořádání HOF struktur ze stavebních jednotek [34]

HOF materiály kombinují výhody dříve známých COF (Covalent-Organic Framework) a MOF (Metal-Organic Framework) materiálů, například vysokou míru uspořádanosti a pravidelnosti krystalové struktury, nízkou hustotu, nízkou toxicitu či snadnou regeneraci prostřednictvím rekrystalizace díky schopnosti sebeléčení. Navíc jsou šetrné k životnímu prostředí. Díky nízké směrovosti vodíkových vazeb jsou tyto materiály odolnější vůči deformacím, což může vést k vyšší adsorpční kapacitě.

Nevýhodou HOF materiálů je nižší stabilita vodíkových vazeb v porovnání s kovalentními COF nebo koordinačními MOF vazbami. V poslední době však byly vyvinuty strategie pro přípravu stabilnějších HOF systémů, kde stabilitu zajišťují vhodné guest molekuly, které pomáhají držet strukturu pohromadě. [35]

V případě fosfazenů je tvorba vodíkových můstků umožněna přítomností volného elektronového páru na endocyklickém atomu dusíku. [36] Jeho bazicita, a tedy schopnost poskytovat elektrony, závisí především na povaze substituentů na atomu fosforu ( $-X$ ). Elektrondonorní skupiny, jako například aminoskupiny ( $-NR_2$ ), zvyšují bazicitu kruhu a tím i dostupnost elektronů atomu dusíku, což zpřístupňuje místa vhodná pro tvorbu vodíkových interakcí.

Velmi vhodnými deriváty fosfazenů pro stavbu HOF struktur jsou spirofosfazený, získávané reakcí s diaminovými sloučeninami. Atom choru vázaný na atom fosforu může být nahrazen dvěma  $-NR_2$  skupinami z jedné molekuly diaminu, čímž se atom fosforu začlení do další cyklické jednotky a vznikne spirostruktura. Výhodou těchto spirofosfazenů je nejen

rigidita molekul, ale také jejich schopnost vytvářet nejen 2D vrstvy a efektivně z nich tvořit prostorové struktury.

## 1.6 Metody strukturního výzkumu fosfazenových sloučenin

Pro zkoumání struktur se nabízí široká škála analytických metod. Umožňují nám pochopit uspořádání atomů a vazeb molekul, nadmolekulárních struktur, a charakterizaci přítomných látek z hlediska jejich uspořádání, čistoty a funkčnosti s možností vysvětlit i predikovat reaktivitu.

Analýza nám na základě použité metody může o vzorku dodat několik charakteristik. Zejména kvalitativní údaje, tedy složení vzorku (NMR, MS, spektroskopie) a informace o konkrétní struktuře pevného vzorku (ssNMR, RTG). Kvantitativní analýzu níže uvedené metody umožňují jen relativní, tedy neudávají přesný obsah, pouze poměr složek.

Při volbě analytické metody je důležité zvážit několik faktorů. Nejzásadnějšími jsou destruktivita metody, její citlivost, a tedy požadované množství vzorku nebo schopnost rozlišit jednotlivé složky vzorku, ale také její rychlost provedení, cenová náročnost nebo bezpečnost. V chemii fosfazenů nachází vhodné využití několik analytických technik.

### 1.6.1 NMR spektroskopie

NMR spektroskopie využívá jevu zvaného nukleární magnetická rezonance. Tento jev je typický pro atomová jádra s nenulovým spinem a dochází k němu při umístění těchto jader do vnějšího magnetického pole.

Jádro s nenulovým spinem se chová jako malý magnet, a má tedy vlastní magnetický moment, který je v nepřítomnosti magnetického pole náhodně orientovaný. Při působení vnějšího magnetického pole je tento moment silně ovlivněn, a to hlavně jeho orientace. Je orientován do stavů s nižší (spiny rovnoběžné s polem) nebo stavů s vyšší (spiny proti směru pole) energií. Spolu s tím začne jádro vykonávat precesní pohyb charakteristický hodnotou Larmorovy frekvence, která je pro každé jádro jedinečná.

Ozářením vzorku radiofrekvenčním impulsem s frekvencí odpovídající Larmorově frekvenci jádra, dojde k excitaci jader z nižších do vyšších stavů. K absorpci energie tedy dochází jen tehdy, kdy jsou si hodnoty obou frekvencí rovné, tedy když dojde k rezonanci.

Nejlépe jsou NMR spektroskopii detekovatelná jádra se spinovým kvantovým číslem  $I = \frac{1}{2}$ . Ta mají spinový magnetický moment a jsou tak pro NMR viditelná. Na rozdíl od jader s  $I > \frac{1}{2}$ , jsou snáze měřitelná, jelikož nevykazují kvadrupólový moment.

Elektrony obklopující dané jádro, ať už jeho vlastní či náležící jinému blízkému atomu, tvoří vlastní magnetické pole. Velikost efektivního magnetického pole, které nakonec působí na jádro, je tak jiná od velikosti vnějšího pole. To vede k různým rezonančním frekvencím jader s odlišným chemickým okolím, která se pak liší hodnotou tzv. chemického posunu. [37]

Jednotkou chemických posunů je ppm vyjadřující rozdíl mezi rezonanční frekvencí daného jádra a frekvencí referenční látky. Je-li v okolí jádra vyšší elektronová hustota, jeho stínění je větší, efektivní magnetické pole menší a s ním i hodnota rezonanční frekvence v ppm. Vliv na tuto veličinu má nejen elektrondonorní nebo elektronakceptorní substituenty. K různým posunům vedou různé oxidační stavy jader či koordinační čísla – v obou případech mají různá okolí na svědomí konkrétní elektronovou hustotu, a tak i chemický posun. Použité rozpouštědlo rovněž významně ovlivňuje výsledné spektrum. [38] Polární rozpouštědla mohou molekuly vzorku solvatovat nebo tvořit vodíkové můstky s jejich polárními skupinami. Oba tyto jevy vedou ke specifickému rozložení elektronů v okolí jádra a v návaznosti také jeho chemickému posunu.

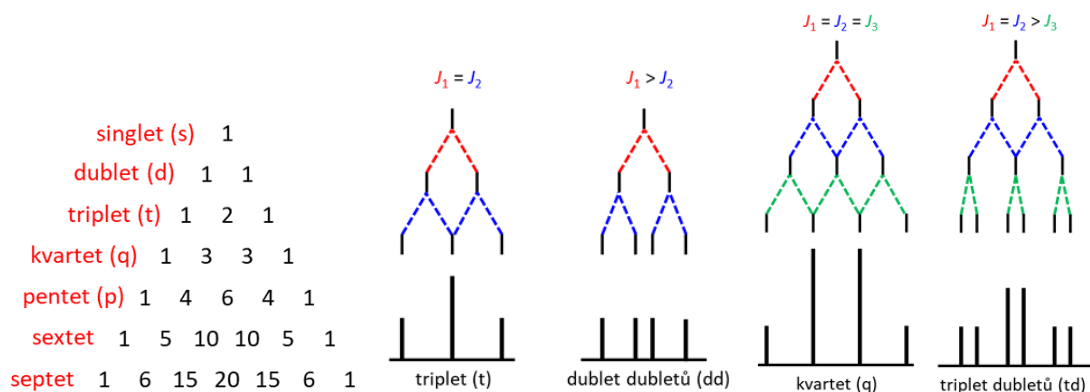
Různé chemické posuny znamenají také energie radiofrekvenčního impulsu potřebného k excitaci. Aby byla zajištěna excitace všech jader v rámci jednoho měření, ozařuje se vzorek krátkým širokospektrálním 90° radiofrekvenčním impulzem.

Mezi blízkými jádry vázanými v molekule může docházet k interakci zprostředkovanou vazebnými elektrony – nepřímé spin-spinové interakci. Při této interakci dvou neekvivalentních jader mohou nastat dva případy: hodnoty jaderných spinů mají buď stejné nebo opačné znaménko. V případě znamének stejných je energie systému vyšší než u znamének opačných. Dochází tak ke štěpení spinových stavů jader tak, že každý dá vzniknout 2 energetickým hladinám. Lze tak pozorovat více energetických přechodů, které mají různé energetické rozdíly. To se ve spektru projeví vznikem multipletů.

Velikost interakce udává interakční konstanta  $J$  [Hz]. Interakce může probíhat i mezi jádry vzdálených o několik vazeb, proto je často je připisován levý horní index označující počet těchto vazeb. Hodnota konstanty může být kladná nebo záporná a rovná se vzdálenosti čar v multipletech. Dá se tedy snadno odečíst ze spekter, avšak jen její absolutní hodnota.

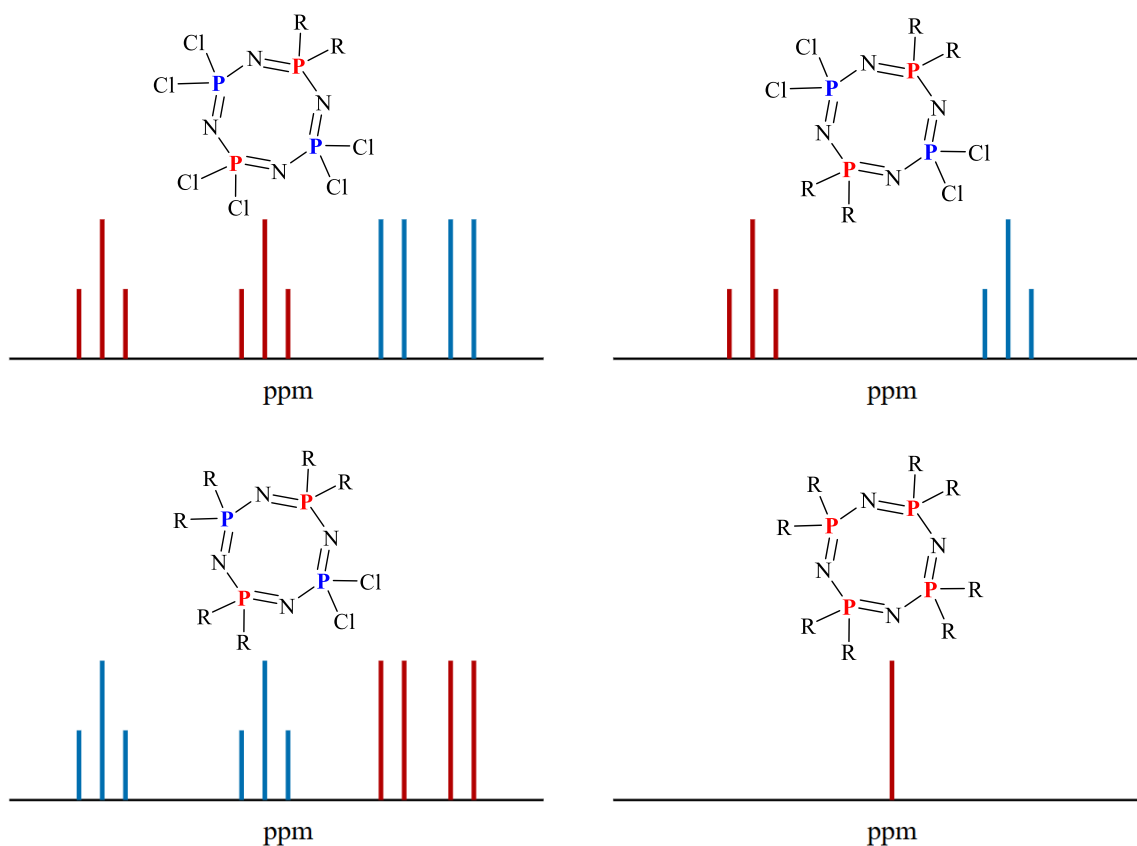
Při interakci jádra s jádry, která jsou si navzájem ekvivalentní, je hodnota  $J$  konstanty stejná. Tato skutečnost se taktéž projeví při vzniku multipletů (**Obr. 17**). Jsou-li  $J$  konstanty interakcí shodné, dochází při štěpení signálů zároveň ke splývání prostředních linií, jelikož ty ve výsledku nabývají stejných hodnot spinových frekvencí. Poměry intenzit linií odpovídají řádkům Pascalova trojúhelníku.

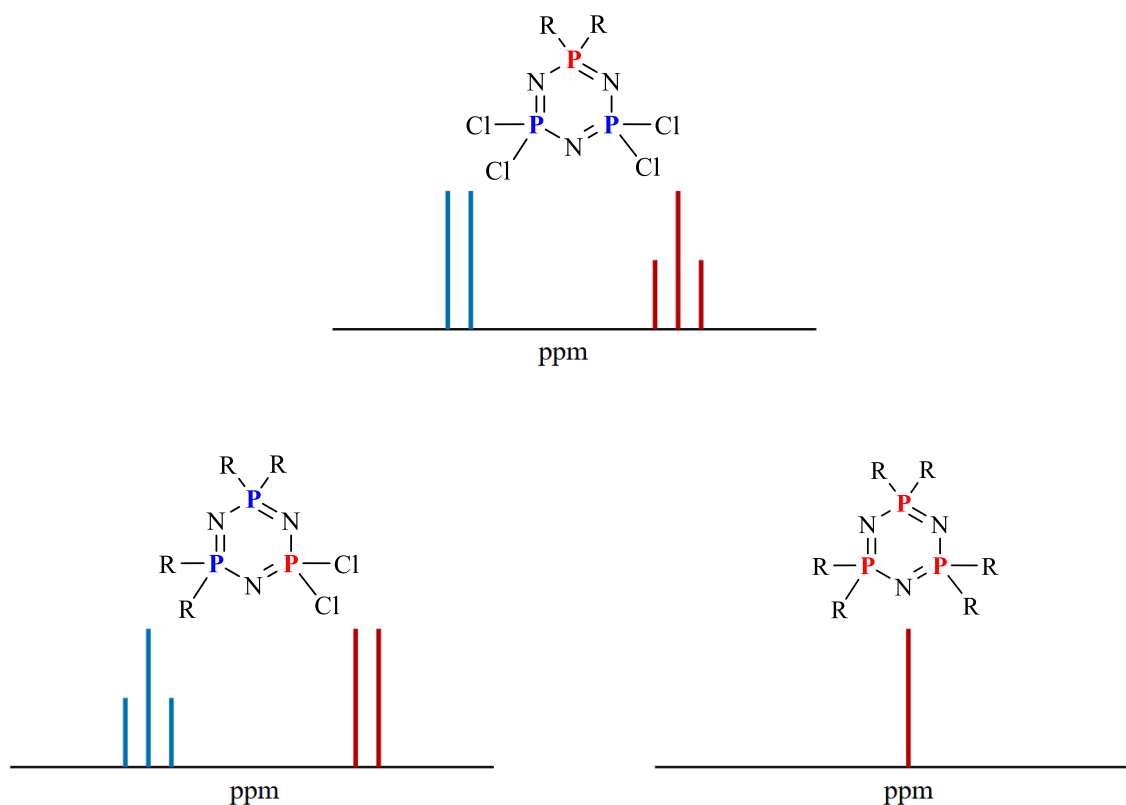
Pokud jsou interagující jádra neekvivalentní, mají interakce různé hodnoty konstanty  $J$ , není vznik multiplétů porovnatelný s Pascalovým trojúhelníkem. Nesourodé hodnoty konstant vedou k odlišným vzdálenostem mezi liniemi, a proto nemusí vždy dojít k překryvu hodnot frekvencí a splynutí linií.



Obr. 17: Vznik multiplétů v NMR spektru štěpením jádry se stejnou interakční konstantou  
Převzato z: Dračínský, M. NMR spektroskopie pro chemiky. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2021. s. 25, 26.

Pro chemii fosfazenů je užitečná  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{14/15}\text{N}$  NMR spektroskopie. Obecně je NMR výhodnou metodou, jelikož se jedná o nedestruktivní a rychlou metodu. Mimoto jsou  $^{31}\text{P}$  spektra relativně jednoduchá k řešení.





Obr. 18: Porovnání  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  spekter derivátů hexachlorocyclotriphosphazenu a oktachlorocyclotriphosphazenu podle stupně substituce (vzhled spekter je inspirován vlastními experimenty)

S doplňkem  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{14/15}\text{N}$  NMR dává tato metoda dobré povědomí o průběhu reakce a struktuře molekul.

K analýze špatně rozpustných nebo krystalických struktur je užitečné ssNMR. Metoda umožňuje v rámci jednoho měření získat kvalitativní informace o analyzovaném vzorku, ale také jeho konkrétní krystalickou strukturu.

## 1.6.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie umožňuje analýzu kapalných, pevných i plynných vzorků. Prvním krokem je vždy ionizace analytů, což vede ke vzniku nabitých částic. Molekula přebírá od ionizujících částic jejich energii, a získaný nadbytek energie se projeví fragmentací molekul na menší části. Metoda využívá dělení vzniklých fragmentů podle poměru  $m/z$ , tedy hmotnosti a náboje. Na základě těchto parametrů jsou v analyzátoru za využití různých fyzikálních principů (průletový, magnetický analyzátor, iontová past, ...) odděleny a částice dopadají na detektor v různém čase. Výsledkem je hmotnostní spektrum, které ukazuje relativní zastoupení fragmentů ve vzorku.

Iontový zdroj je část spektrometru, ve kterém dochází k ionizaci vzorku. Ionizačních metod byla objevena celá řada a každá dává jiné možnosti analýzy. Při volbě metody je třeba zvážit

charakter zkoumaného vzorku a také cíle měření. Z hlediska vzorku je důležité brát ohled na jeho stabilitu, tepelnou labilitu, polaritu či velikost. Jednodušeji by se dalo říci, že volba může být provedena podle skupenství analytu.

Pro plynné vzorky, tedy látky těkavé ale zároveň tepelně stabilní, je vhodná elektronová ionizace (EI) nebo chemická ionizace (CI). [39]

Látky naopak málo těkavé je k ionizaci potřeba do plynného skupenství převést. Analyty rozpustné v těkavých rozpouštědlech jsou do iontového zdroje po kapkách vstříkovány a ionizovány ve formě aerosolu. To umožňuje ionizace elektronsprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).

K analýze pevného skupenství, obzvláště makromolekul, je vhodná technika MALDI-MS (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry). Zde je vzorek rozpuštěn v rozpouštědle obsahujícím malé organické molekuly – matrici. Zabudování vzorku do chemické matrice nese velkou výhodu ve formě usnadnění převodu těchto velkých molekul, netěkavých a tepelně labilních látek do plynné fáze. Při ozáření laserem, zmíněným v názvu metody, je matrice schopná absorbovat jeho světelnou energii a analyt tak ionizovat a převést do plynné fáze. Při volbě matrice je třeba zvážit několik faktorů: jestli je schopná ukotvit a izolovat analyty, absorbovat laserové záření, zda je stabilní ve vakuu a další. [40]

MALDI má také významný přínos do analýzy nerozpustných látek. [40] K zabudování do matrice sice není možné dojít smícháním s jejím roztokem. Avšak dnes je již známo, že při dobrém rozemletí vzorku, mechanickém smícháním s práškovou matricí a jejich následném lisování, je dosaženo podobného efektu, a tím pádem je možné laserovým ozáření matrice převést i nerozpustný vzorek do plynné fáze, a tak ho analyzovat na hmotnostním spektrometru.

Jak bylo řečeno, při volně ionizační techniky je také důležité si uvědomit, jaký je cíl měření. Je-li snaha zjistit například molární hmotnosti nebo strukturních informací. V tomto ohledu záleží, zda je metoda takzvaně tvrdá či měkká. U tvrdých metod, jako je elektronová ionizace, molekula získává od bombardujících elektronů nadbytek energie, který se projeví fragmentací na malé části. Z těchto spekter tak bývá obtížnější objasnit strukturu látky, avšak vysoká energie elektronů má za následek nejvyšší citlivost detekce a je možné z nich určit například molární hmotnost či molekuly identifikovat. Měkká metoda, kterou je chemická ionizace, nedodává molekule takové množství energie a způsobují tudíž jen malou fragmentaci, konkrétně CI primárně vznik (de)protonovaných částic. Je tak dobrou volbou při snaze objasnit strukturu molekul.

Za důležité také považují zmínit pozitivní a negativní mód hmotnostní spektrometrie. Všechny ionizační metody produkují nabitě částice. Avšak některé produkují kladně nabitě (EI),

jiné záporně nabité (negativní CI) a jsou také metody, které produkují oba typy částic (ESI). Označení „pozitivní/negativní mód“ popisuje náboj vznikajících a detekovaných částic. Mimoto se metody liší fragmentací (negativní ionizace vykazuje menší fragmentaci) a aplikací. Negativní mód je vhodný k analýze molekul jako kyseliny, fenoly a nitrosloučeniny, které snadno ionizují a dávají vzniknout záporným částicím. [41]

Historicky byl negativní mód méně rozšířený, a také v dnešní době se pozitivní mód využívá častěji, i když v nemálo případech může být negativní mód efektivnější.

Hmotnostní spektrometrie umožňuje poměrně jednoduchou kvalitativní, ale také kvantitativní analýzu. Jednoduchost tkví v přímočarosti hmotnostních spekter a rychlosti, se kterou lze tato spektra získat.

Při substitučních reakcích prováděných na fosfazenech často vznikají špatně rozpustné vedlejší produkty, které se vylučují ve formě sraženin. Tehdy může s rozbořem pomoci hlavně MALDI-MS.

### **1.6.3 Rentgenostrukturní analýza**

Látky v pevném skupenství se mohou vyskytovat ve dvou stavech – amorfním a krystalickém. Pouhým okem není vždy snadné tyto struktury rozeznat, a to právě kvůli tomu, že zásadní odlišnost se skrývá až na atomové úrovni. Rozdíl mezi těmito dvěma stavy tkví v uspořádanosti systému. V krystalickém stavu jsou homologní částice uspořádány do pravidelných opakujících se struktur. Částice dávají vzniknout elementárním buňkám, které se rovnají do krystalových mřížek a soubor těchto mřížek pojí nekovalentní interakce do krystalické podoby. Právě jejich dalekosáhlé uspořádání, které amorfním látkám chybí, je základním předpokladem pro tvorbu krystalů, a tak i rentgenovou krystalografií. [42]

Zásadním jevem pro rentgenovou krystalografií je difrakce záření. Vzorek krystalů je ozářen, s dopadem záření na krystalové mřížky dojde k difrakci (ohybu paprsků o přítomné elektrony) a interferenci paprsků, které následně dopadají na detektor připojený k počítači. Výsledkem je obraz struktury analyzovaného objektu zobrazeného na obrazovce počítače.

Významným kritériem pro celý tento děj je Braggův zákon (1):

$$2d\sin\theta = n\lambda$$

kde  $d$  je mezirovinná vzdálenost,  $\theta$  je úhel dopadu,  $\lambda$  vlnová délka rentgenového záření a  $n$  je celé číslo.

Z tohoto vztahu plynou 2 závěry:

- 1) Aby došlo k difrakci záření, musí být jeho vlnová délka velmi blízká mezirovinné vzdálenosti, tedy vzdálenosti atomů vázaných v molekulách pevných látek. To platí pro vlnovou délku rentgenového záření, proto je při této metodě využíváno. Například viditelné světlo by být využito nemohlo, jelikož má příliš dlouhou vlnovou délku.
- 2) Konstruktivní interference je dosaženo tehdy, když rentgenové záření dopadne na mřížku pod úhlem  $\theta$ , pro který platí Braggův vztah, tedy  $n$  je celé číslo. Výsledkem jsou intenzivní difraktované paprsky. Pokud tato podmínka není splněna, dochází k interferenci destruktivní a intenzita paprsků se snižuje. [43]

Výsledné záření dopadá na detektor. Pro měření intenzit paprsků difraktovaných při analýze krystalů malých molekul, je možné využít scintilační detektory. Avšak v případě makromolekul je potřeba sběr většího množství signálů. Na to scintilační detektory nestačí a bývají tak nahrazeny plošnými detektory. Detektory jsou schopné analyzovat polohu dopadu a intenzitu dopadajícího záření. Při použití vhodných detektorů, jako je rentgenový film, lze dojít vizualizace dopadajících paprsků, která je vidět pouhým okem – u analýzy monokrystalů by byly pozorovatelné tečky o různé intenzitě. Každá tečka náleží konkrétní sadě rovin uvnitř krystalu. Proto informace o intenzitě doprovází Millerovy indexy ( $h, k, l$ ), které definují tuto sadu rovin.

Počítačovou analýzou a matematickými výpočty, konkrétně Fourierovou transformací, jsou tyto „tečky“ převeditelné na mapu elektronové hustoty. Zjednodušeně by se dalo říct, že jelikož dochází k difrakci rentgenových paprsků o elektrony krystalu, znamená vyšší koncentrace elektronů v daném místě větší difrakci, a tak vyšší intenzitu „tečky“. Mapa elektronové hustoty tedy udává informace o rozložení elektronů a s tím i atomů v prostoru. Opětovným využitím počítačové techniky je tak dosažitelná 3D struktura molekul tvořících krystaly.

### 1.6.4 Absorpční spektroskopie

Pojem absorpční spektroskopie je nadřazený UV-VIS, fluorescenční, infračervené a dalším typům spektroskopie, která k analýze vzorku zkoumá úbytek intenzity procházejícího elektromagnetického záření – absorpenci. Spektroskopie může být obecně atomová či molekulová. K tomuto dělení dochází na základě zkoumaných entit, tedy pokud jsou zjišťovány informace o přítomných atomech či celých molekulách.

Je-li analyt ozařován proudem fotonů o vlnové délce odpovídající rozdílu energií hladin systému, pohltí vzorek část energie tohoto záření. To způsobí snížení intenzity záření a vedle toho excitaci systému. V atomové absorpční spektroskopii tím dochází k excitaci valenčních elektronů, v molekulové mimoto k excitaci molekuly do vyšších vibračních a rotačních stavů.

Provede-li se měření intenzity záření před a po průchodu vzorkem, lze získat čárové (AAS) nebo pásové (molekulová AS) absorpční spektrum. To ukazuje závislost absorpance na vlnové délce působícího záření a lze z něj určit, při jaké vlnové délce je absorpance vzorku nejvyšší. Rozdíly energetických hladin jsou pro každý systém jedinečné. Na základě toho je možné provést kvalitativní i kvantitativní analýzu.

### 1.6.5 Emisní spektroskopie

Tento typ spektroskopie sleduje elektromagnetické záření emitované nestabilními excitovanými atomy nebo molekulami.

Prvním krokem této metody je excitace částic, a to nejčastěji teplem, elektrickým výbojem, nebo indukčně vázaným plazmatem. Při návratu do nižšího stavu emitují přebytečnou energii ve formě fotonů o vlnové délce, která odpovídá energii přechodu. V UV-VIS oblasti dochází k uvolnění energie nejčastěji formou fluorescence nebo fosforescence. K fluorescenci dochází v důsledku rychlého přechodu částic mezi singletovými stavy a jde tedy o okamžité uvolnění energie ve formě záření v řádu několika nanosekund. Jsou-li částice excitovány do tripletového stavu, dojde k tzv. zakázanému přechodu. V tomto případě dochází k deexcitaci částic do základního stavu pomaleji. Tento typ luminiscence je označován jako fosforescence.

Vlnová délka vyzářeného světla se od délky absorbované energie liší. Rozdíl vlnových délek se označuje Stokesův posun a je způsoben relaxací elektronu v materiálu.

Následuje rozdělení zachyceného záření podle jednotlivých vlnových délek. Jelikož jsou energetické hladiny jedinečné pro daný systém, nesou hodnoty vlnových délek kvalitativní informaci. Výsledkem měření je taktéž čárové nebo pásové spektrum, ve kterém poloha čar vyjadřuje ony hodnoty vlnových délek, zatímco jejich intenzita mluví o kvantitě částic.

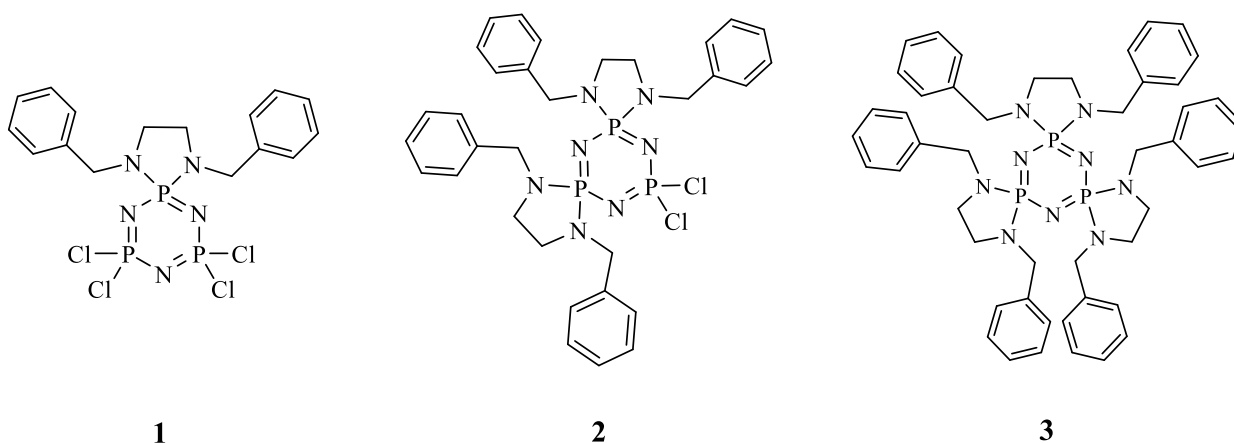
## 2 Cíl práce

Cílem práce byla příprava spirocyklických derivátů cyklického trimeru a tetrameru (hexachlorocyklotrifosfazenů a oktachlorocyklotetrafosfazenů), které by potenciálně mohly najít uplatnění jako nosiče léčiv, tvorbu HOF materiálů pro ukládání nebo separaci plynů.

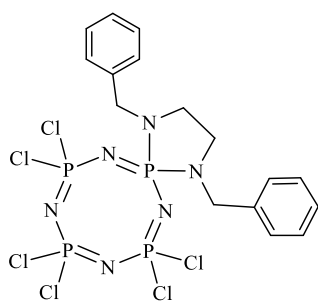
Snaha byla konkrétně o syntézu spirocyklických derivátů substitucí fosfazenových atomů chloru *N,N*-dibenzylethyldiaminem, zkráceně benzatinem, který je již běžně používaný v medicíně v kombinaci s penicilinem G. [44] Příkladem může být směs penicilin G benzatinu a penicilin G prokainu využívaná k léčbě streptokokové infekce dýchacích cest či kůže. [21] Navíc je zajímavý pro své sterické vlastnosti a koncové aromatické kruhy, které by mohly vést k uspořádání struktury a významným fluorescenčním vlastnostem. Přestože byly tyto [45] a podobné deriváty [46] [47] [48] již částečně připraveny, jejich příprava je popsána neúplně a jejich aplikační potenciál a vlastnosti nebyly dosud důsledně studovány.

**Obr. 19** a **20** ukazují možné spirocyklické deriváty, které lze teoreticky získat reakcí cyklických fosfazenů s benzatinem.

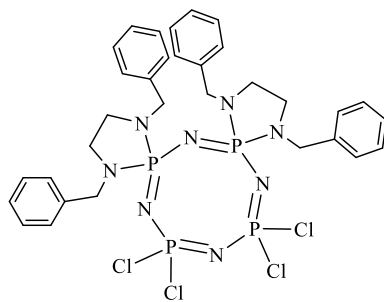
Mimo optimalizace syntéz s cílem vyhnout se chromatografické separaci, byla cílem také analýza připravených sloučenin z hlediska struktury, fyzikálních vlastností a toxicity.



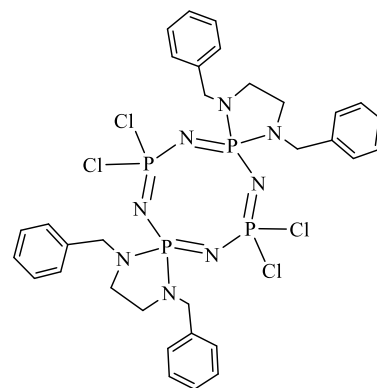
Obr. 19: Spirosloučeniny hexachlorocyklotrifosfazenu s *N,N*-dibenzylethyldiaminem



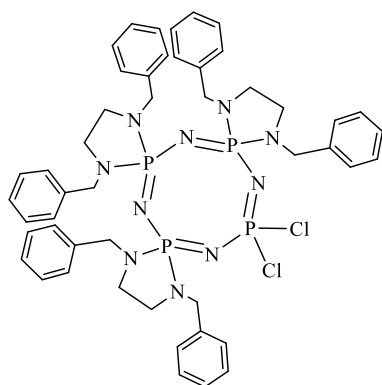
4



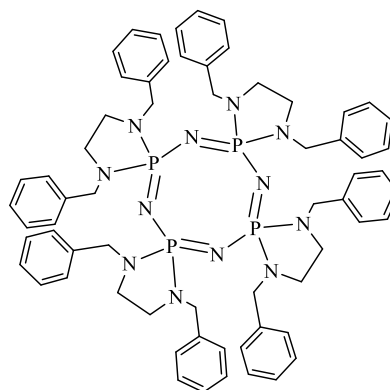
5



6



7



8

Obr. 20: Spirosoučineny oktachlorocyklotetrafosfazenu s *N,N'*-dibenzylethylendiaminem

## 3 Experimentální část

### 3.1 Obecná část

#### Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou komerčně dostupné (Sigma Aldrich) a byly použity bez další purifikace.

Čistý oktachlorocyklotetrafosfazen (tetramer) byl připraven v laboratoři Mgr. Alžbětou Hörnerovou, a to ze směsi s hexachlorocyklotrifosfazen (trimer) pomalou vakuovou sublimací při 50 °C a následnou krystalizací.

Suchá rozpouštědla byla získána ze sušícího systému PureSolv MD5 (Innovative Technology, USA) (hexan, diethylether, methanol, tetrahydrofuran, toluen). Ostatní rozpouštědla byla zakoupena od společnosti Chemicals United a taktéž používána bez dalšího čištění. Deuterovaná rozpouštědla pro NMR měření byla zakoupena od společnosti Eurisotop.

#### Analytické metody

##### *NMR spektrometrie*

Spektra  $^{31}\text{P}$  a  $^1\text{H}$  nukleární magnetické rezonance pro monitoring průběhu reakce byla měřena na spektrometru Bruker AVANCE NEO 400 MHz vybaveném sondou i-Probe  $^1\text{H}/^{19}\text{F}/\text{BB}$ . Charakterizační měření  $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  byla prováděna na přístroji Bruker AVANCE III 500 MHz opatřeném kryoskopickou sondou s ATM modulem (5 MM CPBBO BB- $^1\text{H}/^{19}\text{F}/^{15}\text{N}/\text{D Z}/\text{GRD}$ ). Měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Chemické posuny byly referencovány u  $^1\text{H}$  spekter na  $\delta\text{H}(\text{THF-}d_8) = 1,72$  ppm a u  $^{13}\text{C}$  spekter na  $\delta\text{C}(\text{THF-}d_8) = 25,31$  ppm. [49] Výsledky byly zpracovány v programu MestReNova. [50]

##### *Hmotnostní spektrometrie*

HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) byla prováděna na přístroji LTQ Orbitrap XL od společnosti Thermo Scientific za použití ionizace elektrosprejem.

## *Rentgenová strukturní analýza*

Pro monokrystaly **1**, **6** a **8** byla kompletní difrakční data získána při 150(2)K na difraktometru typu Bruker D8-Venture s Mo (Mo/K $\alpha$  zdroj;  $\lambda = 0.71073$  Å) mikrofokusovaným RTG (I $\mu$ S) zdrojem, data byla zaznamenána pomocí Photon CMOS III detektoru. Vzorek byl při měření chlazen přístrojem Cryostream 800 firmy Oxford Cryosystems na 150 K.

Difrakční záznamy byly integrovány a škálovány pomocí programového balíku Bruker SAINT. Korekce na absorpci byly provedeny použitím metod Multi-Scan (SADABS). Získaná data byla dořešena pomocí programů XT-version 2021/2 a SHELXL-2019/1 implementovaných v systému APEX4 v2019.2-0 (Bruker AXS).

Těžké atomy byly upřesněny anizotropicky. Vodíkové atomy byly většinou lokalizovány na diferenční Fourierově mapě, avšak pro konečné vyřešení krystalové struktury byly všechny vodíkové atomy přepočítány do ideálních pozic (riding model) podle přiřazených teplotních faktorů H iso (H) = 1,2 U eq pro arylové skupiny a H iso (H) = 1,5 U eq pro alifatické skupiny s délkami vazeb C–H = 0,96; 0,97; a 0,93 Å pro methyl, methylen, a vodíkové atomy aromatických kruhů.

Tabulka 1: Krystalografická data pro sloučeniny **1**, **6** a **8**

| Sloučenina   | <b>1</b>  | <b>6</b>  | <b>8</b>   |
|--|---|---|--|
| Sumární vzorec   | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> C <sub>14</sub> N <sub>5</sub> P <sub>3</sub> | C <sub>32</sub> H <sub>36</sub> C <sub>14</sub> N <sub>8</sub> P <sub>4</sub> | C <sub>64</sub> H <sub>72</sub> N <sub>12</sub> P <sub>4</sub> |
| M [g/mol]  | 515,06  | 798,27  | 1133,21  |
| Krystalografická soustava  | Jednoklonná   | Jednoklonná   | Jednoklonná  |
| Prostorová grupa   | <i>C2</i>   | <i>P2<sub>1</sub>/c</i>   | <i>P2/n</i>  |
| Teplota [T]  | 150   | 150   | 150  |
| Typ záření   | MoK $\alpha$  | MoK $\alpha$  | MoK $\alpha$   |
| <i>a</i> [Å]   | 21,1329(8)  | 14,7625(11)   | 16,3097(7)   |
| <i>b</i> [Å]   | 8,7352(3)   | 9,3775(8)   | 12,0238(6)   |
| <i>c</i> [Å]   | 6,0115(3)   | 26,999(2)   | 17, 3381(7)  |
| $\alpha$ [°]   | 90  | 90  | 90   |
| $\beta$ [°]  | 98,578(2)   | 103,995(3)  | 108,002(2)   |
| $\gamma$ [°]   | 90  | 90  | 90   |
| Jednotkový objem buňky [Å <sup>3</sup> ]                                 | 1097,31(8)  | 3626,6(5)   | 3233,6(3)  |
| Počet vz. jednotek v el. buňce, <i>Z</i>                                 | 2   | 4   | 2  |
| Počet změřených reflexí  | 28126   | 83215   | 101830   |
| Počet nezávislých reflexí  | 2716  | 6336  | 6326   |
| Počet pozorovaných reflexí   | 2687  | 5695  | 5523   |
| <i>R</i> <sub>int</sub>  | 0,025   | 0,092   | 0,100  |
| ( <i>sin</i> $\theta$ / $\lambda$ ) <sub>max</sub> (Å <sup>-1</sup> )    | 0,667   | 0,595   | 0,617  |
| <i>R</i> [ <i>F</i> <sup>2</sup> > 2 $\sigma$ ( <i>F</i> <sup>2</sup> )] | 0,018   | 0,123   | 0,068  |
| <i>wR</i> ( <i>F</i> <sup>2</sup> )                                      | 0,049   | 0,264   | 0,168  |
| <i>S</i> (míra shody s <i>F</i> <sup>2</sup> )                           | 1,09  | 1,15  | 1,23   |

### Absorpční a emisní spektrometrie

Za účelem měření absorpčních spekter v UV-VIS oblasti byl použit přístroj DS5 Double Beam UV-VIS Spectrophotometer od společnosti Edinburgh Instruments. Rozsah měření byl 200-700 nm. Spektra byla měřena v křemenných kyvetách s optickou drahou 1 cm.

Fluorescenční spektra látek byla měřena na přístroji FLS 980 spectrofluorimetr (Edinburgh Instruments) s 450W xenonovou lampou jako zdrojem excitace. Rozsah měření byl 320-850 nm. Experimenty byly měřeny v křemenných kyvetách s optickou drahou 1 cm.

### *Test cytotoxicity*

Cytotoxicita sloučenin byla hodnocena ve skupině Dr. Heleny Mertlíkové Kaiserové (ÚOCHB) na čtyřech rakovinných buněčných liniích (CCRF-CEM, HepG2, HeLa S3, HL-60) a jedné nenádorové – na lidských dermálních fibroblastech (NHDF). Všechny buněčné linie byly z ATCC (Manassas, VA, USA). Buňky byly udržovány v kultivačním médiu RPMI-1640 nebo DMEM obsahujícím 10 % FBS a 1 % GlutaMax bez antibiotik. Buňky byly naočkovány do 384jamkových bílých destiček (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) v koncentraci mezi 2 000 – 4 000 buněk na jamku (v závislosti na typu buněk, viz níže) a ponechány přes noc odpočívat. Následující den byla přidána 10 $\mu$ M koncentrace testovaných sloučenin, buňky byly inkubovány při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> po dobu 72 hodin, poté bylo přidáno detekční činidlo CellTiter-Glo® 2.0 (Promega, Madison, USA). Destička byla ponechána na třepačce (350 ot./min.) po dobu 5 minut při teplotě místnosti. Luminiscence byla měřena multimódovou čtečkou destiček. Signál buněk ošetřených sloučeninou byl vztažen k hodnotě neošetřené kontroly, která byla libovolně nastavena na 100% životaschopnost.

Nasazováno 20  $\mu$ L na jamku v koncentraci buněk:

- HepG2 40 000/mL (tj. 800 buněk/jamka) – buňky karcinomu jater
- HeLa 30 000/mL (tj. 600 buněk/jamka) – buňky karcinomu děložního čípku
- CEM 150 000/mL (tj. 3000 buněk/jamka) – leukemické buňky
- HL60 200 000/mL (tj. 4000 buněk/jamka) – leukemické buňky
- NHDF 100 000/mL (tj. 2000 buněk/jamka) – nerakovinná linie – dermální fibroblasty

po 72 hod přidáno 20  $\mu$ L Cell Titer Glo

Buňky se pěstují:

- CEM, HL60 v médiu RPMI-1640 s 1% GlutaMaxem a 10% FBS
- HeLa v médiu RPMI-1640 Dutch modification ( to je s 20 mM HEPES) s 1% GlutaMaxem a 10% FBS
- HepG2 v médiu MEM s 1% GlutaMaxem a 10% FBS
- NHDF v médiu DMEM High glucose s 1% GlutaMaxem a 10% FBS

## 3.2 Syntetická část

### 3.2.1 Optimalizovaný obecný postup

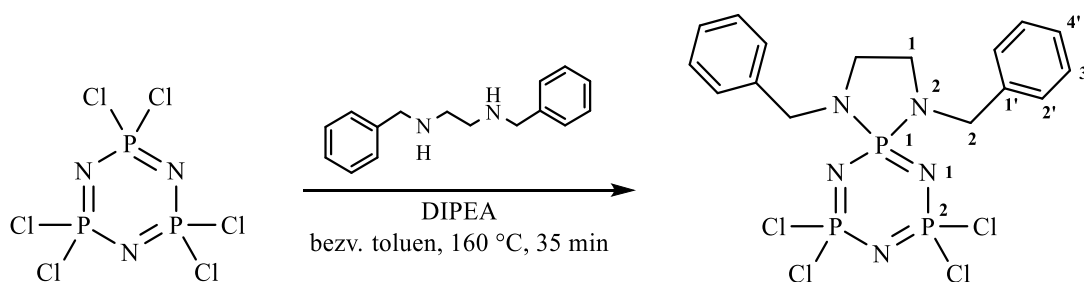
Do 150ml tlakové zkumavky opatřené magnetickým míchadlem byl navážen výchozí fosfazen. Krystalická látka byla za míchání rozpuštěna v suchém toluenu. Po rozpuštění byla injekční stříkačkou přidána DIPEA (diisopropylethylamin) jakožto báze neutralizující uvolňovanou HCl a nakonec benzatin, který reakci odstartoval (bylo možné pozorovat vznik bílé sraženiny).

Směs byla míchána při 160 °C. Po skončení zahřívání byla míra konverze kontrolována  $^{31}\text{P}$  a  $^1\text{H}$  NMR spektrometrií. Byl-li žádaný produkt majoritní složkou, směs byla přefiltrována přes filtrační papír do kulaté baňky, čímž byla oddělena bílá sraženina (*N,N*-diisopropylethylammonium hydrochlorid a *N,N'*-dibenzylethylendiammonium hydrochlorid) a žlutý filtrát. Filtrát byl odpařen na RVO (rotační vakuové odparce) a krystalizován.

Krystaly byly promyty acetonitrilem, čím byl odstraněn *N,N'*-diisopropylethylammonium hydrochlorid. Výsledným produktem byl práškový materiál. Posledním krokem bylo jeho dosušení ve vakuu ve Schlenkově baňce za zahřívání horkovzdušnou pistolí na 110 °C.

### 3.2.2 Příprava látky 1 – monospirotrimer

(1,4-dibenzyl-7,7,9,9-tetrachloro-1,4,6,8,10-pentaaza-515,715,915-triphosphaspiro[4.5]deca-5(10),6,8-triene)



Do tlakové zkumavky byl navážen hexachlorocyklotrifosfazen (trimer) (0,2 g, 1 ekv., 0,575 mmol). DIPEA byl přidán v nadbytku (0,5 ml, 5 ekv., 2,88 mmol) a následně byl přimíchán benzatin (0,135 ml, 1 ekv., 0,575 mmol). Směs byla 15 minut zahřívána na 160 °C, poté bylo zahřívání vypnuto a směs byla 3 dny míchána bez zahřívání. Po kontrole stavu reakce pomocí  $^{31}\text{P}$  a  $^1\text{H}$  NMR spektrometrie bylo shledáno, že konverze stále není úplná. Byl tedy přidán podíl další DIPEA (0,225 ml, 0,96 ekv., 1,29 mmol) a benzatin (0,045 ml, 0,33 ekv., 0,191 mmol).

V této podobě byla směs opět zahřívána 20 minut na 160 °C. Po zchladnutí byla konverze zkontrolována  $^{31}\text{P}$  a  $^1\text{H}$  NMR spektrometrií. Spektra ukázala monospirotrimer jako majoritní složku směsi.

Odpařením filtrátu na RVO vznikl odparek v podobě žluté pevné látky. Ta byla za horka pomalu rozpouštěna a výsledkem byl nasycený roztok, který byl umístěn do chladničky na tři dny. Vzniklé krystaly byly promyty acetonitrilem, čímž byl izolován lehce žlutý prášek, kterým byl žádaný produkt. Prášek byl sušen několik hodin. Bylo získáno 59,3 mg látky, což odpovídá výtěžku 20 %.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>):  $\delta$  = 7,43–7,36 (m, 4H, H2'); 7,33–7,26 (m, 4H, H3');

7,25–7,19 (m, 2H, H4'); 4,03 (d,  $^3J_{\text{PH}} = 9,4$  Hz, 4H, H2); 3,04 (d,  $^3J_{\text{PH}} = 10,5$  Hz, 4H, H1)

$^{31}\text{P}$  { $^1\text{H}$ } NMR (162 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>):  $\delta$  = 23,2 (d,  $^2J_{\text{PP}} = 43,7$  Hz, P2); 18,3 (t,  $^2J_{\text{PP}} = 43,7$  Hz, P2)

$^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } NMR (125 Hz, THF-*d*<sub>8</sub>):  $\delta$  = 138,17 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 6,35$  Hz, C1'); 129,25 (s, C2');

129,03 (s, C3'); 128,27 (s, C4'); 49,01 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 5,9$  Hz, C2); 44,02 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 14,57$  Hz, C1)

$^{15}\text{N}$  NMR (36 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ):  $\delta$  = 50,99 (N2); 106,51 (N1)

Teplota tání: 145 °C

MS (ESI): (+) 513,9597 [M + H]<sup>+</sup> (teoretická hodnota: 513,9602)

### 3.2.3 Příprava látky 6 – dispirotetramer

(1,4,10,13-tetrabenzyl-7,7,15,15-tetrachloro-1,4,6,8,10,13,14,16-octaaza-515,715,915,1515-tetraphosphadispiro[4.3.49.35]hexadeca-5(16),6,8,14-tetraene)

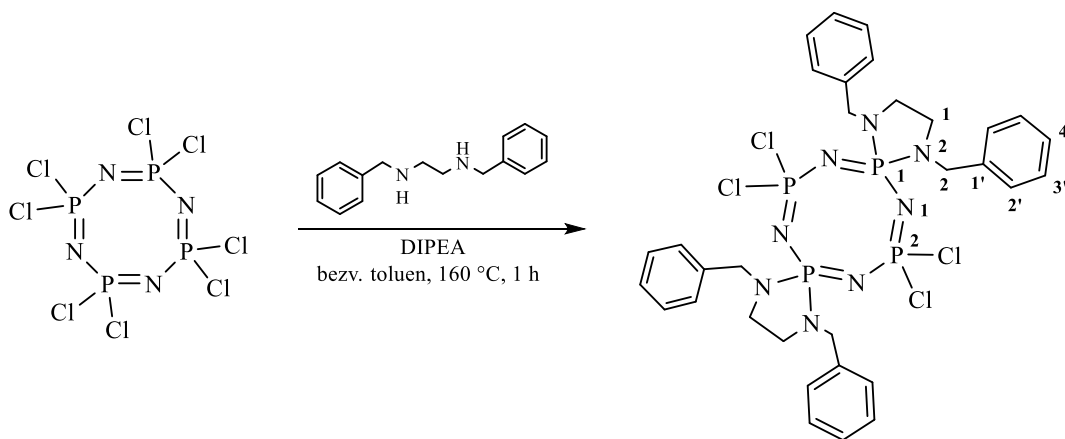


Schéma 2: Příprava látky 6 a její označení čísly pro přiřazení signálů NMR spekter

K tomuto derivátu se ukázaly být úspěšné dvě různé syntetické cesty.

V prvním případě byl k oktachlorocyklotetrafosfazenu (tetramer) (0,2 g, 1 ekv., 0,431 mmol) přidán nejprve benzatin (0,4 ml, 4 ekv., 1,70 mmol) a poté DIPEA (0,61 ml, 8 ekv., 3,44 mmol). Směs byla míchána při 160 °C přes noc. Výsledkem byla zkumavka se žlutým roztokem (obvykle bývá obsah zkumavky čistě bílý). Vzorek reakce byl podroben <sup>31</sup>P a <sup>1</sup>H NMR monitoringu. Spektra ukázala přebytek dispirotetrameru.

Filtrací byla oddělena bílá sraženina a žlutý filtrát. Odpařením na RVO byl získán žlutý pevný odparek. Pevná látka byla za horka rozpuštěna v toluenu a dána do chladničky na noc ke krystalizaci. Druhý den byla baňka přesunuta do dalšího dne do mrazničky.

Vzniklé krystaly byly promyty acetonitrilem. Výsledný bílý prášek, kterým byl dispirotetramer **6**, byl dosušen ve pod vakuem.

Druhou úspěšnou variantou byla sice stejná kombinace reaktantů: tetrameru s DIPEA a benzatinem, avšak ve výhodnějším poměru. Významným rozdílem oproti předchozímu experimentu bylo, že k tetrameru (0,2 g; 1 ekv.; 0,431 mmol) byl nejprve přidán nadbytek DIPEA (0,8 ml, 11 ekv., 4,59 mmol) a až poté benzatin (0,2 ml, 2 ekv., 0,849 mmol). Směs byla zahřívána na 160 °C po dobu 1 h. Stav reakce byl zkontrolován pomocí <sup>31</sup>P a <sup>1</sup>H NMR spektroskopie. Výsledná směs byla přefiltrována přes filtrační papír do kulaté baňky. Filtrátem byla žlutá kapalina. Po odpaření filtrátu na RVO byl získaný žlutý pevný odparek rozpuštěn za horka v toluenu a směs byla přes noc ponechána v chladničce.

Krystalická látka byla promyta acetonitrilem. Produkt byl získán ve formě lehce žlutého prášku. Prášek byl dosušen.

Druhým experimentem se podařilo získat produkt o vyšší čistotě. Touto cestou bylo získáno 57,4 mg látky, což odpovídá výtěžku 17 %.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>):**  $\delta$  = 7,41–7,35 (m, 8H, H2'), 7,29–7,21 (m, 8H, H3'), 7,21–7,14 (m, 4H, H4'), 4,12 (d, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 7,6 Hz, 8H, H2) 2,93 (d, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 11,0 Hz, 8H, H1)

**<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>):**  $\delta$  = 5,2 (t, <sup>2</sup>J<sub>PP</sub> = 25,3 Hz, P1); –8,6 (t, <sup>2</sup>J<sub>PP</sub> = 25,4 Hz, P2)

**<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (125 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>):**  $\delta$  = 138,61–138,50 (d, J<sub>PC</sub> = 8,68 Hz, C1'); 128,15–128,99 (m, C2' + C3'); 127,97 (s, C4'); 50,23 (d, J<sub>PC</sub> = 4,69 Hz, C2); 45,28 (d, J<sub>PC</sub> = 13,87 Hz, C1)

**<sup>15</sup>N NMR (36 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO):**  $\delta$  = 50,38 (N2); 118,85 (N1)

**Teplota tání:** 169,5 °C

**MS (+)** 797,0836 [M + H]<sup>+</sup> (teoretická hodnota: 797,0840)

### 3.2.4 Příprava látky 8 – perspirotetramer

(1,4,8,11,14,17,20,23-octabenzyl-1,4,6,8,11,12,14,17,18,20,23,24-dodecaaza-515,715,1315,1915-tetraphosphatetraspiro[4.1.47.1.413.1.419.15]tetracosa-5(24),6,12,18-tetraene)

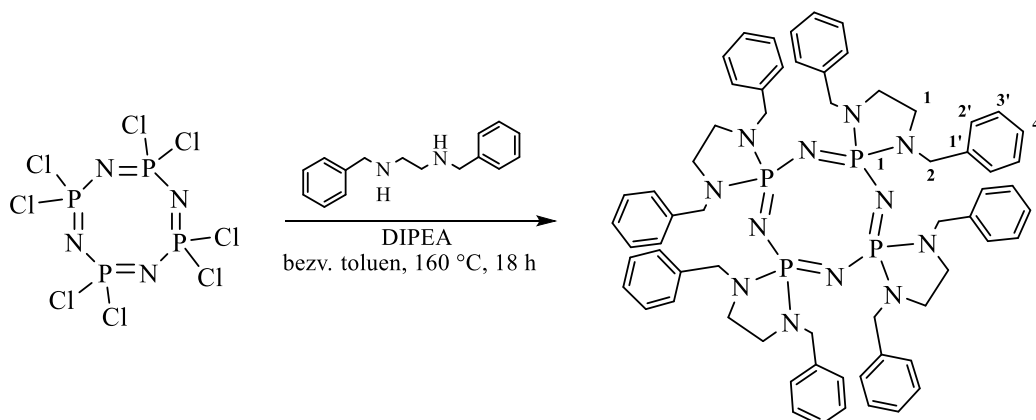


Schéma 3: Příprava látky 8 a její označení čísly pro přiřazení signálů NMR spekter

Tetramer (0,2 g; 1 ekv.; 0,431 mmol) byl za míchání rozpuštěn v suchém toluenu a po rozpuštění byl přidán benzatin (0,8 ml; 8 ekv.; 3,45 mmol). V případě této reakce byl benzatin přidán v nadbytku a sám působil jako báze neutralizující vznikající HCl. Směs byla přes noc zahřívána na 160 °C. Tato doba stačila na reakci veškerého benzatinu a k převodu fosfazenu na perspirocyclický derivát (kontrolováno  $^{31}\text{P}$  a  $^1\text{H}$  NMR). Vzniklá směs byla filtrována, získána byla bílá sraženina a žlutý filtrát. Kapalná fáze byla odpařena na RVO. Žlutý olej, kterým byl odparek, byl za horka rozpuštěn v toluenu a přesycený roztok byl takto umístěn do lednice. Následující den byly pozorovány krystaly.

Promytím acetonitrilem byl získán produkt v podobě bílého prášku. Posledním krokem bylo dosušení pod vakuem.

Bylo získáno 48 mg látky, což odpovídá výtěžku 9,8 %.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>):  $\delta$  = 7,29–7,23 (m, 16H, *H*2'); 7,15–7,03 (m, 24H, *H*3' + *H*4'); 4,13–4,07 (m, 16H, *H*2); 2,93–2,85 (m, 16H, *H*1)

$^{31}\text{P}$  { $^1\text{H}$ } NMR (162 MHz, THF-*d*<sub>8</sub>):  $\delta$  = 12,41 (s, 4P, *P*1)

$^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } NMR (Hz, THF-*d*<sub>8</sub>):  $\delta$  = 140,52–140,36 (m, *C*1'); 128,73 (s, *C*2'); 128,69 (s, *C*3'); 127,16 (s, *C*4'), 51,45 (s, *C*2); 46,04–45,81 (m, *C*1)

Teplota tání: 133,7 °C

MS (ESI): (+) 1133,5023 [*M* + *H*]<sup>+</sup> (teoretická hodnota: 1133,5026)

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Optimalizace syntetických postupů

První experimenty byly prováděny v suchém THF ve Schlenkových baňkách v inertní atmosféře argonu, přičemž jako báze byl použit triethylamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ;  $pK_A = 10,78$  [51]), analogicky k dříve popsaným přípravám stejných typů sloučenin. [45] [46] [48] Bohužel tento přístup, který dle autorů generoval 45 až 88% výtěžky čistých sloučenin s použitím chromatografických separací, nejen že neposkytoval výtěžky podobné, ale často nebyly kýžené sloučeniny v reakčních směsích vůbec přítomné, tudíž lze deklarovat, že je za podmínek na PŘF UK nerealizovatelný. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k intenzivnímu průzkumu těchto reakcí s pomocí jiných bází a modifikovaných technik.

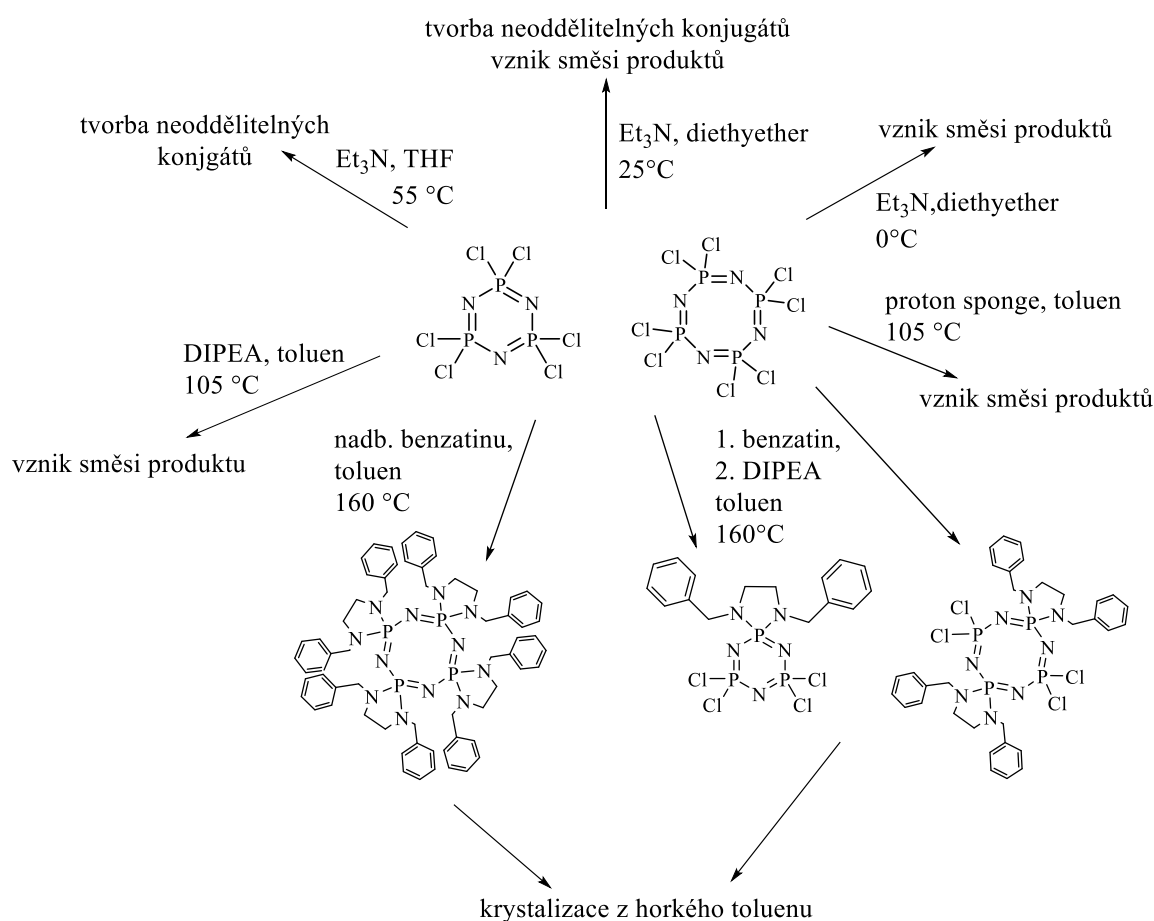


Schéma 4: Metody přípravy derivátů vyzkoušené v rámci projektu

Reakce fosfazenů s benzatinem ( $pK_A = 8,95$  [52]) probíhaly celkově velmi ochotně. Určité komplikace se však objevovaly při přípravě nesymetrických derivátů, konkrétně monospirocyclického a trispirocyclického tetrameru, které měly tendenci rychle přecházet na stabilnější produkty. Další obtíže byly zaznamenány při syntéze perspirotrimeru, kde bylo

složité dosáhnout úplné substituce na malém kruhu trimerní jednotky. Reakce proto probíhala velmi pomalu, a to i za zvýšených teplot (až 160 °C) a v přítomnosti nadbytku benzatinu.

K dalším komplikacím přispívalo vysoké  $pK_A$  benzatinu, díky čemuž benzatin často fungoval také jako báze neutralizující HCl vznikající při substituci chloru aminem. V důsledku toho bylo v průběhu reakce často nutné přidávat další ekvivalenty benzatinu, přičemž i tak nebylo vždy dosaženo požadované konverze.

Nejproblematictější částí celé syntézy bylo čištění produktů. Reakce byly vždy doprovázeny tvorbou částečně rozpustných solí (hydrochlorid vzniklý neutralizací HCl příslušnou bází), a navíc bylo obtížné separovat jednotlivé deriváty vzhledem k jejich podobné polaritě. Vznikající triethylammonium hydrochlorid tvořil s fosfazenovými deriváty stabilní konjugáty, které nebylo možné odstranit extrakcí různými rozpouštědly, krystalizací ani klasickými chromatografickými metodami, což je v rozporu s literaturou. [45] [46] [48]

Další pokusy se zaměřily na změnu rozpouštědla. Suchý diethylether byl použit s cílem snížit rozpustnost vznikající soli triethylaminu, a tím minimalizovat tvorbu konjugátů. Tato varianta problém částečně zmírnila, ale úplně jej nevyřešila — konjugáty vznikaly nadále, byť v menší míře. Nevýhodou použití etheru byla také velmi vysoká rychlost reakce vedoucí k bohatším směsím produktů. Ani chlazení reakce na 0 °C tento problém nevyřešilo.

Další strategie zahrnovala použití diisopropylethylaminu (DIPEA;  $pK_A = 10,98$  [53]) v kombinaci s toluenem jako rozpouštědlem. Cílem bylo opět zabránit rozpouštění vznikajících solí a usnadnit jejich odstranění prostou filtrací. Tato kombinace byla využita při pokusech o syntézu perspirotetrameru. Ani v tomto případě však nebyla reakce dostatečně účinná — DIPEA nebyl dostatečně silnou bází, aby zcela zabránil reakci benzatinu s HCl. Přidávání dalších ekvivalentů benzatinu také nepomohlo a po opakovaném přerušování reakcí za účelem kontroly konverze se reakce zcela zastavila. Ani následné přidání silnější báze, tzv. *proton sponge* ( $pK_A = 12,1$ ), již nedokázalo reakci obnovit.

Další experimenty, při kterých byl *proton sponge* přítomen od počátku reakce, rovněž nevedly k výraznému zlepšení, neboť ani tato báze nebyla dostatečně silná, aby zabránila neutralizaci HCl benzatinem.

Zásadním zjištěním se ukázalo být změněné pořadí přidávání reaktantů: nejprve byla do reakční směsi přidána báze (v tomto případě DIPEA) a teprve poté benzatin. Tento postup měl výrazný vliv na průběh reakce, což bylo patrné i vizuálně. Pokud byl přidán benzatin jako první, okamžitě vznikala bílá sraženina (*N,N'*-dibenzylethylammonium hydrochlorid). Při opačném pořadí přidávku docházelo ke vzniku sraženiny až později, což vedlo k vyšším výtěžkům reakcí a vyšší čistotě požadovaných produktů.

Většina reakcí byla prováděna v inertní atmosféře kvůli hydrolytické citlivosti částečně chlorovaných fosfazenů. V závěrečných experimentech však byly některé reakce realizovány za běžné atmosféry v tlakových zkumavkách, aby mohly být reakce prováděny při vyšších teplotách. Ani v těchto případech nebyla pozorována degradace produktů.

Jak již bylo zmíněno, významné komplikace přetrvávaly při čištění produktů. V případě tří získaných derivátů byla úspěšně využita krystalizace z horkého toluenu s následným ochlazením v chladničce. Při přípravě dispirotrimeru a monospirotetrameru však tato metoda nebyla úspěšná. Pro olejovité produkty, kterými byly zmíněné deriváty, byla zkoušena krystalizace prudkým zchlazením v kapalném dusíku a rovněž pokusy o krystalizaci z benzenu, avšak bez výraznějšího úspěchu.

K promývání produktů za účelem odstranění zbytkového diisopropylethylammonium hydrochloridu byl použit acetonitril.  $^{31}\text{P}$  NMR analýza filtrátu však odhalila přítomnost signálů fosfazenových derivátů, což naznačuje, že acetonitril částečně rozpouští také fosfazenové produkty a mohl tak negativně ovlivnit výsledné výtěžky. Za povšimnutí stojí, že autoři předešlých studií tyto a obdobné sloučeniny z acetonitrilu krystalizují. [45]

Ačkoliv se může zdát, že jsou výtěžky reakcí uváděné v této práci malé, není tomu tak, protože se jedná o výtěžky izolovaného monokrystalického materiálu, a ne výtěžky reakcí, které se dle NMR studií blížily kvantitativním konverzím čistých látek.

## 4.2 Charakterizace látek

### 4.2.1 Teplota tání

Ostré teploty prokazují, že látky byly izolovány bez příměsí.

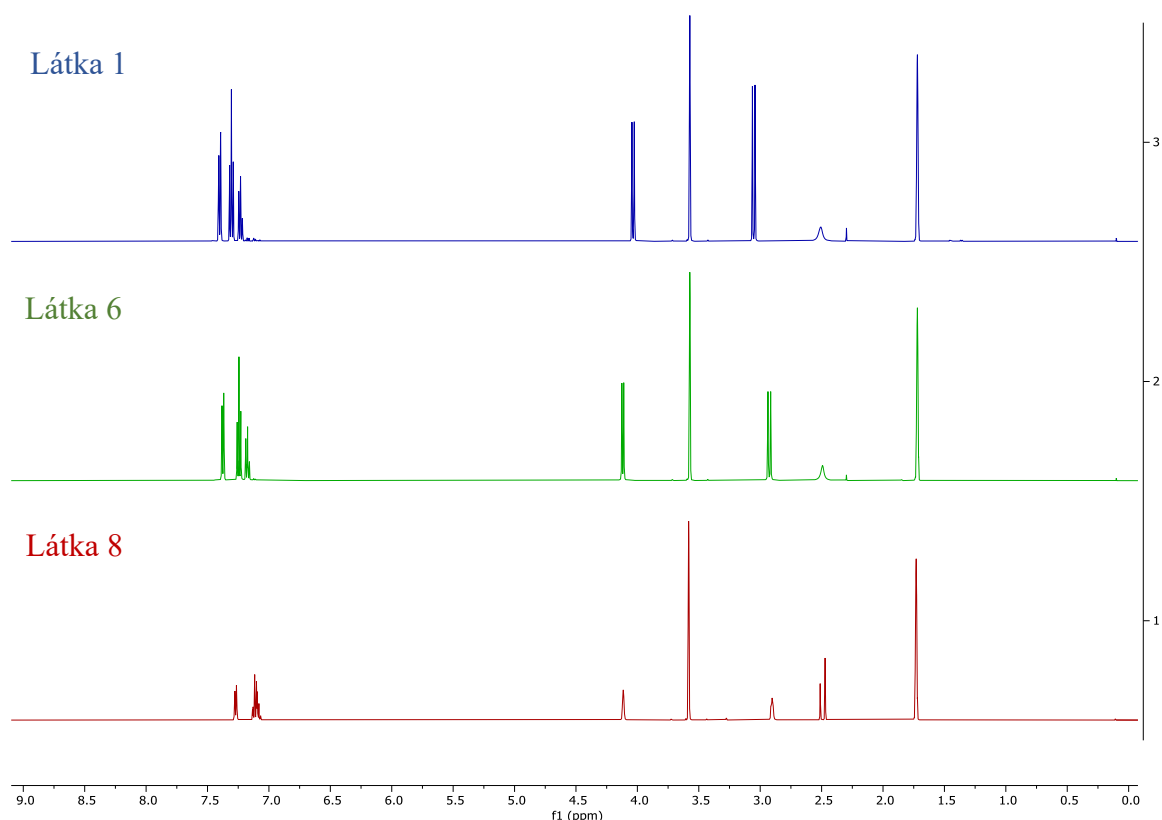
Nejnižší teplota tání byla zjištěna pro perspirotetramer (133,7 °C). S rostoucím počtem atomů chloru v molekule se zvyšovala také tepelná stabilita krystalické fáze. Monospirotrimer roztál při 145 °C, dispirotetramer při 169,5 °C.

Body tání derivátů trimeru [47] i tetrameru [45] souhlasí s literaturou.

### 4.2.2 NMR spektroskopie

$^1\text{H}$  spektra (*Obr. 21*) získaných molekul (*Obr. 18, 19, 20*) nevykazovala významné rozdíly v posunech signálů. Bylo však pozorováno odlišné štěpení signálů pro benzylové a ethylenové atomy vodíků (ve strukturách označeny *H1* a *H2*). Jelikož byl ve všech případech aplikován  $\{^1\text{H}\}$  decoupling, je zřejmé, že k tvorbě multipletů docházelo buď vlivem endocyklických atomů fosforu, z důvodu různých chemických i magnetických okolí daných atomů fosforu

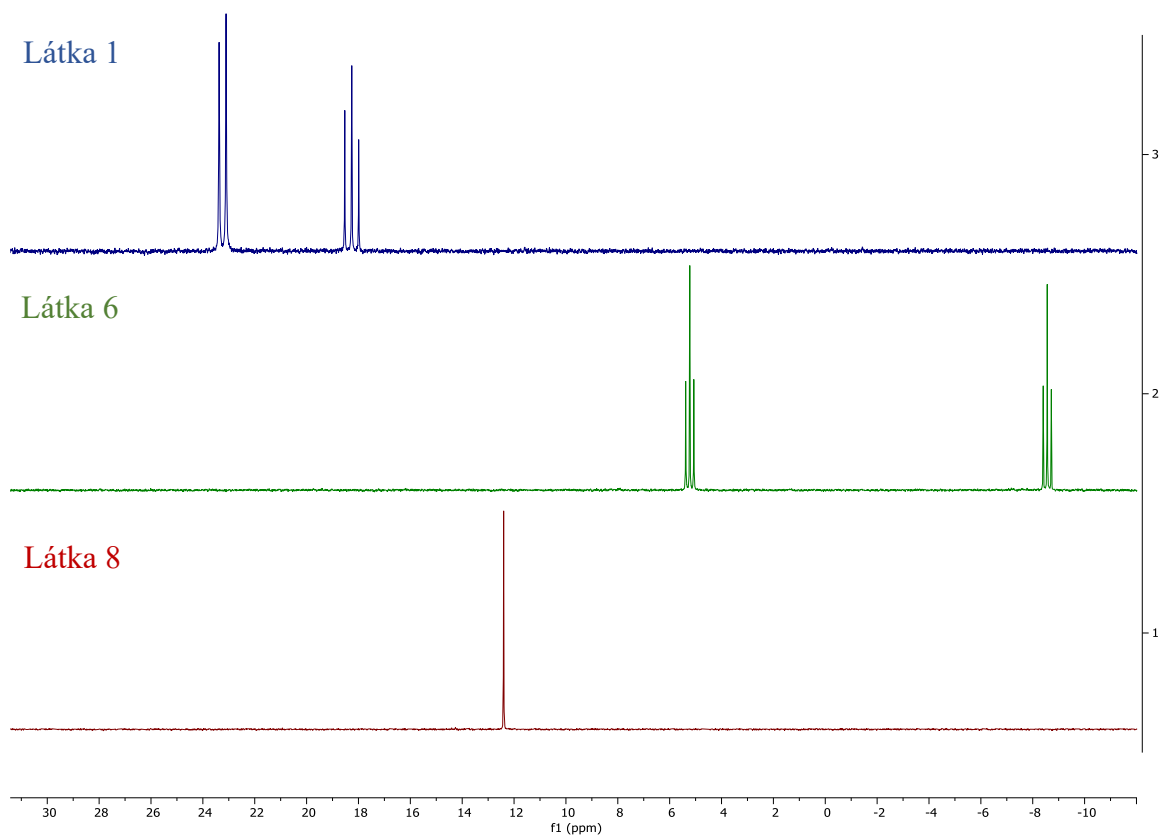
v případě monospirotrimeru a dispirotetrameru oproti perspirotetrameru. Dalším alternativním vysvětlením je tvorba různých konformérů, kde tyto vodíky nemají shodné okolí.



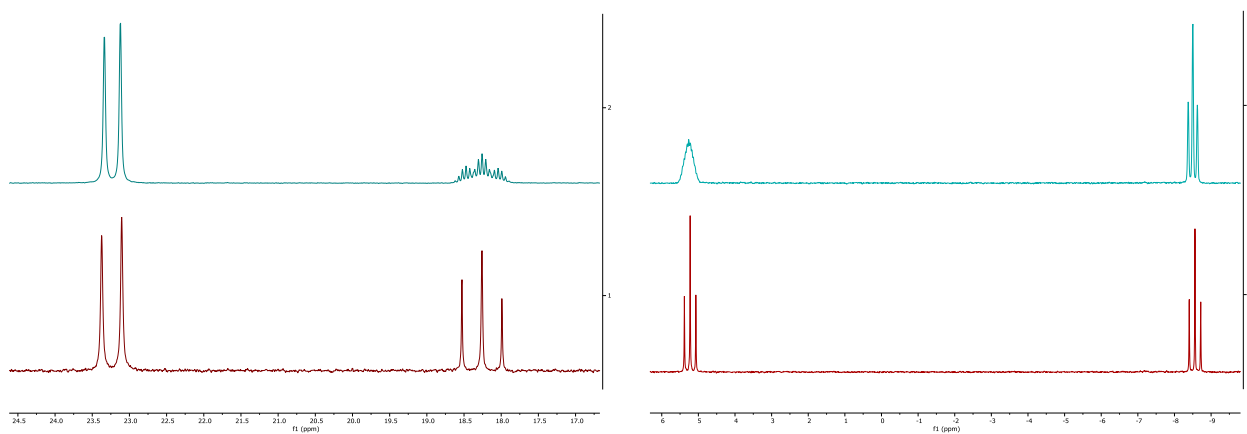
*Obr. 21:* Porovnání  $^1\text{H}$  spekter látek **1**, **6** a **8** ( $\delta = 3,56/1,71$  – signál zbytkového THF; 2,46 – signál zbytkové  $\text{H}_2\text{O}$ ; 2,29 – signál zbytkového toluenu; 1,92 – signál zbytkového acetonitrilu)

$^{31}\text{P}$  spektra (*Obr. 22*) se liší množstvím, multiplicitou a také posuny signálů. Trimer s jedním substituovaným atomem fosforu, a tedy dvěma ekvivalentními jádry, je ve spektru pozorovatelný jako dublet a triplet. Tetramer se dvěma substituovanými jádry fosforu se projevuje jako dva triplety. Tetramer se čtyřmi ekvivalentními jádry se projevuje jako singlet. Chemické posuny  $^{31}\text{P}$  dispirotetrameru mají nižší hodnoty než analogický parametr monospirotrimeru z důvodu většího stínění těchto jader negativními atomy. Ve sloučenině **8** rezonují všechna jádra fosforu s chemickým posunem skoro uprostřed škály limitované **1** a **6**.

S přesným přiřazením signálů atomům u látek **1** a **6** pomohla  $^{31}\text{P}$  spektra bez aplikovaného  $\{^1\text{H}\}$  decouplingu (*Obr. 23*).



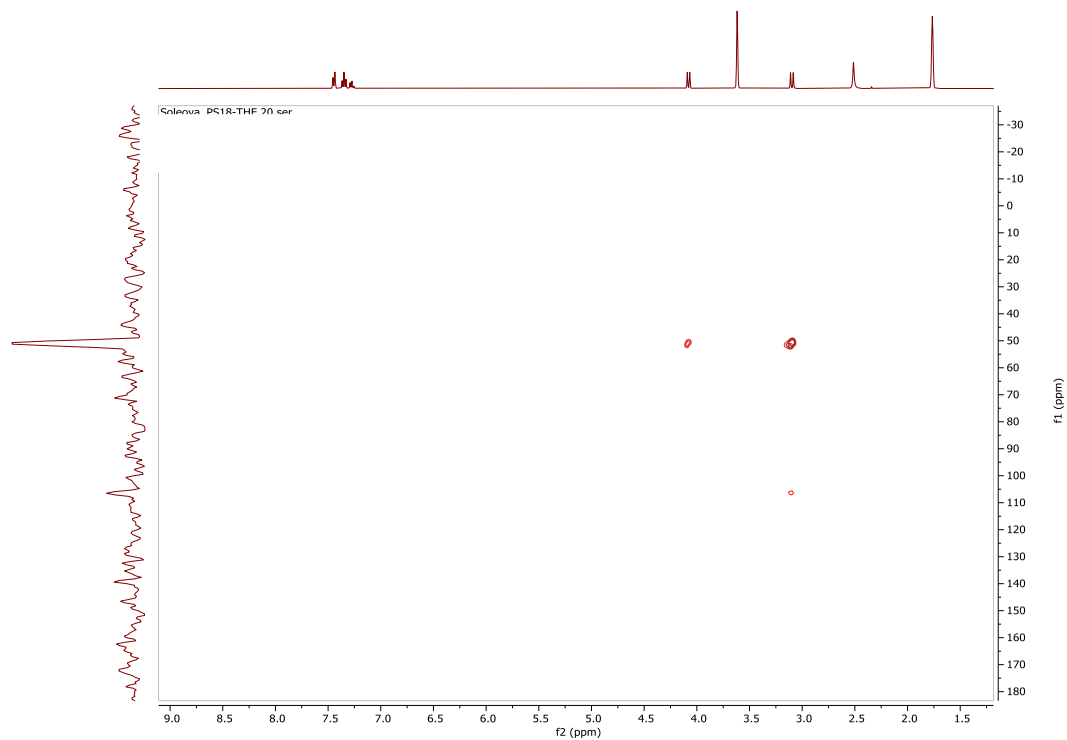
Obr. 22: Porovnání  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR spekter látek **1**, **6** a **8**



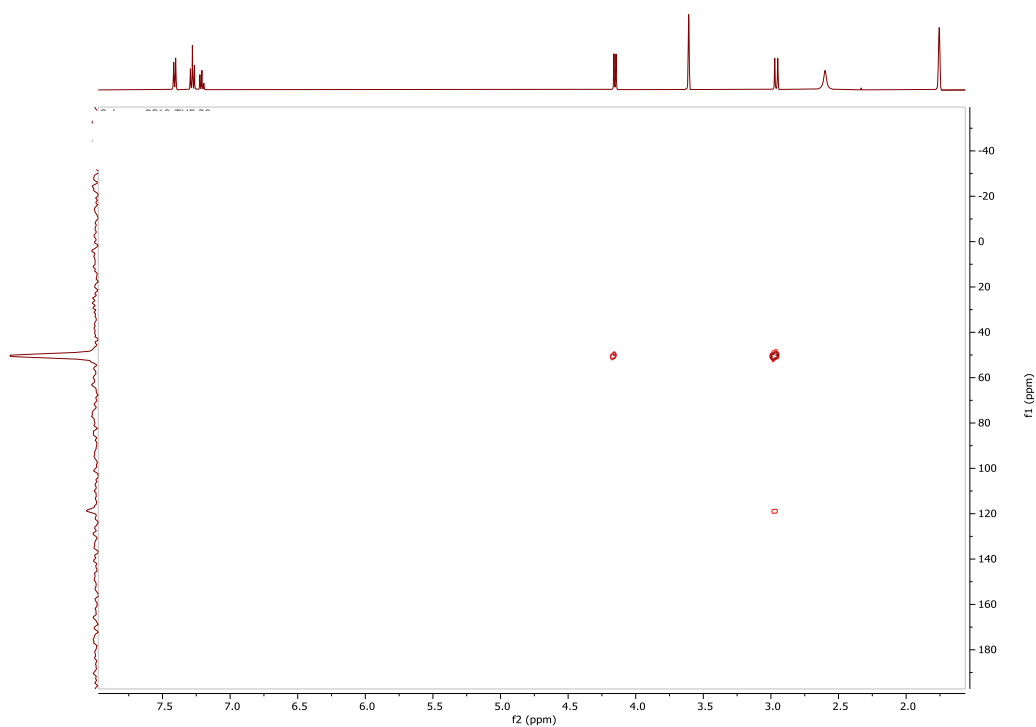
Obr. 23:  $^{31}\text{P}$  a  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  (nahore a dole) spektra látek **1** (vlevo) a **6** (vpravo)

Charakterizační data získána detekcí  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  spektroskopie látky **1** [47] a látky **6** [45] jsou v souladu s literaturou.

Pro látky **1** a **6** byly také získány hodnoty chemických posunů z  $^{15}\text{N}$  NMR spekter (**Obr. 23, 24**). Jelikož má  $^{15}\text{N}$  izotop jen malé přirozené zastoupení, bylo možné tyto posuny získat jen nepřímo, a to s využitím  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HMBC korelace přes tři vazby. Touto metodou mohly být ve spektru pozorovány signály nejen aminových, ale také endocyklických atomů dusíku.



Obr. 24:  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HMBC spektrum látky **1**



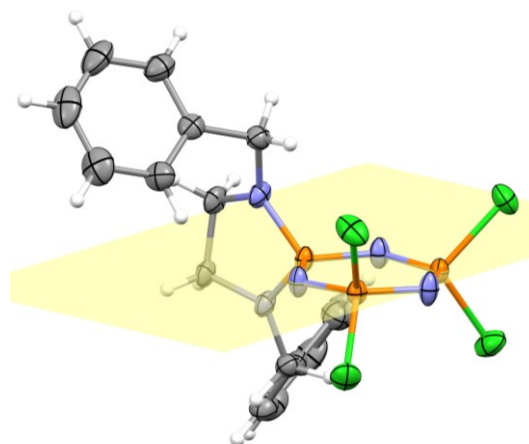
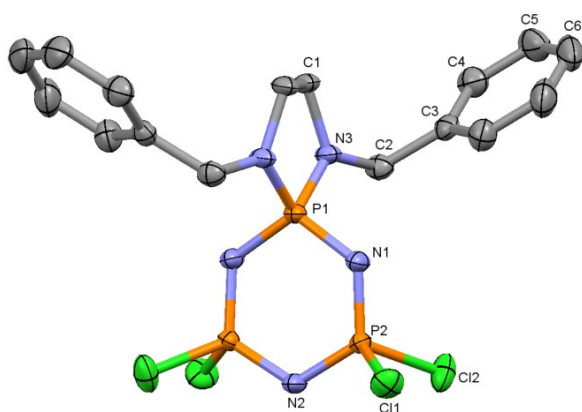
Obr. 25:  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HMBC spektrum látky **6**

V molekule monospirotrimeru **1** jsou korelací ovlivněné vždy jen dva nejbližší endocyklické dusíky a dva dusíky aminu. Intenzity signálů v **1** jsou nižší než v molekule dispirotetrameru, mimo jiné také proto, že jsou ovlivněné všechny čtyři benzatinové dusíky a všechny endocyklické atomy dusíku sousedící se substituovaným jádrem fosforu.

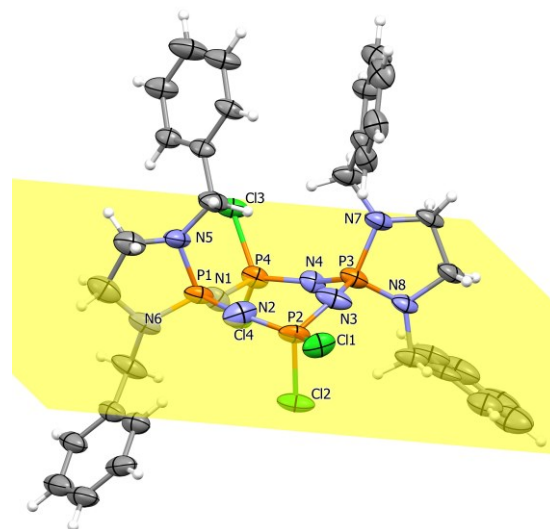
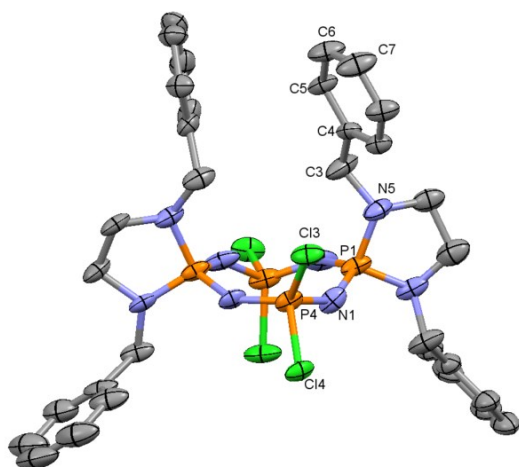
Rozdílná intenzita signálů mezi atomy dusíku v rámci jedné molekuly vyplývá ze vzdáleností jader od atomů vodíku. Data pro látku **1** jsou v souladu s literaturou [54]. V látce **6** vykazují jádra endocyklických dusíků chemický posun vyšší z důvodu nižšího stínění a rozdílného tvaru cyklu, chemického okolí a hybridizace.

### 4.2.3 Rentgenostrukturní analýza

Pro tři z připravených sloučenin se podařilo vypěstovat monokrystalický materiál vhodný k určení jejich struktury pomocí rentgenostrukturní analýzy. Sloučenina **1** spadá svojí strukturou mezi typické představitele trifosfazenových struktur se substitucí dvou atomů chloru dvěma atomy dusíku na jednom fosforu (**Obr. 26**). [55] [56] Typickou vlastností je kromě pseudotetraedrického uspořádání na všech atomech fosforu ještě fakt, že meziatomové vzdálenosti P-N uvnitř kruhu se liší v závislosti na povaze dalších substituentů fosforu. Jestliže je fosfor substituován dvěma atomy chloru, jsou vazby obou dusíků k tomuto atomu zkráceny nejen oproti jednoduché vazbě (součet kovalentních poloměrů PN: 1,82 Å jednoduchá a 1,62 Å dvojná), [57] ale i vazbě dvojná. Díky vzdálenostem mezi P1 a N1 atomy lze tyto vazby charakterizovat jako typicky dvojná. Překvapivě dochází nejen ke zkrácení vazeb PN kruhu, ale i vazeb s terminálními dusíky (P1-N3) a chlory (**Obr. 26** titulek,  $\Sigma(\text{PCI})_{\text{kov.}}$  2,1 Å). Ve sloučenině **1** je celý trifosfazenový kruh téměř v planárním uspořádání, což je v prudkém rozporu s dalšími určenými strukturami s vyšší substitucí.

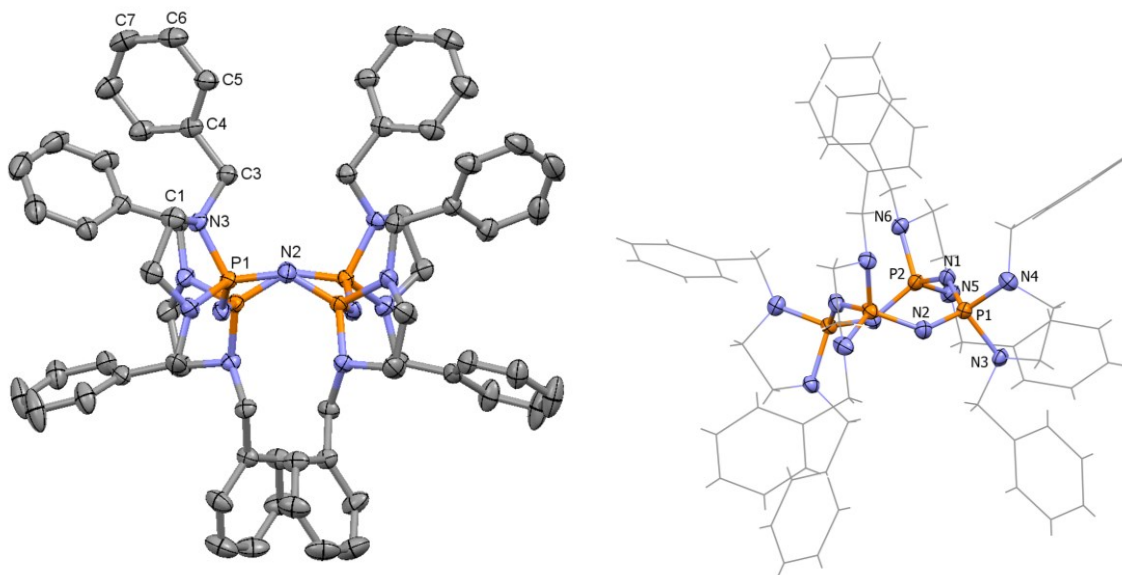


Obr. 26: Molekulová struktura **1** (vodíkové atomy nejsou pro větší přehlednost zobrazeny). Vybrané meziatomové vzdálenosti a úhly [Å, °]: N1 P2 1.5591(15), N1 P1 1.6130(15), N2 P2 1.5830(11), N3 P1 1.6288(15), Cl1 P2 1.9973(6), Cl2 P2 2.0064(6), N1 P1 N1<sup>i</sup> 112.32(11), N3 P1 N3<sup>i</sup> 94.79(11), N1 P2 N2 119.51(9). *i* = -*x*, *y*, -*z*.



Obr. 27: Molekulová struktura **6** (vodíkové atomy a minoritní disorderovaná část molekuly nejsou pro větší přehlednost zobrazeny). Vybrané meziatomové vzdálenosti a úhly [Å, °]: Cl3 P4 2.025(3), Cl1 P2 2.007(3), P1 N1 1.578(8), P1 N2 1.584(8), P1 N6 1.629(8), P1 N5 1.645(8), P2 N3 1.537(12), P2 N2 1.541(10), P2 Cl2 1.977(4), P3 N3 1.581(11), P3 N4 1.598(14), P3 N8 1.600(15), P3 N7 1.666(10), P4 N4 1.538(16), P4 N1 1.539(8), P4 Cl4 2.047(8),

Struktura **6** kopíruje strukturu **1** v zásadních geometrických parametrech okolí atomů, avšak na rozdíl od ní je osmičlenný kruh neplanární s atomem P3 vyčnívajícím nad rovinu definovanou atomy P1, P2 a P4. Atomy dusíků se také nacházejí většinou nad touto rovinou. Tato odchylka je způsobena přílišnou sterickou náročností benzatinových substituentů. V případě již popsaných struktur [58] [59] [60] s menšími substituenty tyto buď vykazují planární uspořádání všech atomů kruhu nebo alespoň všech atomů fosforu.



Obr. 28: Molekulová struktura **8** (vodíkové atomy a solvatující molekula toluenu nejsou pro větší přehlednost zobrazeny). Vybrané meziatomové vzdálenosti a úhly [Å, °]: P1 N1 1.576(3), P1 N2 1.592(3), P1 N4 1.660(3), P1 N3 1.681(3), P2 N2<sup>i</sup> 1.579(3), P2 N1 1.584(3), P2 N5 1.665(3), P2 N6 1.685(3), N1 P1 N2 116.75(14), N2 P2 N1 116.68(15).  $i = 1/2-x, y, 1/2-z$ .

Molekulová struktura sloučeniny **8** má díky obrovské sterické náročnosti čtyř spirocyklických substituentů vaničkové uspořádání kruhu s jedním z fosforových atomů pod rovinou ostatních. Vzdálenosti sousedních atomů P a N uvnitř kruhu jsou téměř identické a odpovídají velice krátkým dvojným vazbám, které jsou srovnatelné s nejkratšími vazbami v **1** a **6**. Naopak vazby exocyklických P–N jsou prodloužené. Také příslušné úhly N–P–N jsou ve srovnání s předchozími sloučeninami tupější. Vzhledem k tomu, že **8** je prvním tetraspirocyclickým tetramerem, nelze jeho strukturální parametry účinně srovnat s literaturou, jen se sloučeninami, které mají atomy fosforu plně substituované atomy dusíku. [61] [62] Tyto sloučeniny mají struktury s alternujícími atomy dusíku nad a pod rovinou tvořenou atomy fosforu a vzdálenosti atomů P–N v kruhu jsou o cca 0,1 Å delší než v **8**.

#### 4.2.4 Absorpční a emisní spektroskopie

U připravených derivátů byla pozorována předpokládaná absorpční UV-Vis spektra, jejichž základní charakteristiky jsou uvedeny v Experimentální části.

Nesubstituované cyklické polyfosfazeny samy o sobě fluorescenci nevykazují. [18] Fluorescenční vlastnosti byly naopak pozorovány u spirocyklických derivátů fosfazenů, v nichž při tvorbě spirosloučeniny dochází ke vzniku rigidního aromatického systému. V případě substituce benzatinem však k vytvoření konjugovaného systému nedochází.

#### 4.2.5 Biologická aktivita

Vzorky byly podrobeny biologickému testování. Všechny látky byly označeny za netoxické.

Neúplně substituované látky **1** a **6** však v průběhu experimentu prováděném v DMSO podlely hydrolyze, měření tedy není zcela vypovídající. Důležitým závěrem však je, že částice vzniklé při hydrolyze nejsou toxické. Pokud by tedy molekuly byly využívány jako základ materiálů pro cílené podávání léčiv, jejich prvotní metabolity by neměly být zdraví nebezpečné. Tato skutečnost bude předmětem dalších experimentů.

Tabulka 2: Výsledné hodnoty testů na cytotoxicitu látek **1**, **6** a **8**

|          | 10 $\mu$ M látky |    |           |    |           |    |           |    |           |    |
|----------|------------------|----|-----------|----|-----------|----|-----------|----|-----------|----|
|          | CEM              |    | HL60      |    | HeLa      |    | HepG2     |    | NHDF      |    |
|          | %kontroly        | sd | %kontroly | sd | %kontroly | sd | %kontroly | sd | %kontroly | sd |
| <b>1</b> | 100              | 5  | 94        | 10 | 101       | 7  | 89        | 3  | 96        | 7  |
| <b>6</b> | 108              | 5  | 80        | 3  | 110       | 4  | 96        | 4  | 95        | 2  |
| <b>8</b> | 105              | 2  | 97        | 17 | 98        | 2  | 90        | 4  | 100       | 9  |

*směrodatná odchylka*

## 5 Závěr

V této bakalářské práci byly studovány různé varianty syntézy spirocyklických derivátů cyklických fosfazenů prostřednictvím nukleofilní substituce atomů chloru *N,N'*-dibenzylethylendiaminem.

Vzhledem k hydrolytické citlivosti fosfazenů byly reakce zpočátku prováděny v inertní atmosféře. Později se však ukázalo, že i částečně substituované deriváty vykazují dobrou stabilitu na vzduchu a jsou odolné také vůči použití nesusušených rozpouštědel.

Byly izolovány tři substituované fosfazeny – monospirocyklický derivát hexachlorocyklotrifosfazenu a dispirocyklický a perspirocyklický derivát octachlorocyklotetrafosfazenu. Izolace dalších derivátů byla ztížena komplikovanou purifikací od solí vznikajících neutralizací přítomných bází, ale také jiných derivátů přítomných ve směsi. V případě nesymetrických derivátů tetrameru docházelo ke spontánní konverzi na termodynamicky stabilnější symetrické produkty. U olejových produktů nebyla nalezena vhodná metoda krystalizace, kdy většina z těchto poznatků je v rozporu s literaturou.

K čištění produktů od zbytkových solí se jako nejúčinnější ukázalo promývání acetonitrilem, které však vedlo k významným ztrátám na výtěžku. Voda se jevila jako další potenciálně vhodné rozpouštědlo, její použití však bylo problematické vzhledem k citlivosti částečně substituovaných derivátů vůči hydrolyze.

Pro budoucí výzkum by bylo vhodné zaměřit se na nalezení vhodnějšího rozpouštědla pro purifikaci, které by minimalizovalo ztráty produktů. Rovněž by stálo za to prozkoumat možnost syntézy derivátů s využitím nadbytku benzatinu bez nutnosti použití další báze. Zajímavým tématem by byla i optimalizace krystalizačních podmínek pro separaci dalších derivátů, neboť krystalizace představuje velmi efektivní a selektivní metodu čištění.

Získané látky byly charakterizovány pomocí NMR spektroskopie ( $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$ ), HRMS a absorpční a emisní spektrometrií. Také byly podrobeny testům na cytotoxicitu, přičemž všechny vzorky vykázaly netoxický charakter. Je však třeba poznamenat, že NMR analýza odhalila hydrolyzu částečně substituovaných derivátů, na rozdíl od vody, při jejich rozpouštění v DMSO. Toto rozpouštědlo je využíváno při biologických testech, a tedy lze za netoxické považovat spíše produkty hydrolyzy připravených látek. I tento poznatek je však důležitý – ukazuje, že případné metabolity obdobných látek by při využití v cílené terapii nemusely představovat zdravotní riziko.

## Použitá literatura

- [1] Sanderson, T. R. *Properties and Reaction*. <https://www.britannica.com/science/nitrogen/Properties-and-reaction> (accessed 2025-02-23).
- [2] Earnshaw, A.; Greenwood, N. N. *Chemistry of the Elements (2nd Edition)*; Butterworth-Heinemann, 1997; pp 406-412, 473-483
- [3] Corbridge, D. E. C. *Phosphorus: Chemistry, Biochemistry and Technology*; CRC Press, 2013.
- [4] De Jaeger, R.; Gleria, M. Poly(Organophosphazene)s and Related Compounds: Synthesis, Properties and Applications. *Progress in Polymer Science* **1998**, *23* (2), 179–276. DOI:10.1016/s0079-6700(97)00027-0.
- [5] Sharma, K. *Phosphonitrilic compounds (Phosphazene)- Classification, Properties, Uses*. Science Info. <https://scienceinfo.com/phosphonitrilic-compounds-phosphazene-classification-properties-uses/> (accessed 2024-12-22)
- [6] Ahmad, M.; Nawaz, T.; Hussain, I.; Chen, X.; Imran, M.; Hussain, R.; Assiri, M. A.; Ali, S.; Wu, Z. Phosphazene Cyclomatrix Network-Based Polymer: Chemistry, Synthesis, and Applications. *ACS Omega* **2022**, *7* (33), 28694–28707. DOI:10.1021/acsomega.2c01573.
- [7] Hibbert, F. Temperature-Jump Study of Proton Transfer from Protonated 1,8-Bis-(Dialkylamino)Naphthalenes to Hydroxide Ion in Water and Aqueous Dioxan. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1974**, No. 15, 1862. DOI:10.1039/p29740001862.
- [8] Chandrasekhar, V.; Thomas, K. R. Structures and Biological Effects. *Structure and Bonding* **1993**. DOI:10.1007/bfb0036815.
- [9] Casella, G.; Carlotto, S.; Lanero, F.; Mozzon, M.; Sgarbossa, P.; Bertani, R. Cyclo- and Polyphosphazenes for Biomedical Applications. *Molecules* **2022**, *27* (23), 8117. DOI:10.3390/molecules27238117.
- [10] Allcock, H. R. *Phosphorus-Nitrogen Compounds*; Academic Press, 1972; pp 4
- [11] Stevenson, A. C. Ammonolysis. *Industrial & Engineering Chemistry* **1948**, *40* (9), 1584–1589. DOI:10.1021/ie50465a006.
- [12] Shaw, R. A.; Fitzsimmons, B. W.; Smith, B. C. The Phosphazenes (Phosphonitrilic Compounds). *Chemical Reviews* **1962**, *62* (3), 247–281. DOI:10.1021/cr60217a004.
- [13] Allcock, H. R. Chapter 7. Phosphazene High Polymers. *Polymer Chemistry Series* **2014**, 125–150. DOI:10.1039/9781782624523-00125.
- [14] Wan, C.; Huang, X. Cyclomatrix Polyphosphazenes Frameworks (Cyclo-Pops) and the Related Nanomaterials: Synthesis, Assembly and Functionalisation. *Materials Today Communications* **2017**, *11*, 38–60. DOI:10.1016/j.mtcomm.2017.02.001.
- [15] Mu, X.; Zhan, J.; Liu, L.; Yao, Z.; Zhu, Y.; Yu, B.; Song, L. Highly Efficient Phosphazene-Derivative-Based Flame Retardant with Comprehensive and Enhanced Fire Safety and Mechanical Performance for Polycarbonate. *Materials* **2024**, *17* (13), 3206. DOI:10.3390/ma17133206.

- [16] Phosphazene Flame Retardant. <https://flame-retardant.alfa-chemistry.com/phosphazene-flame-retardant.html?opl=1> (accessed 2025-05-08).
- [17] Zhou, X.; Qiu, S.; Mu, X.; Zhou, M.; Cai, W.; Song, L.; Xing, W.; Hu, Y. Polyphosphazenes-Based Flame Retardants: A Review. *Composites Part B: Engineering* **2020**, *202*, 108397. DOI:10.1016/j.compositesb.2020.108397.
- [18] Uslu, A.; Tümay, S. O.; Yeşilot, S. Fluorescent Materials Based on Phosphazene Derivatives and Their Applications: Sensors and Optoelectronic Devices. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2022**, *53*, 100553. DOI:10.1016/j.jphotochemrev.2022.100553.
- [19] Beşli, S.; Durmuş, M.; İbişoğlu, H.; Kılıç, A.; Yuksel, F. Fluorescent Aminoarylcyclotetraphosphazenes. *Polyhedron* **2010**, *29* (13), 2609–2618. DOI:10.1016/j.poly.2010.06.010.
- [20] Ilayaperumal, P.; Chelladurai, P.; Vairan, K.; Anilkumar, P.; Balagurusamy, B. Polyphosphazenes—a Promising Candidate for Drug Delivery, Bioimaging, and Tissue Engineering: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering* **2023**, *308* (4). DOI:10.1002/mame.202200553.
- [21] Penicillin G Procaine Monograph for Professionals. <https://www.drugs.com/monograph/penicillin-g-procaine.html?references=1#r4> (accessed 2025-05-14).
- [22] Laurencin, C. T.; Ambrosio, A. M. A.; Sahota, J. S.; Runge, C.; Kurtz, S. M.; Lakshmi, S.; Allcock, H. R. Novel Polyphosphazene-Hydroxyapatite Composites as Biomaterials. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* **2003**, *22* (5), 18–26. DOI:10.1109/memb.2003.1256268.
- [23] Zhang, Q.-S.; Yan, Y.-H.; Li, S.-P.; Feng, T. Synthesis of a Novel Biodegradable and Electroactive Polyphosphazene for Biomedical Application. *Biomedical Materials* **2009**, *4* (3), 035008. DOI:10.1088/1748-6041/4/3/035008.
- [24] Barua, M.; Teniola, O. R.; Laurencin, C. T. Biodegradable Polyphosphazenes for Biomedical Applications. *Regenerative Engineering and Translational Medicine* **2023**, *10* (3), 323–343. DOI:10.1007/s40883-023-00318-w.14 Allcock, H. R.; Fuller, T. J.; Matsumura, K. Hydrolysis Pathways for Aminophosphazenes. *Inorganic Chemistry* **1982**, *21* (2), 515–521. DOI:10.1021/ic00132a009.
- [25] Allcock, H. R.; Fuller, T. J.; Matsumura, K. Hydrolysis Pathways for Aminophosphazenes. *Inorganic Chemistry* **1982**, *21* (2), 515–521. DOI:10.1021/ic00132a009.
- [26] Mancuso, G.; Midiri, A.; Gerace, E.; Biondo, C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens* **2021**, *10* (10), 1310. DOI:10.3390/pathogens10101310.
- [27] Okumuş, A.; Elmas, G.; Kılıç, Z.; Binici, A.; Ramazanoğlu, N.; Açıık, L.; Çoşut, B.; Hökelek, T.; Güzel, R.; Tunalı, B. Ç.; Türk, M.; Şimşek, H. The Comparative Reactions of 2-Cis-4-ansa and Spiro Cyclotetraphosphazenes with Difunctional Ligands: Structural and Stereogenic Properties, Electrochemical, Antimicrobial and Cytotoxic Activity Studies. *Applied Organometallic Chemistry* **2021**, *35* (4). DOI:10.1002/aoc.6150.

- [28] Asmafiliz, N.; Kılıç, Z.; Civan, M.; Avcı, O.; Yasemin Gönder (née Koç), L.; Açıık, L.; Aydın, B.; Türk, M.; Hökelek, T. Phosphorus–Nitrogen Compounds. Part 36. Syntheses, Langmuir–Blodgett Thin Films and Biological Activities of Spiro-Bino-Spiro Trimeric Phosphazenes. *New Journal of Chemistry* **2016**, *40* (11), 9609–9626. DOI:10.1039/c6nj02052f.
- [29] Gascón, E.; Maisanaba, S.; Otal, I.; Valero, E.; Repetto, G.; Jones, P. G.; Jiménez, J. (Amino)Cyclophosphazenes as Multisite Ligands for the Synthesis of Antitumoral and Antibacterial Silver(i) Complexes. *Inorganic Chemistry* **2020**, *59* (4), 2464–2483. DOI:10.1021/acs.inorgchem.9b03334.
- [30] Beytur, A.; Tekin, Ç.; Çalışkan, E.; Tekin, S.; Koran, K.; Orhan Görgülü, A.; Sandal, S. Hexa-Substituted Cyclotriphosphazene Derivatives Containing Hetero-Ring Chalcones: Synthesis, in Vitro Cytotoxic Activity and Their DNA Damage Determination. *Bioorganic Chemistry* **2022**, *127*, 105997. DOI:10.1016/j.bioorg.2022.105997..
- [31] Yudaev, P.; Tupikov, A.; Chistyakov, E. Organocyclophosphazenes and Materials Based on Them for Pharmaceuticals and Biomedicine. *Biomolecules* **2025**, *15* (2), 262. DOI:10.3390/biom15020262.
- [32] Tan, S. Y.; Ang, C. Y.; Zhao, Y. Smart Therapeutics Achieved via Host–Guest Assemblies. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II* **2017**, 391–420. DOI:10.1016/b978-0-12-409547-2.12575-2.
- [33] Jaid, G. M.; AbdulRazak, A. A.; Meskher, H.; Al-Saadi, S.; Alsalhy, Q. F. Metal-Organic Frameworks (Mofs), Covalent Organic Frameworks (Cofs), and Hydrogen-Bonded Organic Frameworks (Hofs) in Mixed Matrix Membranes. *Materials Today Sustainability* **2024**, *25*, 100672. DOI:10.1016/j.mtsust.2024.100672.
- [34] Wang, Y.; Ma, K.; Bai, J.; Xu, T.; Han, W.; Wang, C.; Chen, Z.; Kirlikovali, K. O.; Li, P.; Xiao, J.; Farha, O. K. Chemically Engineered Porous Molecular Coatings as Reactive Oxygen Species Generators and Reservoirs for Long-lasting Self-cleaning Textiles. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *61* (8). DOI:10.1002/anie.202115956.
- [35] Vrána, J.; Holub, J.; Samsonov, M. A.; Růžičková, Z.; Bulánek, R.; Fanfrlík, J.; Hnyk, D.; Gomila, R. M.; Frontera, A.; Růžička, A. Phenyl-Substituted Thiaboranes—linked 2D and 3D Aromatics as Noncovalent Organic Framework Materials. *Inorganic Chemistry* **2025**, *64* (15), 7377–7387. DOI:10.1021/acs.inorgchem.4c05457.
- [36] Andrianov, A. K. *Polyphosphazenes for Biomedical Applications*; John Wiley & Sons Incorporated, 2009.
- [37] Dračinský, M. NMR Spektroskopie pro Chemiky; Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, 2021.
- [38] Mari, S. H.; Varras, P. C.; Atia-tul-Wahab; Choudhary, I. M.; Siskos, M. G.; Gerathanassis, I. P. Solvent-Dependent Structures of Natural Products Based on the Combined Use of DFT Calculations and <sup>1</sup>H-NMR Chemical Shifts. *Molecules* **2019**, *24* (12), 2290. DOI:10.3390/molecules24122290.
- [39] De Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*; John Wiley & Sons, 2007.
- [40] MALDI-Mass Spectrometry. [https://www.niu.edu/clas/chembio/\\_pdf/analytical-lab/maldi/fl-analytix6-2001.pdf](https://www.niu.edu/clas/chembio/_pdf/analytical-lab/maldi/fl-analytix6-2001.pdf) (accessed 2025-03-23).

- [41] Challamalla, P.; Ghosh, S.; Parthiban, N.; Rao, K. N. V.; Banj, D. Negative Ion Mode Mass Spectrometry- an Overview. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences* **2** (3), 1462–1471. [https://www.researchgate.net/publication/307953461\\_Negative\\_ion\\_mode\\_mass\\_spectrometry-\\_an\\_overview](https://www.researchgate.net/publication/307953461_Negative_ion_mode_mass_spectrometry-_an_overview) (accessed 2025-03-29).
- [42] Ooi, L. *Principles of X-Ray Crystallography*; Oxford University Press, 2010.
- [43] Rhodes, G. *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*, Third ed.; Academic Press, 2006.
- [44] Grayson, M. L.; Kucers, A. *Kucers' the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs* volume 3; CRC Press American Society for Microbiology, 2018; pp 24-54
- [45] Işıklan, M.; Sayın, L.; Sonkaya, Ö.; Hökelek, T.; Türk, M.; Oğuztüzün, S. Synthesis, Structural Characterization, and Cytotoxic Activity of New Spirocyclic Octachlorocyclotetraphosphazenes. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2016**, *191* (9), 1216–1222. DOI:10.1080/10426507.2016.1160240.
- [46] Sun, J.; Yu, Z.; Wang, X.; Wu, D. Synthesis and Performance of Cyclomatrix Polyphosphazene Derived from Trispiro-Cyclotriphosphazene as a Halogen-Free Nonflammable Material. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2013**, *2* (2), 231–238. DOI:10.1021/sc400283d.
- [47] Okumuş, A.; Kılıç, Z.; Hökelek, T.; Dal, H.; Açık, L.; Öner, Y.; Koç, L. Y. Phosphorus–Nitrogen Compounds Part 22. Syntheses, Structural Investigations, Biological Activities and DNA Interactions of New Mono and Bis (4-Fluorobenzyl) Spirocyclophosphazenes. *Polyhedron* **2011**, *30* (17), 2896–2907. DOI:10.1016/j.poly.2011.08.035.
- [48] SONKAYA, Ö. Design and Synthesis of a Novel N-Substituted Aminoalcohol Derivative with Hexachlorocyclotriphosphazene. *Uluslararası Muhendislik Arastirma ve Gelistirme Dergisi* **2023**. DOI:10.29137/umagd.1318985.
- [49] Fulmer, G. R.; Miller, A. J.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29* (9), 2176–2179. DOI:10.1021/om100106e.
- [50] Willcott, M. R. Mestre Nova. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (36), 13180–13180. DOI:10.1021/ja906709t.
- [51] Triethylamine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triethylamin> (accessed 2025-05-11).
- [52] Showing Metabocard for N,n'-Dibenzylethylenediamine (HMDB0255273). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0255273> (accessed 2025-05-11).
- [53] Lascano, S.; van der Lee, A.; Lopez, M. Unexpected One-pot Formation of Lactam Oximes from Amino-hydroxamic Esters. *European Journal of Organic Chemistry* **2022**, *2022* (21). DOI:10.1002/ejoc.202200102.
- [54] Peláez-Arango, E.; García-Alonso, F. J.; Carriedo, G.; López-Ortiz, F. <sup>15</sup>N NMR Spectroscopy of Cyclotriphosphazenes and Polyphosphazenes Based On <sup>31</sup>P, <sup>15</sup>N HMQC Correlations. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1996**, *121* (2), 154–159. DOI:10.1006/jmra.1996.0155.

- [55] Allen, C. W.; Brown, D. E.; Cordes, A. W.; Craig, S. L. Crystal Structure of 2,2,4,4-Tetrachloro-6,6-Bis(Trimethylsilylamino)Cyclo-Triphosphazene, N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>CL<sub>4</sub>(NHSIME<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1988**, No. 5, 1405. DOI:10.1039/dt9880001405.
- [56] Kumaraswamy, S.; Vijjulatha, M.; Muthiah, C.; Kumara Swamy, K. C.; Engelhardt, U. Synthesis, Reactivity and Structures of Spirocyclic Products Derived from Octachlorocyclotetraphosphazene: Comparison with Spirocyclic Cyclotriphosphazenes and Linear Phosphazenes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1999**, No. 6, 891–900. DOI:10.1039/a807373b.
- [57] Pyykkö, P.; Atsumi, M. Molecular Double-bond Covalent Radii for Elements Li–E112. *Chemistry – A European Journal* **2009**, 15 (46), 12770–12779. DOI:10.1002/chem.200901472.
- [58] Elmas, G.; Okumuş, A.; Kılıç, Z.; Hökelek, T. Phosphorus–Nitrogen Compounds. Part 73. Dispiromono and Dispirobicyclotetraphosphazene Derivatives: Syntheses, and Spectroscopic, Crystallographic and Thermal Studies. *New Journal of Chemistry* **2024**, 48 (13), 5804–5819. DOI:10.1039/d4nj00569d.
- [59] Elmas, G.; Okumuş, A.; Cemaloğlu, R.; Kılıç, Z.; Çelik, S. P.; Açık, L.; Tunalı, B. Ç.; Türk, M.; Çerçi, N. A.; Güzel, R.; Hökelek, T. Phosphorus–Nitrogen Compounds. Part 38. Syntheses, Characterizations, Cytotoxic, Antituberculosis and Antimicrobial Activities and DNA Interactions of Spirocyclotetraphosphazenes with Bis-Ferrocenyl Pendant Arms. *Journal of Organometallic Chemistry* **2017**, 853, 93–106. DOI:10.1016/j.jorgchem.2017.10.025.
- [60] Elmas, G.; Okumuş, A.; Sevinç, P.; Kılıç, Z.; Açık, L.; Atalan, M.; Türk, M.; Deniz, G.; Hökelek, T. Phosphorus–Nitrogen Compounds. Part 37. Syntheses and Structural Characterizations, Biological Activities of Mono and Bis(4-Fluorobenzyl)Spirocyclotetraphosphazenes. *New Journal of Chemistry* **2017**, 41 (13), 5818–5835. DOI:10.1039/c7nj00478h.
- [61] Hökelek, T.; Öztürk, L.; Işıklan, M.; Kiliç, Z. Crystal Structure of Trans-2,6-Bis(n-Propylamino)-2,4,4,6,8,8-Hexapyrrolidinocyclo-2a5, 4 A5, 6 A5, 8A5-Tetraphosphazetetraene. *Analytical Sciences* **2002**, 18 (8), 961–962. DOI:10.2116/analsci.18.961.
- [62] Uslu, A.; Mutlu Balcı, C.; Yuksel, F.; Özcan, E.; Dural, S.; Beşli, S. The Investigation of Thermosensitive Properties of Phosphazene Derivatives Bearing Amino Acid Ester Groups. *Journal of Molecular Structure* **2017**, 1136, 90–99. DOI:10.1016/j.molstruc.2017.01.071.