

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra anorganické chemie



Jan Havlík

Design a syntéza selektivních chelatantů dvojmocné mědi

Design and synthesis of selective copper(II) chelators

Bakalářská práce

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele a všechny použité prameny jsem řádně citoval v seznamu literatury.

V Praze, září 2008

Jan Havlík

1. Obsah

1. Obsah	3
2. Teoretický úvod	5
2.1. Nukleární medicína	5
2.1.1. Diagnostické metody.....	5
2.1.2. Radioterapie	7
2.2. Měď	8
2.2.1. Komplexní sloučeniny mědi.....	8
2.2.2. Izotopy mědi a jejich význam v medicíně.....	9
2.2.2.1. Radionuklid ⁶⁴ Cu.....	10
2.2.2.2. Radionuklid ⁶⁷ Cu.....	11
2.2.2.3. Čištění radionuklidů	11
2.2.2.4. Příprava komplexů s radionuklidy	11
2.2.3. Selektivní chelatanty dvojmocné mědi	11
2.2.3.1. Acyklické polyaminokarboxyláty	12
2.2.3.2. Polyazamakrocykly	13
2.2.3.3. Bis(thiosemikarbazony)	15
2.2.3.4. Porfyriny	16
3. Teoretické pozadí a cíl práce	17
3.1. Způsoby selektivního chránění cyklamového skeletu	17
3.1.1. Chránění v poloze 1,4	17
3.1.2. Chránění v poloze 1,8	18
3.1.3. Chránění v poloze 1,11	18
3.2. Cíl bakalářské práce	20
4. Experimentální část	21
4.1. Seznam použitých chemikálií	21

4.2. Metody charakterizace	22
4.2.1. Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	22
4.2.2. Hmotnostní spektrometrie (MS)	22
4.2.3. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	23
4.2.4. Elementární analýza.....	23
4.3. Syntéza výchozích látek a ligandů	24
4.3.1. Příprava látky I.....	25
4.3.2. Příprava látky II	26
4.3.3. Příprava látky III.....	27
4.3.4. Příprava látky IV	28
4.3.5. Příprava látky V	29
4.3.6. Příprava látky VI.....	30
5. Diskuze	31
5.1.1. Látka I.....	32
5.1.2. Látka II.....	32
5.1.3. Látka III	33
5.1.4. Látka IV.....	34
5.1.5. Látka V	34
5.1.6. Látka VI.....	34
6. Závěr.....	35
7. Seznam zkratk	36
8. Poděkování.....	37
9. Použitá literatura	38

2. Teoretický úvod

2.1. Nukleární medicína^[1]

Nukleární medicína je lékařský obor zabývající se užitím radiace a radioaktivity pro diagnózu a léčbu chorob. Zahrnuje řadu různých metod a využívá také radiofarmaka – léčiva značená radionuklidy. Seznam radionuklidů běžně užívaných v diagnostice je uveden v **Tab. 1**. Ve více než 90 % provedených procedur je však využíváno metastabilního technecia ^{99m}Tc nebo některého z radioizotopů jodu. Radiofarmaka jsou nejčastěji využívána při specifickém zobrazování orgánů, kostí a tkání. Typická dávka záření, které jsou vystavováni dospělí pacienti, je 1–30 mCi.

Nuklidy užívané v diagnostických metodách by měly emitovat fotony s energií mezi 100 až 200 keV, mít krátkou rozpadovou řadu (pro omezení poškození organismu ozářením) a jejich poločas rozpadu by měl být zhruba roven 1,5 násobku délky procedury. Zároveň by měly být cenově dobře dostupné a snadno připravitelné.

2.1.1. Diagnostické metody^[1,2]

Planární scintigrafie

Tato metoda je v současné době nejčastěji užívanou scintigrafickou metodou. Zobrazuje projekci distribuce radioindikátoru prostřednictvím γ záření do zobrazované roviny. Typicky se snímají srdce nebo játra. Pomocí zaznamenávání několika snímků krátce za sebou je možno sledovat i dynamiku vylučování radiofarmak z orgánů.

Tomografická scintigrafie

Tomografická scintigrafie umožňuje prostorové zobrazení vyšetřované části těla. Nejčastěji používanými metodami tomografické scintigrafie jsou SPECT a PET.

SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography – jednofotonová emisní počítačová tomografie) je metoda založená na snímání série rovinných obrazů vyšetřovaného místa z různých úhlů pomocí detektoru, který rotuje kolem pacientova těla. Počítačovou rekonstrukcí je ze snímků poté konstruován trojrozměrný obraz distribuce radioindikátoru v těle. SPECT je většinou používána k zobrazování mozku a srdce a má rozlišovací schopnost 5–7 mm. Nejvíce užívanými γ -emitory ve SPECT jsou ^{99m}Tc , ^{201}Tl , ^{67}Ga , ^{111}In a ^{123}I .

PET (Pozitronová Emisní Tomografie) využívá pozitronového β^+ radioindikátoru, který v místě své distribuce při rozpadu emituje pozitrony e^+ , jež vzápětí anihilují s elektrony ve svém okolí za vzniku dvou γ -fotonů o energii 511 keV, šířících se z místa srážky se vzájemným úhlem 180° po koincidenční přímce. Tyto dvojice jsou poté současně detekovány a počítačovou rekonstrukcí velkého souboru těchto koincidenčních paprsků je vytvářen tomografický obraz. Nejčastěji využívaným radionuklidem v této metodě je ^{18}F . Kromě něj jsou užívány i ^{11}C , ^{13}N a ^{15}O . V současné době se zaměřuje pozornost také na radionuklidy přechodných kovů, jako jsou ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y .^[3]

PET je užívána především v onkologii k posouzení biologické povahy vyšetřovaného ložiska. Ve své dynamické podobě pak slouží též ke snímání funkcí mozku, srdce a plic. Tato metoda prochází v současné době s nástupem silných výpočetních systémů rychlým rozvojem.

Tabulka 1: Radionuklidy běžně užívané v diagnostice

Nuklid	Použití	Nuklid	Použití
^{11}C	vyšetření mozku PET	^{75}Se	studie proteinů
^{14}C	značené sloučeniny		obrazování jater a slinivky
^{13}N	vyšetření PET	$^{81\text{m}}\text{Kr}$	zobrazování plic
^{15}O	vyšetření cévního zásobení mozku pomocí PET	^{82}Rb	lokalizační agents myokardu
^{18}F	vyšetření PET	^{85}Sr	měření metabolismu kostí
^{32}P	diagnostika chorob kostí	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	zobrazování srdce, plic, štítné žlázy, žlučníku, kůže, lymfatických uzlin, kostí, jater, sleziny a ledvin
^{33}P	značené sloučeniny		
^{35}S	diagnostika nemocí srdce	^{109}Cd	detekce rakoviny
	značení nukleových kyselin		pediatrická vyšetření
^{47}Ca	buněčné funkce a tvorba kostí		diagnostika nemocí srdce
^{46}Sc	studie krevního oběhu	^{111}In	detekce odmítnutí srdečních transplantátů
^{47}Sc	diagnostika rakoviny		zobrazení břišních infekcí
^{51}Cr	studium červených krvinek		zobrazení metastazujících melanomů
	vnitřní krvácení	^{123}I	poruchy štítné žlázy
^{51}Mn	lokalizační agens myokardu	^{125}I	detekce osteoporózy
^{52}Mn	vyšetření PET		značení léčiv
^{59}Fe	vyšetření kostní dřve	^{131}I	poruchy štítné žlázy
	studium metabolismu železa		patobiochemie mozku
^{57}Co	zobrazování různých orgánů	^{127}Xe	zobrazování plic
^{58}Co	indikátor zhoubné anémie		zobrazování neurálních poruch mozku
^{64}Cu	vyšetření PET	^{133}Xe	studium plicní ventilace
^{67}Cu	diagnostika rakoviny	^{169}Yb	diagnostika GIT
^{67}Ga	zobrazování nádorových a zánětlivých lézí	$^{191\text{m}}\text{Ir}$	kardiovaskulární angiografie
^{68}Ga	studie trombózy a aterosklerózy, PET	$^{195\text{m}}\text{Pt}$	farmakokinetické studie protinádorových léčiv
^{72}Se	zobrazování mozku		

2.1.2. Radioterapie^[1,2]

Radioterapie je fyzikálně-medicínský obor využívající biologické účinky ionizujícího záření pro léčebné účely. Ve většině případů se jedná především o terapii nádorových onemocnění, méně často pak o léčbu degenerativních a zánětlivých onemocnění. Radioterapie využívá účinků ionizujícího záření na buňky tkání, které jsou v případě dostatečně vysoké dávky usmrcovány, nebo je alespoň poškozením jejich DNA zamezeno jejich dalšímu množení. Cílem radioterapie je likvidace nádorového ložiska s co nejmenším poškozením okolních zdravých tkání. Radiační likvidace buněk může být součástí *kurativní terapie* vedoucí k úplnému vyléčení, či v případě těžších a pokročilejších stádií *paliativní terapie*, která vede pouze ke zmírnění a zpomalení průběhu onemocnění. Rozlišujeme tři terapeutické způsoby podle cesty, jakou se záření dostává do cílového místa. *Teletapie* využívá ozařování z vnějšího ozařovače, *brachyterapie* využívá aplikaci uzavřených zářičů do cílové tkáně nebo její blízkosti a *radioizotopová terapie* spočívá v aplikaci otevřených zářičů ve vhodné chemické formě přímo do organismu. Jako uzavřený zářič je označován radioizotop uzavřený do chemicky inertního pouzdra, který s okolní tkání nijak chemicky neinteraguje. Otevřený zářič je oproti tomu forma radionuklidu (například jeho chemická sloučenina), která není ničím izolovaná a může být tělem metabolizována nebo vyloučena.

V případě radioizotopové terapie radiofarmakum vstoupí do metabolismu způsobem, jenž je dán jeho chemickou strukturou a farmakokinetikou. Léčivo bývá navrženo tak, aby bylo selektivně vychytáváno a akumulováno v nádorové tkáni, díky čemuž je nádor likvidován s velkou efektivitou a nízkými vedlejšími účinky. Pro tyto účely je vhodné volit radionuklidy produkující záření s krátkým dosahem, jako je α a β^- . Nadměrná produkce záření je v tomto případě narozdíl od radiodiagnostiky nežádoucí, neboť pak dochází k nechtěnému ozáření zcela zdravé okolní tkáně. Smíšených beta-gama zářičů však může být s výhodou využito k monitorování průběhu terapie. Vhodnými radionuklidy pro radioterapii jsou ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re a ^{188}Re . Z izotopů mědi se výhledově jeví vhodným ^{64}Cu jako smíšený zářič a ^{67}Cu jako čistý β^- zářič s nízkoenergetickými γ -fotony vyzařovanými při deexcitaci metastabilních izomerů jader zinku vzniklých při rozpadu.

2.2. Měď

Měď, stejně jako ostatní kovy IB skupiny, patří mezi jedny z prvních kovů, které lidstvo poznalo. Názory archeologů na její první použití se rozcházejí. Někteří předpokládají, že měď byla známa již kolem 9000 př. n. l. Za prokázanou dobu prvního použití mědi lze považovat až rok 5000 př. n. l., kdy byla její výroba rozšířena po celé oblasti Středního východu. Kolem roku 3000 př. n. l. pak dochází k objevu schopnosti mědi tvořit pevné bronzy. Toto je pokládáno za počátek doby bronzové.^[4]

Původ jejího názvu je nejistý. Nejvíce pravděpodobná je ovšem spojitost s názvem starověké Médie, na jejímž území se nacházela nejvýznamnější starověká naleziště mědi v Zakavkazí. Podobným způsobem je odvozen i latinský název mědi *cuprum* od ostrova Kypru.^[5]

Ryzí měď se v přírodě vyskytuje vzácně. Její nejčastější podoba je ve formě sulfidů (chalkopyrit, chalkosin, covellin), oxidu měďnatého (cuprit) či zásaditých uhličitanů a hydroxidů (malachit, azurit). Měď bývá vyráběna převedením sulfidů na oxidy pomocí pražení a následnou redukcí koksem za vysoké teploty. Přesný postup výroby však závisí na složení konkrétní rudy. Získaná surová měď bývá čištěna elektrolyticky v okyseleném roztoku CuSO_4 při napětí 0,2–0,4 V a proudu 20 kA. Kaly vznikající při tomto procesu jsou vydatným zdrojem vzácných kovů a zvyšují tak ekonomickou výhodnost této metody.^[6]

Měď je měkký a kujný kov načervenalé barvy s mimořádnou schopností tvořit slitiny s většinou kovů. Její elektronová konfigurace je $(\text{Ar})3d^{10}s^1$. Měď je na suchém vzduchu stálá a odolává i roztokům silných neoxidujících kyselin ($E_{\text{Cu}^+/\text{Cu}}^\circ = +0,521$). Je používána především na výrobu elektrických vodičů. Dále pak v mincovnictví, strojírenství, elektronice, stavebnictví a ve formě slitin i ve zbrojařství, k výrobě hudebních nástrojů či jako katalyzátor. Sloučeniny mědi jsou vysoce toxické pro mikroorganismy, a proto je na jejich bázi založeno mnoho fungicidních, algicidních a baktericidních prostředků.^[7,8]

2.2.1. Komplexní sloučeniny mědi^[4,9]

S výjimkou jednoduchých fluorokomplexů Cu^{IV} nabývá měď ve svých sloučeninách pouze oxidačních čísel III, II a I. Stabilní sloučeniny mědi s nulovým nebo záporným oxidačním číslem nejsou známy.

Oxidační číslo III (d^8) je pro měď méně běžné, neboť sloučeniny podléhají velmi snadno redukcí. V komplexech proto vyžaduje stabilizaci silnými elektronegativními ligandy. Většina

komplexů Cu^{III} s výjimkou světle zeleného $\text{K}_3[\text{CuF}_6]$ je dle očekávání nízkospinová a diamagnetická s čtvercovou geometrií koordinační sféry. Příkladem je řada namodralých sloučenin o složení $\text{M}[\text{CuO}_2]$ ($\text{M} = \text{alk. kov}$). Ion Cu^{III} se účastní důležitých biochemických pochodů, a proto je v poslední době objektem zvýšené pozornosti.

Oxidační číslo II (d^9) bývá u sloučenin mědi zastoupeno nejběžněji. S výjimkou CN^- a I^- tvořících nerozpustné kovalentní sloučeniny lze odvodit jednoduché měďnaté soli téměř od všech aniontů. Většina měďnatých solí se rozpouští ve vodě za vzniku modře zbarveného kationtu $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Nejčastějšími koordinačními čísly, se kterými se lze setkat, jsou 4, 5 a 6, jimž odpovídají většinou vlivem Jahnova-Tellerova efektu nepravidelná geometrická uspořádání. Pro Cu^{II} je charakteristická široká škála sloučenin s *N*-donorovými ligandy jako NH_3 , en, bipy, ftalocyanin a cyklam. Poměrně hojně zastoupené jsou i *O*-donorové chelatotvorné ligandy. Kromě β -diketonů, β -ketoesterů a karboxylátů jsou to například deriváty katecholu nebo salicylové kyseliny. Z *O,N*-donorových ligandů pak tvoří velmi významnou skupinu látek aminokyseliny, peptidy a Schiffovy báze.

Oxidační číslo I (d^{10}) je u většiny jednoduchých sloučenin nestálé, neboť měďné ionty jeví z důvodu vysoké hydratační energie Cu^{II} snahu disproportionovat na Cu^0 a Cu^{II} . Oxidační stav Cu^{I} je však možné stabilizovat v málo rozpustných sloučeninách nebo za pomoci π -akceptorových či snadno polarizovatelných ligandů jako jsou fosfiny, thioestery, nitrily či kyanidové a jodidové ionty. Měďné komplexy jsou z důvodu zaplněného *d* orbitalu bezbarvé nebo nažloutlé a diamagnetické. Z důvodu mizivé LFSE jsou koordinační číslo a geometrie komplexů určeny především sterickými a konformačními důvody. Pro oxidační číslo I je typická existence tetraedrických komplexů, jako jsou $[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{3-}$, $[\text{Cu}(\text{py})_4]^+$ nebo $[\text{Cu}(\text{bipy})_2]^+$. Běžný je také výskyt koordinačních čísel 2 a 3 (polymerní $[\text{Cu}(\text{CN})_2]^-$, či planární $[\text{Cu}(\text{CN})_3]^{2-}$).

Komplexně vázaná měď je kofaktorem některých důležitých metaloenzymů.^[4]

2.2.2. Izotopy mědi a jejich význam v medicíně

Měď je v přírodě zastoupena dvěma stabilními izotopy ^{63}Cu (69,17 %) a ^{65}Cu (30,83 %). Pro použití v nukleární medicíně je vhodná díky existenci velkého počtu svých izotopů s vhodnými poločasy rozpadu a druhy a energiemi uvolňovaných elementárních částic. Uměle byly připraveny radionuklidy ^{57}Cu až ^{79}Cu . Některé z nich existují též v metastabilní formě.

Jejich poločasy rozpadu se pohybují od $t_{1/2}(^{79}\text{Cu}) = 188 \text{ ms}$ po $t_{1/2}(^{67}\text{Cu}) = 61,83 \text{ h}$.^[10] Pro použití v nukleární medicíně musí mít daný radionuklid také vhodné fyzikální vlastnosti

a cenově rentabilní způsob výroby. Z izotopů připadajících v úvahu (**Tab. 2**) se v současné době jeví jako nejvíce perspektivní ^{64}Cu a ^{67}Cu .^[11]

Tabulka 2: Vlastnosti vybraných radioizotopů mědi ^[11]

Radionuklid	$t_{1/2}$ (h)	Druh rozpadu (%)	E_p (keV)	E_{np} (keV)	R_{np} (mm)	Zdroje radionuklidu
^{60}Cu	0,38	β^+ (93)	511	873	4,4	cyklotron
		EZ (7)	1332			
^{61}Cu	3,3	β^+ (62)	511	527	2,6	cyklotron
		EZ (38)	283			
^{62}Cu	0,16	β^+ (98)	511	1315	6,60	generátor/cyklotron
		EZ (2)				
^{64}Cu	12,7	β^+ (19)	511	278	1,40	reaktor/cyklotron
		EZ (41)	1343			
		β^- (40)		190	0,95	
^{66}Cu	0,09	β^- (100)		1109	5,60	reaktor/cyklotron
^{67}Cu	61,8	β^- (100)	93	121	0,61	reaktor/cyklotron

E_p – energie penetrujícího záření vzniklého rozpadem (γ)

E_{np} – střední energie nejvíce zastoupeného nepenetrujícího záření (β^+/β^-)

R_{np} – střední poloměr nepenetrujícího záření v tkáni

2.2.2.1. Radionuklid ^{64}Cu

Nuklid ^{64}Cu je díky velkému množství možných způsobů rozpadu jeden z nejuniverzálnějších radioizotopů mědi. Při jaderném rozpadu může dojít k elektronovému zachytu (41 %), vyzáření β^- (40 %) nebo β^+ (19 %). Následkem EZ může být též emise Augerových elektronů. Poločas rozpadu (12,7 h) je dostatečný k přípravě sloučenin a zároveň vhodně odpovídá *in vivo* kinetice mnoha různých molekulárních nosičů. Díky těmto vlastnostem je tento radionuklid vhodný pro použití v zobrazovacích i terapeutických metodách. Další výhodou je také poměrně univerzální způsob přípravy v reaktoru či cyklotronu. Podle požadované aktivity se volí buď přímá aktivace $^{63}\text{Cu}(n,\gamma)^{64}\text{Cu}$, nebo nepřímá na zinkovém terči $^{64}\text{Zn}(n,p)^{64}\text{Cu}$. Nejvyšší aktivity (až 11,5 GBq/ μg) jsou dosahovány v cyklotronu ozařováním niklového terče obohaceného o ^{64}Ni při reakci $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$. Radioizotop ^{64}Cu má oproti ^{67}Cu poněkud vyšší terapeutický index z důvodu kratšího poločasu rozpadu. Vlastnosti obou izotopů jsou ale srovnatelné. ^[11]

2.2.2.2. Radionuklid ^{67}Cu

Nuklid ^{67}Cu má ze všech izotopů mědi nejdelší poločas rozpadu (61,83 h)^[10]. Rozpadá se β^- rozpadem přímo na ^{67}Zn v základním stavu za vyzáření elektronu o E_{max} 0,577 MeV či na některý z jeho tři metastabilních izomerů. Tyto izomery následně přecházejí do základního stavu vyzářením γ -fotonu o odpovídající energii (91, 93 nebo 185 keV), díky čemuž je možno sledovat radionuklid pomocí SPECT. V současné době jsou hledány vhodné metody k vylepšení doposud ekonomicky náročné výroby tohoto radionuklidu. Beznosičová příprava ^{67}Cu v reaktoru reakcí $^{67}\text{Zn}(n,p)^{67}\text{Cu}$ vyžaduje velmi vysoký neutronový tok.^[12] Alternativní metoda vhodná pro produkci v malém množství by mohla být reakce $^{64}\text{Ni}(\alpha,p)^{67}\text{Cu}$, jež však dosud k výrobě nebyla použita.^[11,13]

2.2.2.3. Čištění radionuklidů

Radioizotopy mědi vyrobené ozařováním kovového terče neutrony v jaderném reaktoru obsahují velká množství niklu či zinku. Při ozařování niklu protony či deuterony v urychlovačích vznikají mimo to i stopová množství kobaltu. Během samotné přípravy také vzniká velké množství dceřiného produktu rozpadu připravovaného radionuklidu.

Pro užití v medicíně je ale nezbytně nutné, aby měly vyrobené izotopy mědi co nejvyšší specifickou aktivitu a obsahovaly co nejmenší množství jiných nuklidů. Tyto nečistoty je proto nutné oddělit od radioizotopů mědi pomocí některé z metod využívající různých druhů kationtových a aniontových iontoměníčů nebo chelatujících pryskyřic.^[1,11]

2.2.2.4. Příprava komplexů s radionuklidy^[11]

Vyčištěné izotopy mědi bývají používány k dalším reakcím nejčastěji ve formě chloridu měďnatého a jeho hydrátů. Požadované radiofarmaceutické komplexy s Cu^{II} tak bývají připravovány prostým přidáním odpovídajícího množství radionuklidu k roztoku ligandu za laboratorní teploty a patřičného pH. Pro komplexy obsahující Cu^{I} je buď nutno použít redukčního činidla, nebo vhodného ligandu, který toto oxidační číslo stabilizuje.

2.2.3. Selektivní chelatanty dvojmocné mědi^[11,14]

Selektivní ligandy měly vždy svůj význam především v medicíně. Z počátku byly užívány při intoxikaci Cu^{II} či při léčbě Wilsonovy choroby projevující se patologickým ukládáním mědi v organismu.^[15] V současné době probíhá intenzivní preklinický výzkum pro užití těchto ligandů v radiomedicíně pro diagnostické a terapeutické účely.^[16]

Komplexy používané v medicíně musí splňovat vysoké nároky na kinetickou stabilitu *in vivo*. Tělesné tekutiny totiž obsahují velké množství iontů (Na^I , K^I , Mg^{II} , Ca^{II} , Zn^{II} , $\text{Fe}^{II/III}$, atd.) a chelatujících sloučenin, a je proto třeba uvažovat případné konkurenční komplexotvorné rovnováhy.^[13,17]

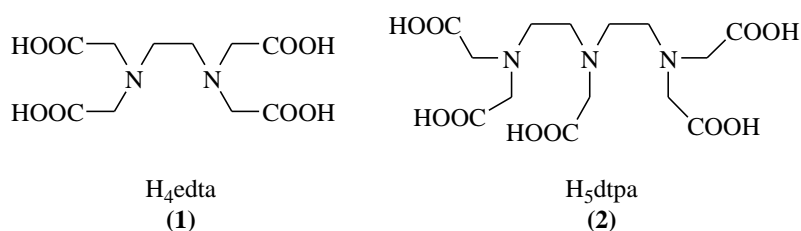
Původně byla považována za rozhodující faktor při výběru vhodného ligandu termodynamická stabilita jeho komplexu. Pro použití radiofarmak se však ukázala zásadnější stabilita kinetická, neboť je nutné, aby během celé doby setrvání radiofarmaka *in vivo* byly ztráty radionuklidu disociací co nejmenší.

Pro pevné připojení iontu radionuklidu k biologicky aktivní molekule je třeba využít bifunkčních ligandů, které pevně vážou kov na straně jedné a zároveň jsou spojeny kovalentní vazbou s biologicky aktivní molekulou na straně druhé. Pro účely selektivního vázání mědi bylo zkoumáno velké množství bifunkčních ligandů, které jsou většinou odvozeny od základních skeletů probraných níže.

Ideální bifunkční ligand by měl kvantitativně koordinovat měď v řádu minut i v nanomolárních koncentracích v roztocích s pH 4–9 a teplotě 20–37 °C, měl by preferovat Cu^{II} před jinými ionty a vytvářet s ním dobře definované komplexy. Vzniklý komplex by měl co nejméně interagovat s ionty kovů a proteiny přirozeně v organismu přítomnými a být tedy kineticky inertní.^[18]

2.2.3.1. Acyklické polyaminokarboxyláty^[11]

Jako první byly pro použití v klinické medicíně zkoumány acyklické polyaminokarboxyláty, jako jsou kyseliny ethylendiamintetraoctová (H_4edta) (**1**) a diethylentriaminpentaoctová (H_5dtpa) (**2**) (**Obr. 1**). Navzdory poměrně vysoké rovnovážné konstantě měďnatých komplexů (pro komplex s H_4edta je $\log K = 18,8$)^[19] se jejich komplexy ukázaly *in vivo* jako nevhodné z důvodu nízké kinetické stability vůči transchelataci s lidským sérovým albuminem.



Obrázek 1: Příklad acyklických polyaminokarboxylátů

2.2.3.2. Polyazamakrocykly

Makrocyklické polyaminy

Tetraazamakrocykly patří díky své vysoké kinetické stabilitě mezi nejběžněji užívané chelatanty Cu^{II} .^[20,21] Uvedme např. makrocyklický ligand cyklam (**5**) (**Obr. 2**), který tvoří v přítomnosti Cu^{II} komplex vynikající svou kinetickou stabilitou i v biologických podmínkách. Rentgenová strukturní analýza jeho monokrystalu prokázala, že měďnatý kation je v tomto čtvercově planárním komplexu vázán čtyřmi ekvivalentními vazbami k atomům dusíku v ligandu.^[22] Tento skelet je v současné době objektem zvýšeného vědeckého zájmu za účelem přípravy a prozkoumání biologických vlastností jeho derivátů s různými funkčními skupinami na pendantních ramenech. Příkladem takové skupiny může být methylfosfonová kyselina zvyšující komplexační rychlost a selektivitu cyklu vůči Cu^{II} .^[23]

Makrocyklické polyaminokarboxyláty

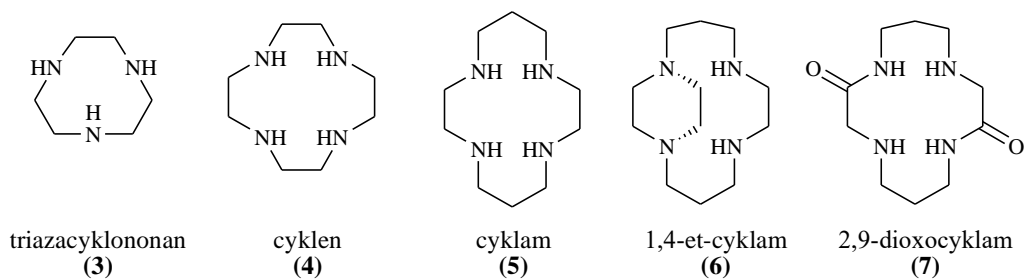
Přítomnost karboxylových skupin na pendantních ramenech přináší mnoho výhod, jako jsou jednoduchá syntéza, kinetická a termodynamická stabilita, rozpustnost ve vodě a odolnost vůči iontové výměně *in vivo*.^[24] Mezi nejvíce používané polyaminokarboxyláty patří *H₄dota* (**8**) (**Obr. 2**), která je v komplexu s mědí dvojnásobně koordinována dvěma atomy dusíku v ekvatoriální rovině a dvěma karboxylovými atomy kyslíku v poloze *cis*. Zbylé dva atomy dusíku jsou v axiálních polohách nad a pod ekvatoriální rovinou oktaedru. Tvar komplexu napovídá, že samotný cyklus je příliš malý pro planární koordinaci všemi čtyřmi atomy dusíku.^[18] Výzkum se proto zpočátku zaměřil na její větší analog *H₄teta* (**10**) (**Obr. 2**), jenž tvoří v porovnání s *H₄dota* (**8**) termodynamicky stabilnější komplexy.^[16] Bass *et al.* však pozdější době prokázali, že komplex ⁶⁴Cu-*teta-oktreotid* (oktapeptid) i přes svou vysokou stabilitu *in vitro* velmi snadno podléhá *in vivo* transchelataci se superoxid dismutázou, a *h₄teta* je proto v podobě svých bifunkčních derivátů nevhodná pro použití v klinické praxi.^[25]

Makrocyklické polyaminofosfonáty

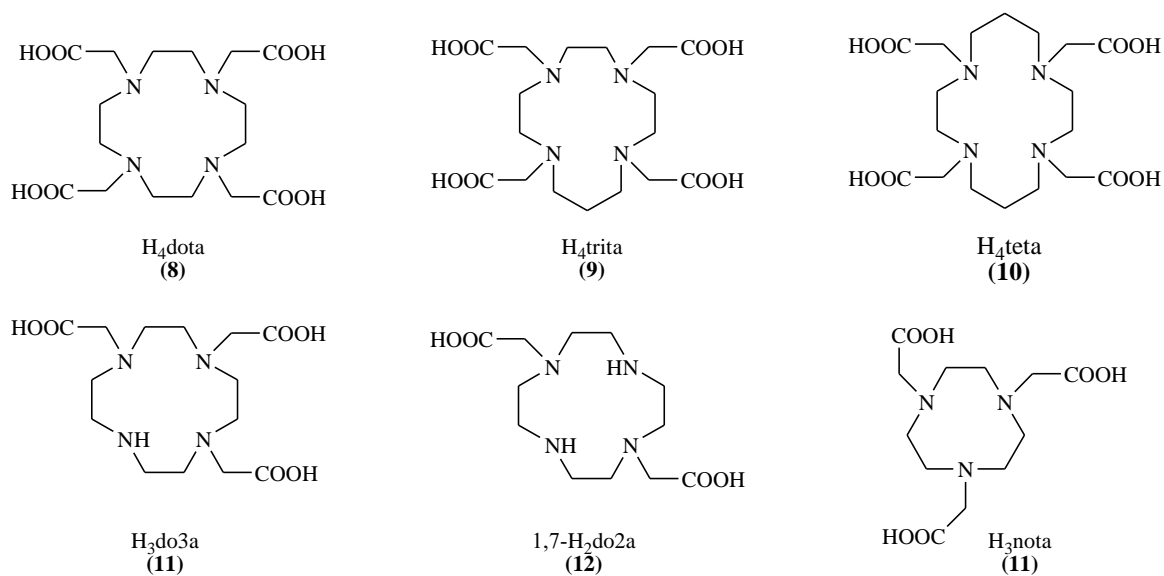
Jedná se o skupinu polyazamakrocyklů vyznačujících se svou koordinační selektivitou a vysokou termodynamickou stabilitou.^[26] Tyto komplexy jsou velmi stabilní vůči kyselé hydrolýze, a proto se jeví jako velmi slibné pro účely aplikací v nukleární medicíně.

Polyaminofosfonáty obecně nejspíše z důvodu afinity methylfosfonové skupiny k hydroxyapatitu jeví tendenci se ve zvýšené míře akumulovat v kostní tkáni, čehož by mohlo být využito při zobrazování kostí.^[27,28]

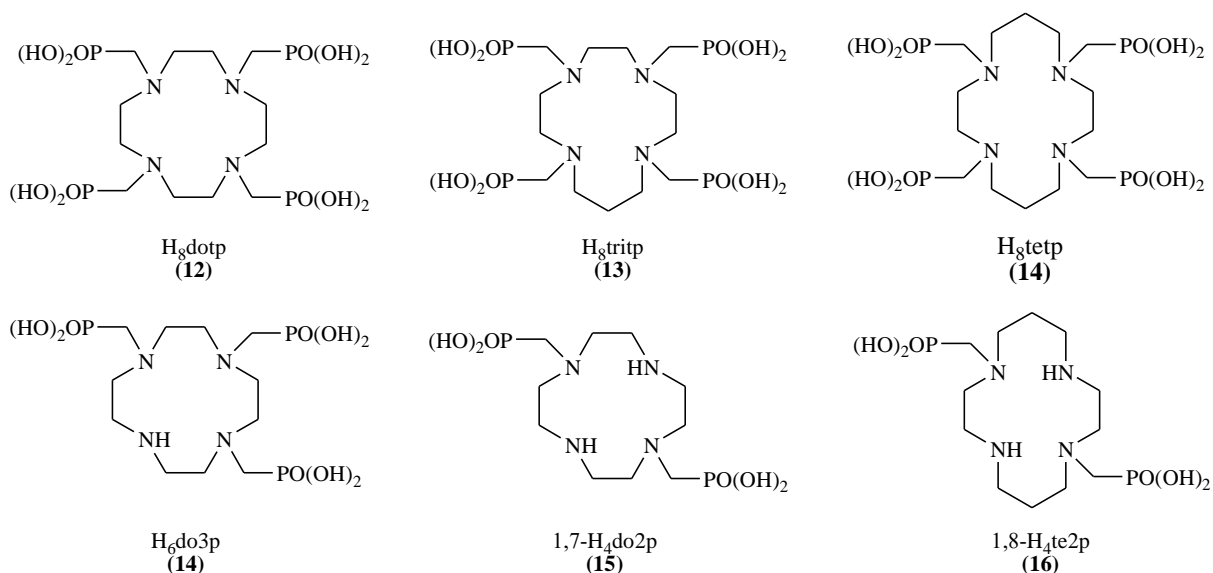
Makrocyklické polyaminy



Makrocyklické polyaminokarboxyláty



Makrocyklické polyaminofosfonáty

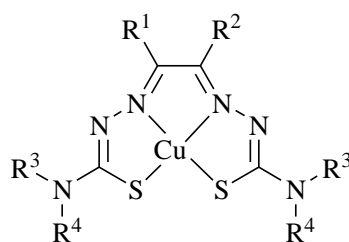


Obrázek 2: Základní makrocyklické sloučeniny zmíněné v textu

2.2.3.3. Bis(thiosemikarbazony)^[11,14]

Bis(thiosemikarbazony) (BTS) (17–29) (Obr. 3) tvoří s Cu^{II} termodynamicky ($\log K = 17\text{--}18$) a kineticky relativně stálé čtvercově planární komplexy. Jejich stabilita je však v porovnání s komplexy makrocyclických ligandů mnohem nižší. Dalším jejich nedostatkem je fakt, že při *in vivo* použití dochází k výrazné nespecifické vazbě koordinované mědi na okolní proteiny. I přes všechna tato omezení je možné BTS úspěšně použít například ke značení lidského sérového albuminu při sledování krevního oběhu, neboť v tomto případě nehraje roli stabilita komplexu, nýbrž schopnost rychlého a snadného označení. Výhodou této skupiny ligandů je také to, že jejich vlastnosti jako je redukční potenciál či lipofilita mohou být velmi snadno laděny pomocí alkylace skeletu a terminálních aminů, díky čemuž je možné vytvořit radiofarmaka s vysokou selektivitou pro různé druhy tkání.^[29,30]

Samotné BTS jako skupina sloučenin byly zkoumány již v roce 1960, neboť vykazují protinádorovou aktivitu, která může být znatelně zvýšena koordinací na Cu^{II} za vzniku komplexu.^[31]



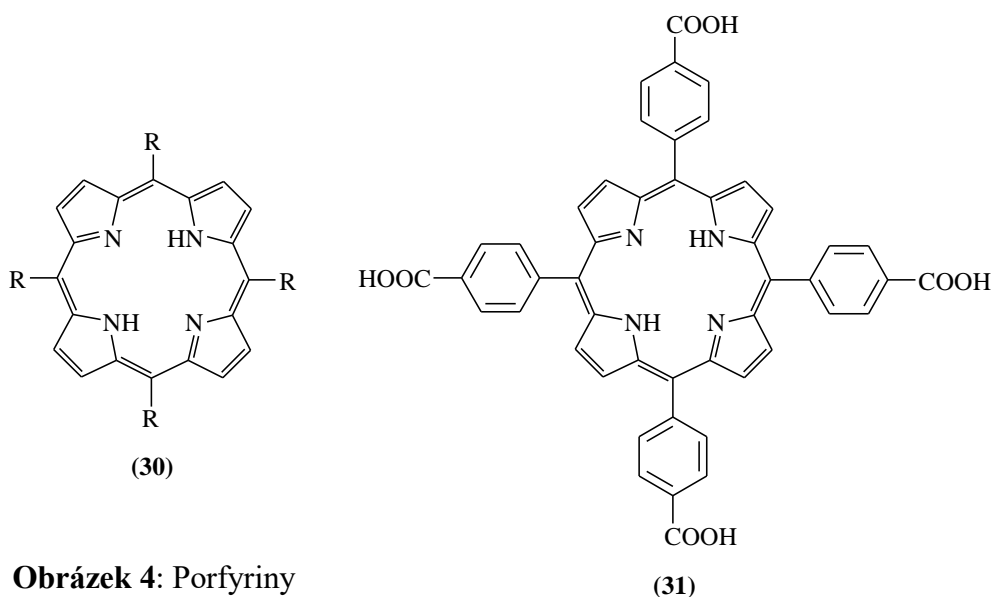
		R ¹	R ²	R ³	R ⁴
(17)	GTS	H	H	H	H
(18)	GTSM	H	H	CH ₃	H
(19)	PTS	CH ₃	H	H	H
(20)	PTSM	CH ₃	H	CH ₃	H
(21)	PTSM ₂	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
(22)	PTSE	CH ₃	H	C ₂ H ₅	H
(23)	PTSP	CH ₃	H	C ₂ H ₅	H
(24)	ATS	CH ₃	CH ₃	H	H
(25)	ATSM	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
(26)	CTS	C ₂ H ₅	CH ₃	H	H
(27)	CTSM	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	H
(28)	DTS	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H	H
(29)	DTSM	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃	H

Obrázek 3: Struktury a zkratky komplexů Cu-BTS.^[30]

2.2.4. Porfyriny^[11]

Porfyriny (**30**) (**Obr. 4**) mohou být považovány za potenciálně vhodné nosiče radiomědi do vybraných tkání. Měďnaté komplexy porfyrinů jsou totiž neobyčejně stálé vůči rozpadu a jejich skelet může být snadno derivatizován. Pro tyto vlastnosti se jeví jako vhodné bifunkční chelatanty v makromolekulách pro dlouhodobé značení. Porfyriny samy o sobě mají z doposud ne zcela objasněného důvodu tendenci se kumulovat v zánětlivých a lymfatických tkáních, čehož může být s výhodou využito v zobrazovacích metodách.

Obecnou nevýhodou porfyrinů je jejich pomalá kinetika komplexace. Tato překážka však může být překonána použitím vhodně navrženého derivátu s vyšší komplexační rychlostí, jak je tomu například u derivátu **31** (**Obr. 4**).



Obrázek 4: Porfyriny

3. Teoretické pozadí a cíl práce

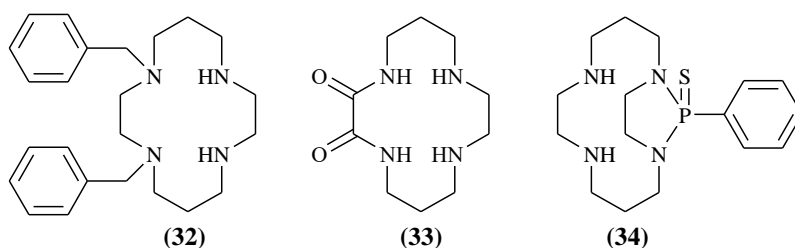
3.1. Způsoby selektivního chránění cyklamového skeletu^[32]

Substitucí atomů vodíku na čtyřech dusíkových atomech cyklamového skeletu za koordinující skupiny (acetáty, acetamidy, deriváty kyselin fosforu atd.) obdržíme v současné době intenzivně zkoumanou skupinu ligandů. Pendantní ramena v polydentálních derivátech cyklamu dodávají těmto ligandům výrazně vyšší selektivitu vůči zvoleným kationtům. Příkladem těchto sloučenin mohou být velmi často používané *H₄teta* (**10**) nebo *H₈tetp* (**14**) (**Obr. 2**). Většina kovových iontů však v komplexech upřednostňuje oktaedrické koordinační okolí. Výše uvedené oktadentální deriváty obsahují tedy více koordinujících atomů, než je nezbytně nutné pro jejich správnou funkci. To má za důsledek snížení kinetické inertnosti jejich komplexů.

Požadavek hexadentátnosti je pro cyklamový skelet splněn u jeho disubstituovaných derivátů. Bylo připraveno a prozkoumáno větší množství ligandů z této skupiny. Ve většině případů se jedná o 1,8-disubstituované („*trans*“) regioizomery vzhledem k výrazně snadnějšímu způsobu přípravy. O 1,4 a 1,11 („*cis*“) regioizomerech je obecně mnohem méně údajů, neboť dosud často neexistuje vhodný způsob jejich syntézy.

3.1.1. Chránění v poloze 1,4^[32]

Chránění v poloze 1,4 patří mezi méně běžné. V současné době je známo pouze několik derivátů cyklamu s touto konfigurací. Příkladem může být příprava *1,4-dibenzylcyklamu* (**32**) (**Obr. 5**), při níž se využívá templátová syntéza s Ni²⁺ za použití špatně dostupného výchozího *5,8-dibenzyl-1,5,8,12-tetraazadodekanu*.^[33] Další možností je syntéza *2,3-dioxocyklamu* (**7**) (**Obr. 5**) za použití velkého zředění a jeho následná redukce.^[34] Nevýhodou této metody jsou její nízké výtěžky a obvykle problematická redukce makrocyclických amidů. Více úspěšné je použití oxalylového chránění.^[32] Jeho nevýhodou jsou ale velmi tvrdé podmínky pro odchránění (var v koncentrovaném NaOH). Čtvrtou možností pro 1,4 chránění může být použití dichloridu kyseliny fenylothiofosfonové jako chránícího činidla za vzniku sloučeniny **34** (**Obr. 5**).^[32]



Obrázek 5: Příklady 1,4 chránění cyklamu

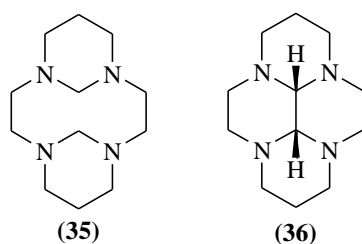
3.1.2. Chránění v poloze 1,8^[35]

Pro přípravu 1,8-regioizomerů bylo vyvinuto několik rozdílných způsobů chránění. První z nich spočívá v řízené tosyloaci, která za vhodně zvolených podmínek vede k 1,8-regioselektivnímu produktu.^[36] Nevýhodou této metody je nutnost velmi tvrdých podmínek při následném odchránění.

Další cesta k 1,8-difunkcionalizovaným derivátům vede přes *2,9-dioxocyklam (7)* (**Obr. 2**). Amidoskupiny totiž nejsou za běžných podmínek substituovatelné. Elektrofilní reagenty proto selektivně reagují s atomy dusíku aminoskupin. Tento přístup zvolili Tomalia et al., kteří cyklizací methylakrylátu s ethylendiaminem připravili *2,9-dioxocyklam (7)*, který lze po substituci v polohách 1,8 redukovat s pomocí jemných redukčních činidel ($\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$), díky čemuž je možné zavádět i citlivější funkční skupiny.^[37]

Velmi zajímavým způsobem chránění je využití bis(aminalu) se dvěma methylenovými můstky (**35**) (**Obr. 6**), který lze připravit reakcí *cyklamu (5)* v dichlormethanu za refluxu s NaOH ^[38] nebo reakcí *cyklamu* s vodným roztokem formaldehydu za laboratorní teploty.^[39]

Obdobou tohoto způsobu je použití *cis*-bis(aminalu) s glyoxalovým můstkem (**36**) (**Obr. 6**), jenž vzniká reakcí *cyklamu (5)* s glyoxalem v acetonitrilu.^[40] („*cis*“ určuje vzájemnou polohu vodíkových atomů glyoxalaminálního můstku). Alkylace využívající tohoto můstku je velmi regioselektivní. Bis-kvarternizace je totiž možná ze sterických a nábojových důvodů pouze do poloh *trans*. Odštěpení můstku je prováděno při laboratorní teplotě mícháním s 10% vodným roztokem NaOH po několik hodin.



Obrázek 6: Příklady 1,8 chránění cyklamu

3.1.3. Chránění v poloze 1,11

Chránění cyklamu v poloze 1,11 je ze všech tří možných izomerů nejproblematictější. Dosud bylo publikováno jen velmi málo prací, které tohoto chránění využívají. Dvě nejdůležitější jsou shrnuty ve **Schématu 1**. Jako první možnost chránění lze uvést zavedení methylenového můstku pomocí dichlormethanu a (*N,N*-diethylamino)tributylstannanu (**37**).^[41]

Druhou možností, užitou v této bakalářské práci, je použití dimethylacetalu (*N,N*-dimethyl)formamidu, který reaguje s cyklamem za vzniku formamidiniové soli (**I**).^[42] Dalším krokem syntéz využívajících tato chránění bývá typicky substituce volných aminových dusíků benzylovými skupinami nebo skupinou *t*-butyloxykarbonylovou (Boc) a následné odbourání původního málo stabilního můstku.^[41,42]

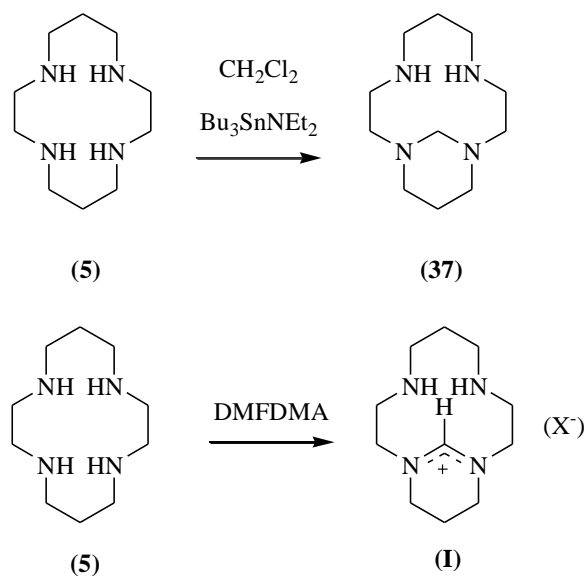
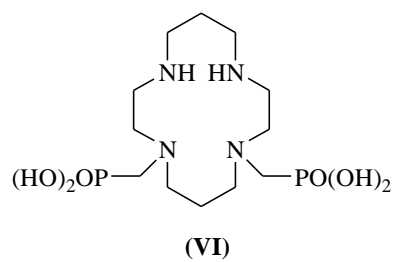
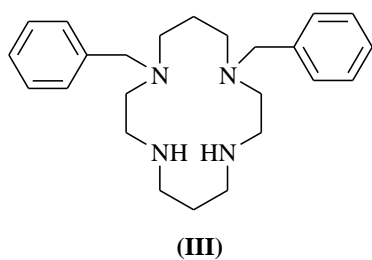


Schéma 1: Možné způsoby 1,11 chránění cyklamu

3.2. Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je:

- Optimalizovat postup přípravy látky **III** tak, aby mohla být použita v definované formě pro další syntézy
- Nalézt způsob přípravy látky **VI**



4. Experimentální část

4.1. Seznam použitých chemikálií*

benzylbromid, 96%	Aldrich
cyklam, čistý.....	připraveno staršími kolegy podle literatury ^[43]
dimethylformamid dimethylacetal (DMFDMA), 95%	Acros Organics
hydrogenuhličitan sodný	
hydroxid sodný, čistý	
hydrid vápenatý, čistý.....	Fluka
kyselina bromovodíková, 48% vodný roztok	Penta
kyselina chlorovodíková, 36% vodný roztok.....	Penta
kyselina octová	Penta
ninhydrin, 0,5% ethanolický roztok	
Pd/C, 10%.....	Aldrich
paraformaldehyd, <i>odfiltrovaný ze starých roztoků formalínu</i>	
triethylfosfit, 95%.....	Fluka
uhličitan draselný	
uhličitan vápenatý	
vodík, 3.0.....	Linde
Použitá rozpouštědla:	
acetonitril.....	Penta
amoniak, 25% vodný roztok	Penta
diethylether	Penta
ethanol denaturovaný	lihovar Kolín
chloroform	Penta
voda, deionizovaná.....	PřF UK

* *Není-li uvedeno jinak, chemikálie jsou od firmy Lachema (Lach Ner) v čistotě p.a.*

Použitá deuterovaná rozpouštědla:

D₂O, 99,95 % Chemotrade

CDCl₃, 99,8 %..... Aldrich

4.2. Metody charakterizace

4.2.1. Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Měření spekter ¹H, ¹³C a ³¹P bylo provedeno na přístrojích Varian^{UNITY} INOVA 400 (PřF UK) a VNMRS300 (PřF UK). Rezonanční frekvence a standardy pro referenci jsou uvedeny v **Tabulce 3**. Všechny uváděné hodnoty chemických posunů δ jsou v jednotkách ppm, interakční konstanty J v Hz. Hodnoty chemických posunů jsou uváděny u ¹H na dvě desetinná místa, posuny signálů ¹³C a ³¹P na jedno desetinné místo.

Měřené jádro	Rezonanční frekvence (MHz)		Standardy
	INOVA 400	NMRS300	
¹ H	399,95	299,94	TMS ($\delta = 0,00$)
¹³ C	100,6	75,4	TMS ($\delta = 0,00$); CDCl ₃ ($\delta = 77,0$)
³¹ P	161,9	121,4	H ₃ PO ₄ 85% aq. ($\delta = 0,00$)

Tabulka 3: Měřená jádra, jejich rezonanční frekvence a použité standardy NMR

Spektra byla měřena Mgr. Zuzanou Kotkovou, RNDr. Vojtěchem Kubíčkem, Ph.D., RNDr. Janem Plutnarem, Ph.D., Bc. Jakubem Šimečkem nebo Mgr. Tomášem Vithou. Údaje pro konkrétní měření jsou uvedeny u příslušných látek v syntetické části.

4.2.2. Hmotnostní spektroskopie (MS)

Hmotnostní spektra byla měřena RNDr. Vojtěchem Kubíčkem, Ph.D. nebo Mgr. Tomášem Vithou na přístroji Bruker ESQUIRE 3000 umožňujícím ionizaci elektrosprejem a vybaveným iontovou pastí. Při měření byla získána spektra kladných i záporných iontů. Uvedeny jsou signály molekulového iontu, které se podařilo interpretovat.

4.2.3. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

K tenkovrstvé chromatografii byly použity destičky typu *Silufol*[®] (*Kavalier*) se sorbentem Silpearl (širokoporézní silikagel) naneseným na hliníkové fólii se škrobem jako pojivem. Příslušné mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých látek individuálně. Detekce byla prováděna 0,5% ethanolickým roztokem ninhydrinu.

4.2.4. Elementární analýza

Obsah uhlíku, vodíku, dusíku a chloru byl stanovován Mgr. Romanou Svitákovou v Ústavu makromolekulární chemie AVČR v Praze na automatickém analyzátoru Perkin Elmer 2400. Všechny uvedené hodnoty jsou v hmotnostních procentech.

4.3. Syntéza výchozích látek a ligandů

Sloučeniny, které byly cílem této bakalářské práce, jsou uvedeny ve **Schématu 2** a značeny v celém textu římskými číslicemi.

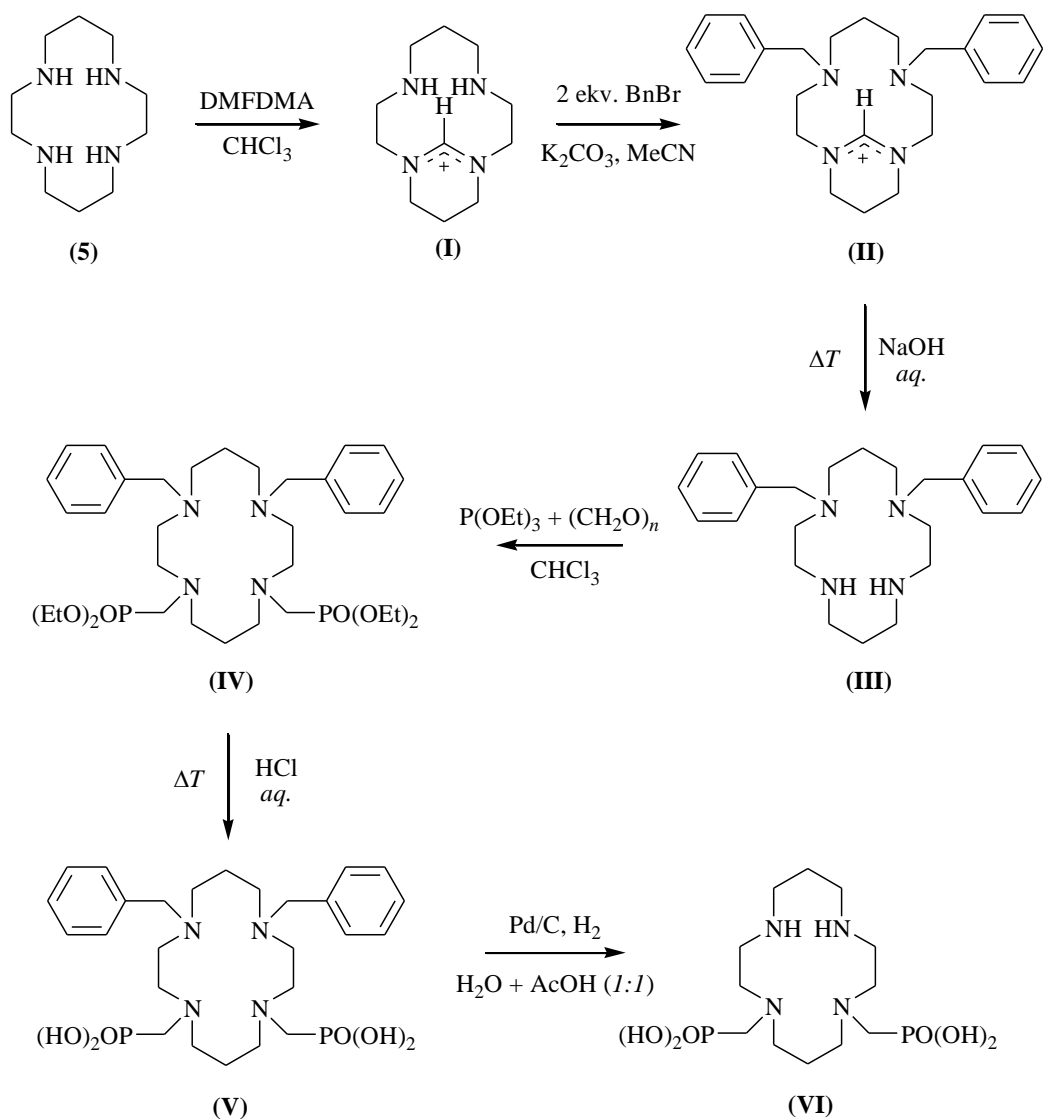


Schéma 2: Schéma syntézy ligandu VI

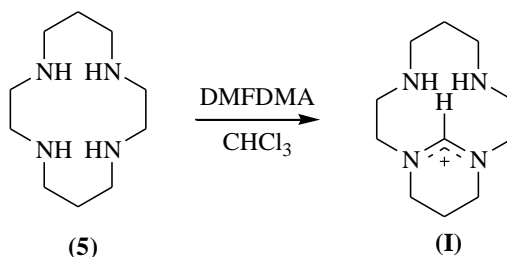
V níže uvedeném textu se pod pojmem „odpaření“ rozumí odpaření na rotační vakuové odparce (RVO). Teplota lázně se lišila v závislosti na odpařovaném rozpouštědle. Orientační teploty lázně jsou uvedeny v **Tab. 4**.

Tabulka 4: Orientační teplota lázně RVO pro různé druhy rozpouštědel

Rozpouštědlo	teplota lázně (°C)
Et ₂ O	40
CHCl ₃	45
Reakční směs obsahující H ₂ O	60
Ostatní použitá rozpouštědla	50–55

Pojmem „amoniak (NH₃)“ je v následujícím textu použit jako označení pro jeho 25% vodný roztok. Pojmem „teplota“ je myšlena teplota olejové lázně, ve které byla baňka reakční směs ponořena.

4.3.1. Příprava látky I



Cyklam (**5**) (2,0 g, 10,0 mmol) byl převeden do 50 ml baňky a poté k němu byl přidán CHCl₃ (5 ml, bezvodý) a DMFDMA (95%, 1,30 g, 1,0 ekv.). Na baňku byl nasazen zpětný chladič se sušící trubičkou s CaCl₂. Reakční směs byla postupně zahřívána za stálého míchání na olejové lázni. Při teplotě 80 °C došlo k rozpuštění doposud pevného cyklam (**5**) na žlutou kapalinu. Teplota byla poté zvýšena na 85 °C a směs nechána za mírného varu reagovat přes noc.

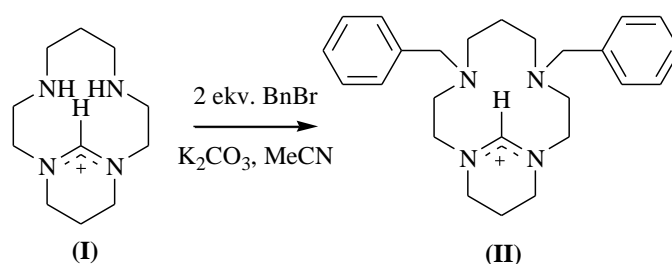
Druhý den byl přidán další DMFDMA (0,25 g, 0,2 ekv.) a směs byla ponechána do dalšího dne při teplotě 80 °C doreagovat. Následujícího dne byla aparatura se směsí ochlazena na 50 °C a za stálého míchání opatrně připojena přes chladič zábrusem na vakuovou pumpu. (Odpárování je třeba provádět v digestoři, s nasazeným ochranným štítem, neboť hrozí zvýšené riziko imploze!) Po odpaření nadbytečných rozpouštědel se reakční směs v podobě žlutohnědé viskózní kapaliny přeměnila na hnědooranžovou pevnou hmotu. Odpařování bylo ukončeno v okamžiku, kdy ve směsi zatuhlo magnetické míchadlo. Po vychladnutí byl přidán MeCN (15 ml, bezvodý) a v něm byla směs 1 h refluxována pod zpětným chladičem a poté nechána přes noc odstát. Z roztoku byl poté odfiltrován vysrážený nezreagovaný cyklam (**5**)

(0,05 g). Filtrát byl odpařen na RVO do sucha. Bylo získáno 1,95 g produktu (92 % t.v.) ve formě hygroskopického medově hnědého viskózního oleje, který byl ihned použit jako výchozí látka pro další reakci.

Charakterizace:

MS: 211,1 ($[M]^+$)

4.3.2. Příprava látky II

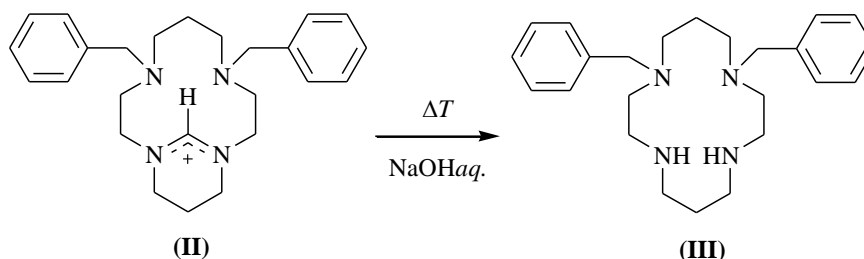


K látce **I** (1,95 g, 9,2 mmol) v 50 ml baňce byl přidán MeCN (15 ml) a benzylbromid (3,47 g, 2,2 ekv.). Po rozpuštění byl přisypán ve velkém nadbytku K_2CO_3 (12,8 g, 10 ekv.). Směs byla 2 dny míchána za laboratorní teploty. Stupeň konverze byl průběžně kontrolován pomocí MS. Po úplném doreagování byla reakční směs rozpuštěna v EtOH a filtrací přes jemnou fritu zbavena zbytků uhličitany. Následným odpařením byly odstraněny zbytky většiny přítomných rozpouštědel. Produkt byl izolován jako oranžovohnědý viskózní olej o hmotnosti 2,93 g (81 % t.v.).

Charakterizace:

MS: 391,3 ($[M]^+$)

4.3.3. Příprava látky III



K látce **II** ve 250ml baňce byl za laboratorní teploty přidán EtOH (25 ml) a po rozpuštění za intenzivního míchání a chlazení postupně i vodný roztok NaOH (25 ml, 10M). Po několika minutách bylo k reakční směsi přilito přesně tolik H₂O, aby se spojila vzniklá organická a vodná fáze. Reakční směs byla intenzivně míchána za laboratorní teploty přes víkend k zajištění kompletní hydrolyzy zbytků benzylobromidu.

Po dvou dnech míchání byla směs postavena na olejovou lázeň a pod zpětným chladičem za stálého míchání intenzivně zahřívána přes noc (16 h). Následující den byla reakční směs po ochlazení vytřepána CHCl₃ (3×30 ml) a odpařena do sucha. (První frakce je kvůli přítomnému EtOH lehčí, než roztok hydroxidu.) Odparek byl znovu rozpuštěn v CHCl₃ (30 ml) a poté vytřepán vodným roztokem NaOH (50 ml, 5%) za účelem odstranění zbytků solí. Opětovným odpařením byl získán hnědozlatý viskózní olej, který byl přečištěn pomocí chromatografie na koloně SiO₂ (3×20 cm). Jako mobilní fáze byla použita směs NH₃:EtOH s gradientem (1:20–1:5). (Produkt byl eluován z kolony při poměru 1:10)

Izolovaný produkt **III** byl převeden do 250 ml baňky, rozpuštěn ve vodné HCl (15%) a odpařen do sucha. Poté byl opět rozpuštěn v minimálním množství H₂O a postupně vysrážen přidáváním acetonu jako hydrochlorid ve formě bílé, mikrokrystalické sraženiny. Sraženina hydrochloridu **III** byla odsáta na jemné fritě a vysušena v exsikátoru evakuovaném membránovou pumpou nad P₂O₅. Bylo získáno 1,52 g (36,7 % t.v.) hydrochloridu látky **III**.

Charakterizace:

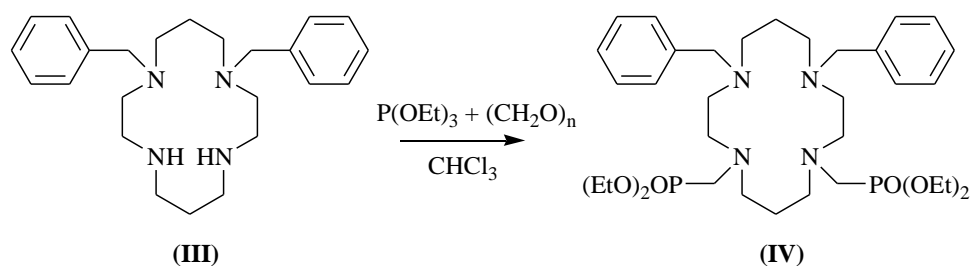
MS: 381,3 ([M+H]⁺)

TLC: mobilní fáze: NH₃:EtOH (1:10), R_f = 0,48

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno) pro **III**·4 HCl·1,5 H₂O, C₂₄H₄₃Cl₄N₄O_{1,5}

C 52,82 (52,08), H 7,71 (7,83), N 10,27 (10,12), Cl 25,71 (25,62)

4.3.4. Příprava látky IV



Látka **III** (1,3 g, 3,4 mmol) v 50 ml baňce byla rozpuštěna v CHCl_3 (2 ml) a po přidání triethylfosfitu (5,7 g, 10 ekv.) byl ke směsi přidán pevný paraformaldehyd (0,3 g, 3 ekv.). Směs byla míchána 3 dny při 60 °C. Poté byla na 2 dny teplota zvýšena na 65 °C.

Po ochlazení byla reakční směs zředěna 5 ml EtOH a přefiltrována přes fritu S3. Pevné zbytky formaldehydu zachycené na fritě byly promyty malým množstvím EtOH. Filtrát byl nanesen na kolonu se silným kationtovým iontoměničem (Dowex 50) v H^+ -cyklu. Kolona byla vypláchnuta velkým množstvím (cca 500 ml) směsi $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ (1:1). Produkt byl z kolony vymyt roztokem $\text{NH}_3:\text{EtOH}$ (1:5). Po odpaření roztoku obsahujícího směs produktů na RVO byla provedena sloupcová chromatografie na koloně SiO_2 (3×20 cm). Jako mobilní fáze byla použita směs $\text{NH}_3:\text{EtOH}$ s gradientem (1:25–1:8). Produkt **IV** byl eluován z kolony při poměru 1:15 a byl izolován ve formě zlatohnědého oleje o hmotnosti 0,65 g (28 % t.v.), který byl ihned použit pro následující reakci.

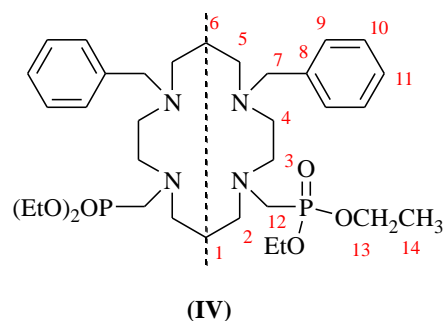
Charakterizace:

MS: 381,3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

LC: mobilní fáze: $\text{NH}_3:\text{EtOH}$ (1:10), $R_f = 0,75$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,1–1,2 (**H14**, t, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6,8$); 1,5–1,7 (**H1**, **H6**, m, 4H); 2,39 (**H2**, t, 4H); 2,50 (**H5**, t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$); 2,7–2,8 (**H3**, **H4**, **H12**, m, 12H); 3,46 (**H7**, s, 4H); 3,98 (**H13**, pseudo p., 8H, $^3J_{\text{HH}} = ^3J_{\text{HP}} = 7,2$); 7,1–7,3 (**H9**, **H10**, **H11**, m, 10H)

$^{13}\text{C-NMR}$: 16,4 (**C14**, d, 4C, $^3J_{\text{CP}} = 5,7$); 23,5 (**C6**, s, 1C); 24,0 (**C1**, s, 1C); 50,0 (**C12**, d, 2C, $^1J_{\text{CP}} = 109,4$); 50,3 (**C4**, s, 2C); 50,9 (**C5**, s, 2C); 51,5 (**C2**, d, 2C, $^3J_{\text{CP}} = 6,8$); 52,5 (**C3**,

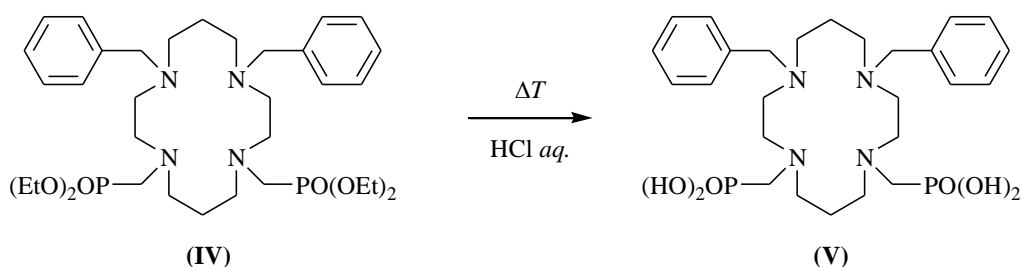


d, 2C, $^3J_{CP} = 7,6$); 59,0 (C7, s, 2C); 61,7 (C13, d, 4C, $^2J_{CP} = 6,8$); 126,7 (C11, s, 2C); 128,0 (C9, s, 4C); 128,9 (C10, s, 4C); 139,4 (C8, s, 2C);

$^{31}\text{P-NMR}$: (CDCl_3): 26,61 (s)

$^{31}\text{P-NMR}\{^1\text{H}\}$: (CDCl_3): 26,61 (m, $^2J_{HP} = 8,4$)

4.3.5. Příprava látky V



Reaktant **IV** byl rozpuštěn ve 100 ml vodné 15% HCl a kvantitativně převeden do 250ml baňky. Směs byla 2 dny refluxována pod zpětným chladičem. Poté byla odpařena do sucha, opět rozpuštěna ve 100 ml vodné 15% HCl a ponechána přes noc refluxovat pod zpětným chladičem.

Reakční směs byla odpařena na RVO a zbytek byl nanesen na kolonu s kationtovým iontoměničím v H^+ -cyklu (Dowex 50). Kolona byla promyta roztokem $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ (1:1). Zachycený produkt byl z kolony vymyt roztokem $\text{NH}_3:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:5:5), odpařen na RVO a izolován ve formě nažloutlého oleje.

K produktu **V** byla přidána vodná HCl (4 ml, konc.) a EtOH (35 ml). Směs byla míchána 5 dní za laboratorní teploty. Vzniklé bílé mikrokrystalky hydrochloridu sloučeniny **V** byly na jemné fritě odfiltrovány z roztoku a poté ponechány vyschnout v exsikátoru nad P_2O_5 . Hmotnost hydrochloridu produktu **V** po vysušení činila 0,31 g.

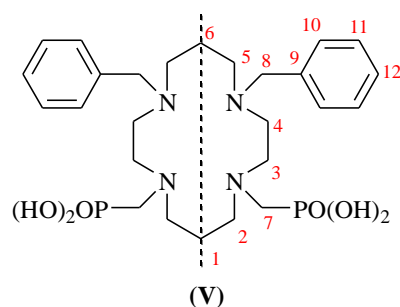
Charakterizace:

MS: 567,3 ($[\text{M}-\text{H}]^-$)

$^1\text{H-NMR}$: (D_2O , ref. = *t*-BuOH = 1,25): 2,05 (H1, t, 2H,

$^3J_{\text{HH}} = 6,4$); 2,23 (H6, t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6,8$); 3,14 (H7, d, 4H,

$^2J_{\text{HP}} = 12,0$); 3,1–3,4 (H2, H5, m, 8H); 3,4–3,7 (H3, H4,

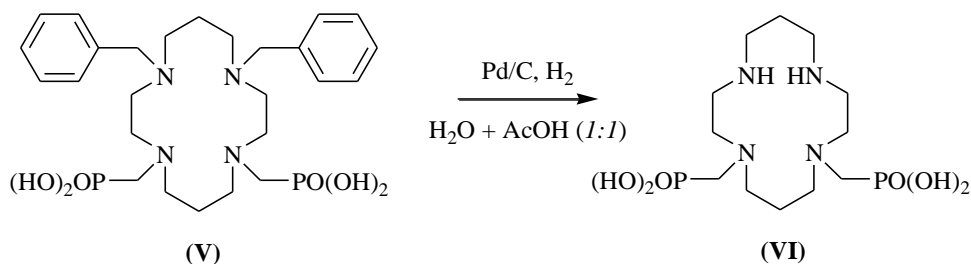


m, 8H); 4,41 (H8, s, 2H); 7,4–7,7 (H10, H11, H12, m, 10H)

³¹P-NMR: 14,57 (bs)

³¹P-NMR{¹H}: 14,57 (bs)

4.3.6. Příprava látky VI



Hydrochlorid ligandu **V** (0,31 g) byl převeden do hruškové baňky a rozpuštěn v 8 ml směsi *AcOH:H₂O* (1:1). Ke směsi bylo přidáno palladium na aktivním uhlí (12,5 mg, 10%). Po přidání míchadla byl vzduch z baňky odstraněn vypláchnutím argonem a na její hrdlo byl připojen balonek naplněný H₂. Reakční směs byla 2 dny intenzivně míchána ve vodíkové atmosféře a poté bylo aktivního uhlí odstraněno přefiltrováním směsi přes jemnou fritu.

Po odpaření směsi na RVO byl produkt rozpuštěn v H₂O a nanesen na silný kationtový iontoměnič v H⁺-cyklu (Dowex 50) a poté promyt větším množstvím H₂O. Zachycený produkt byl z kolony vymyt směsí *NH₃:H₂O* (1:5). Produkt **VI** byl přečištěn chromatografií na koloně slabého kationtového iontoměniče v H⁺-cyklu (Amberlit 50) (3×25 cm) elucí H₂O a následně izolován ve formě žlutého oleje o hmotnosti 0,10 g (49 % t.v.).

Produkt **VI** jako volnou kyselinu v krystalické podobě se připravit přes veškerou snahu nepodařilo. Lze jej však poměrně snadno izolovat jako hydrochlorid nebo hydrobromid v podobě jemných dendritických krystalů vysrážením jeho směsi s vodnou kyselinou chlorovodíkovou, resp. bromovodíkovou přidávkem nadbytku lihu.

Charakterizace:

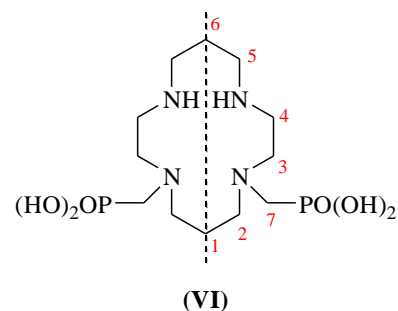
MS: 389,1 ([M+H]⁺)

TLC: mobilní fáze: *i*-PrOH:NH₃:H₂O (7:3:3), R_f = 0,30

¹H-NMR: (D₂O, ref. = *t*-BuOH = 1,25): 1,95 (H1, p, 2H,

³J_{HH} = 6,0); 2,04 (H6, p, 2H, ³J_{HH} = 6,0); 2,96 (H7, p, 4H,

²J_{HP} = 11,4); 3,0–3,3 (H2, H3, H4, H5, m, 16H)



$^{31}\text{P-NMR}$: (D_2O): 16,27 (s)

$^{31}\text{P-NMR}\{^1\text{H}\}$: (D_2O): 16,27 (s)

5. Diskuze

Sloučeniny, které byly připraveny během tohoto bakalářského studia, jsou včetně naznačeného způsobu přípravy uvedeny v orientačním **Schématu 2**.

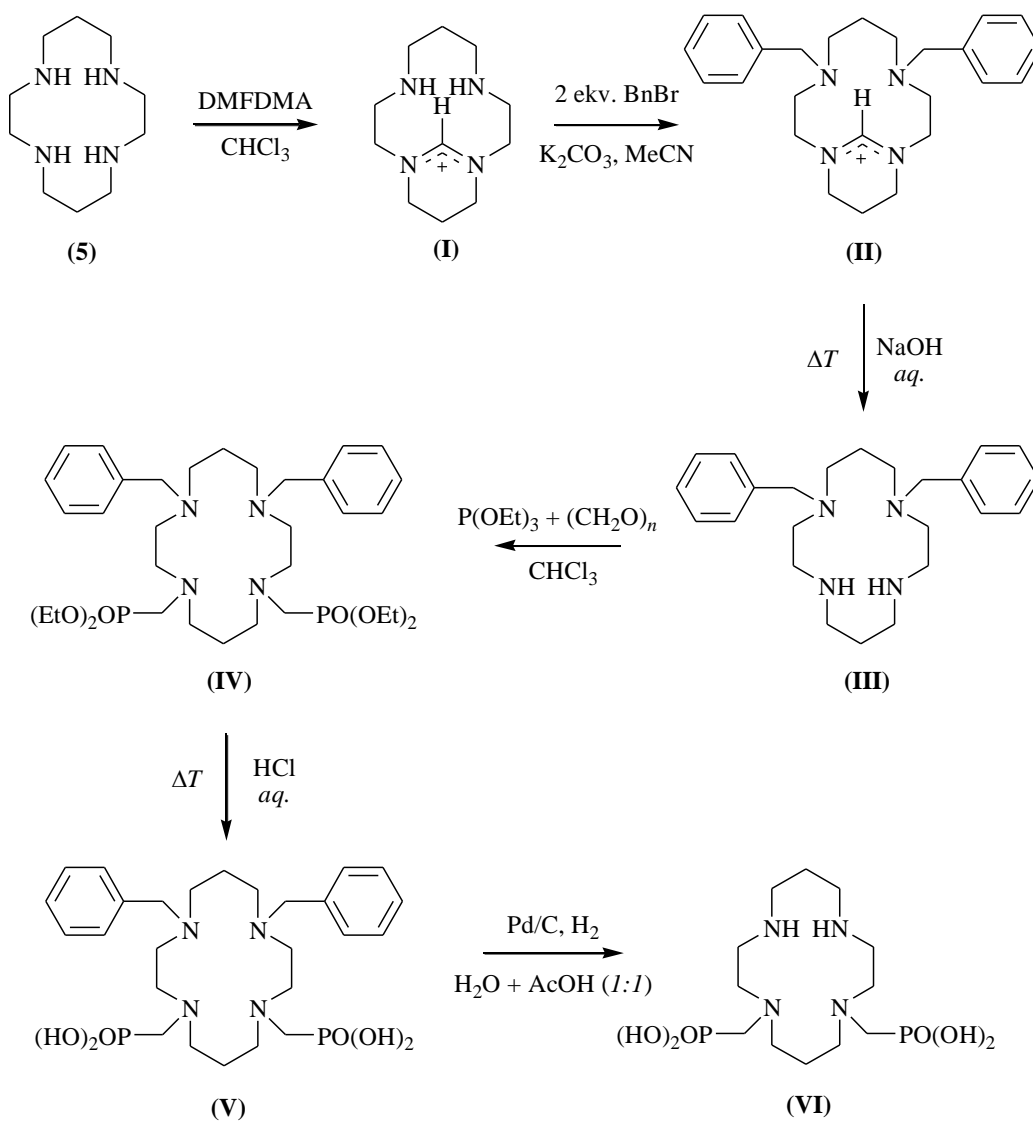


Schéma 2: Schéma syntézy ligandu **VI**

Látky **I**, **II** a **III** byly připravovány podle modifikovaného postupu popsaného v dizertační práci P. J. Daviese.^[44] Jejich identifikace pomocí MS proto byla spíše orientační a sloužila pro kontrolu správného průběhu již dříve popsaného způsobu jejich přípravy.

5.1.1. Příprava látky I

Pro přípravu této látky se ukázalo jako zcela klíčové použití kvalitně vysušených rozpouštědel. Předchozí pokusy za použití běžných rozpouštědel nevedly k požadovanému produktu. CHCl_3 použitý v této reakci byl sušen podle návodu^[45] pomocí P_2O_5 a následně oddestilován do zábrusové baňky. MeCN byl dle návodu sušen pomocí CaH_2 a poté oddestilován do zábrusové baňky.^[45]

Nestandardní postup odpařování nadbytečného rozpouštědla byl zvolen na základě předchozích zkušeností s velmi problematickým odpařováním této viskózní směsi na RVO. Jeho rizikovitost je vyrovnána elegancí této metody, nižšími ztrátami produktu a zrychlením celé přípravy.

Následné rozpouštění směsi v bezvodém MeCN je prováděno z důvodu nerozpustnosti výchozího cyklamů (**5**) v tomto rozpouštědle. Jednoduchou filtrací je tedy možno produkt od nezreagovaného cyklamů (**5**) snadno oddělit. Výtěžek látky **I** je odhadnut na základě hmotnosti nepřečištěného produktu, a je proto nadhodnocen. Dle literatury probíhá reakce v mírném nadbytku DMFDMA s výtěžkem 75 %.^[44]

5.1.2. Příprava látky II

Podobně jako v předchozí reakci je i zde klíčové dobré vysušení použitého MeCN. Zbytky cyklamů (**5**) by v tomto kroku vedly k 1,4,8,11-tetrabenzylcyklamů (**IIIb**) jako vedlejšímu produktu. Je tedy nutné jeho zbytky v předchozím kroku důkladně odstranit. Benzylbromid je vhodné použít v mírném nadbytku.

Průběh reakce se dá velmi pohodlně sledovat pomocí MS. Po dvou dnech míchání již nebyly patrné žádné jiné signály, mimo signál vzniklého produktu.

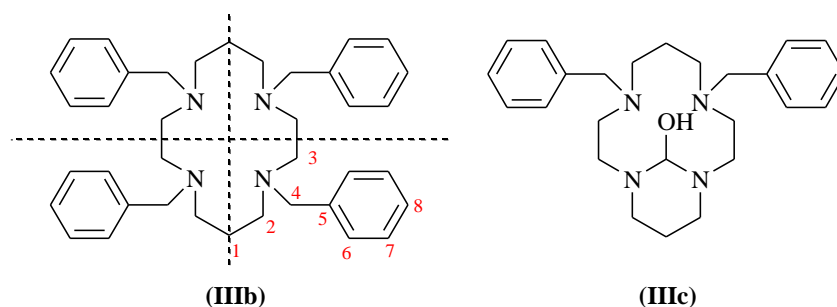
Čištění a přesné zjištění výtěžku reakce je z důvodu chemických vlastností produktu problematické, a proto nebylo provedeno. Výtěžek je stanoven na základě hmotnosti čerstvě odpařeného produktu **II**.

5.1.3. Příprava látky III

Odbourávání můstku pomocí varu s 10M vodným NaOH bylo zvoleno na základě předchozí zkušenosti s inertností můstku vůči působení 6M HCl. Tento způsob je komplikován velmi špatnou rozpustností látky **II** ve vodných roztocích. Je tedy nutno použít směsi EtOH a H₂O. Přesto jeví reakce tendenci probíhat při vyšších teplotách heterogenně ve dvou fázích.

Z neznámých příčin také za těchto podmínek dochází ke vzniku tri- a tetrabenzylcyklamu. Tetrabenzylcyklam (**IIIb**) byl izolován ve formě žlutých krystalků v první chromatografické frakci po odpaření rozpouštědla a prokázán pomocí TLC, MS a NMR; **TLC**: mobilní fáze: *NH₃:EtOH (1:10)*, *R_f = 1*; **MS**: 561,4 ([M+H]⁺) **¹H-NMR**: (CDCl₃): 1,68 (**H1**, p, 4H, ³*J*_{HH} = 6,0); 2,4–2,5 (**H2**, **H3**, m, 16H); 3,38 (**H4**, s, 8H); 7,1–7,2 (**H6**, **H7**, **H8**, m, 20H) **¹³C-NMR**: (CDCl₃): 23,7 (**C1**, s, 2C); 50,4 (**C3**, s, 4C); 51,4 (**C2**, s, 4C); 59,4 (**C4**, s, 4C); 126,6 (**C8**, s, 8C); 128,0 (**C6**, s, 8C); 128,9 (**C7**, s, 8C); 140,0 (**C5**, s, 4C).

Pro vyloučení vlivu zbytkového benzylbromidu z předchozí reakce, byl roztok míchán nejprve dva dny při laboratorní teplotě za účelem hydrolyzy BnBr a teprve poté tři dny za intenzivního varu refluxován. Pomocí TLC a následnou izolací při chromatografii byl zjištěn také vznik většího množství vedlejšího produktu s ne zcela objasněnou strukturou s předpokládaným strukturálním vzorcem látky **IIIc**. (MS:409,3 ([M+H]⁺), TLC: mobilní fáze: *NH₃:EtOH (1:10)*, *R_f = 0,85*).



Obrázek 7: Vedlejší produkty vznikající při syntéze látky **III**

Z důvodu těchto vedlejších produktů, ztrátám při vytřepávání reakční směsi do CHCl₃, dvojnásobné chromatografii a následné krystalizaci je odhadovaný výtěžek pouze přibližně 37 %. Tento krok syntézy se jeví jako problematický, a proto by bylo vhodné se pokusit v budoucnu najít vhodnější způsob odstranění formamidiniového můstku.

5.1.4. Příprava látky IV

Při přípravě látky **IV** je použita typická Mannichova reakce v bezvodém prostředí, která má za vyšších teplot sklon v přítomnosti redukujících činidel probíhat jako redukční methylace na atomu dusíku příslušného aminu.^[46] Je proto nutné držet zpočátku teplotu na 60 °C, při které ještě není přeměna na tento vedlejší produkt preferovaná a reakce při ní již probíhá dostatečnou rychlostí. Pomocí NMR bylo zjištěno, že reakce probíhá do prvního stupně poměrně rychle. Při návázání druhé methylfosfonové skupiny však dochází k výraznému zpomalení.

Byla také zjištěna závislost průběhu reakce na druhu použitého paraformaldehydu. Jako vhodný se ukázal paraformaldehyd odfiltrovaný ze starých roztoků formalínu.

5.1.5. Příprava látky V

Hydrolyza ethylesterů derivátu **IV** na volnou kyselinu probíhá za varu v prostředí vodné HCl (15%) poměrně rychle. Z důvodu posunutí reakční rovnováhy ve prospěch produktu byla reakční směs zbavena EtOH uvolněného v průběhu hydrolyzy odpařením na RVO a opětovným rozpuštěním v nové HCl. Samotná izolace hydrochloridu látky **V** je relativně pomalá a nejspíše neprobíhá zcela kvantitativně.

5.1.6. Příprava látky VI

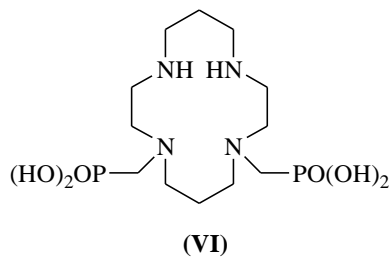
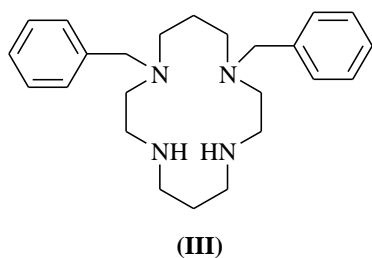
Pro debenzylaci byla zvolena všeobecně používaná přímá hydrogenace za atmosférického tlaku. Debenzylace je prováděna v hruškovité baňce s velkou plochou hladiny z důvodu zvýšení rychlosti přestupu H₂ do roztoku. Ze stejného důvodu je do roztoku přidávána i kyselina octová. Průběh reakce lze snadno sledovat pomocí TLC nebo NMR.

Oproti výrazným komplikacím při debenzylaci 1,4 regioizomeru^[46] probíhá debenzylace látky **V** poměrně snadno s relativně vysokým výtěžkem. K menším ztrátám dochází až při finálním čištění produktu **VI** pomocí silného a slabého kationtového iontoměničce a při následné izolaci ve formě hydrochloridu.

6. Závěr

V rámci této bakalářské práce:

- Bylo připraveno 6 látek, z toho 3 zcela nové
- Byla optimalizována příprava a izolace látky **III** v podobě vhodné pro další reakce
- Byla nalezena syntetická cesta k látce **VI**, poslednímu doposud nepřipravenému regioizomeru látky *H₄te2p*



7. Seznam zkratek

bipy.....	2,2'-bipyridin
AcOH	kyselina octová
BnBr	benzylbromid
Boc	<i>terc</i> -butyloxykarbonyl
BTS.....	bis(thiosemikarbazony)
Bu ₃ SnNEt ₃	(<i>N,N</i> -diethylamino)tributylstannan
DMFDMA.....	dimethylacetal (<i>N,N</i> -dimethyl)formamidu
en.....	ethylendiamin
EtOH.....	ethanol
EZ.....	elektronový záchyt
GIT	gastrointestinální trakt
<i>i</i> -PrOH.....	propan-2-ol
keV	kiloelektronvolt (1 eV = 1,602 176 53 · 10 ⁻¹⁹ J)
LFSE.....	ligand field stabilisation energy (stabilizační energie ligandového pole)
mCi	milicurie (1 mCi = 3,7 · 10 ⁷ „rozpadů“ s ⁻¹)
MeCN.....	acetonitril
MS.....	hmotnostní spektrometrie
NMR.....	nukleární magnetická rezonance
PET.....	positron emission tomography (pozitronová emisní tomografie)
<i>R</i> _f	retardační faktor
RVO	rotační vakuová odparka
SPECT.....	single photon emission computed tomography (jednofotonová emisní počítačová tomografie)
<i>t</i> _{1/2}	poločas rozpadu
<i>t</i> -BuOH.....	2-methylpropan-2-ol
TLC	thin layer chromatography (chromatografie na tenké vrstvě)
t.v.....	teoretický výtěžek

8. Poděkování

Děkuji svým rodičům za jejich všestrannou podporu a finanční zázemí, díky kterému můžu nerušeně studovat.

Děkuji svému školiteli dr. Janu Kotkovi za jeho připravenost být mi kdykoliv nápomocen s řešením chemických problémů, s luštěním spekter a v otázkách základní gramatiky a pokročilé typografie. Také bych mu chtěl poděkovat za jeho nakažlivý optimismus v „Honzo-ach-jo-koukej-co-to-zase-udělalo“ okamžicích.

Děkuji dr. Pavlovi Vojtíškoví za ochotu mou práci oponovat.

Děkuji Mgr. Zuzaně Kotkové, dr. Vojtěchu Kubíčkoví, dr. Janu Plutnarovi, Bc. Jakubu Šimečkovi a Mgr. Tomášovi Vithovi za měření spekter všeho druhu.

Děkuji doc. Petru Hermannovi velké množství podnětných rad.

Děkuji všem, kteří byli ochotni si tuto práci přečíst a opravit množství chyb v ní přítomných.

Děkuji také celému osazenstvu laboratoře „19“ a přilehlých místností za přátelský přístup vůči mé osobě a jejich překvapivou schopnost přežít ve zdraví důsledky mé experimentální činnosti.

Závěrem bych chtěl poděkovat také všem mým kamarádkám a kamarádům, kteří na mě měli během tří let studia veskrze pouze pozitivní vliv a kterým vděčím za to, že jsem se s nimi během této doby rozhodně nikdy nenudil.

9. Použitá literatura

- [1] W. Loveland, D. J. Morrissey, G. T. Seaborg, *Modern Nuclear Chemistry*, WILEY-INTERSCIENCE, New Jersey, **2006**
- [2] V. Ulmann, AstroNuklFyzika, cit. 25. 8. 2008, Dostupné na <<http://astronuklfyzika.cz/>>
- [3] C. J. Anderson, M. J. Welch; *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2219–2234
- [4] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie prvků*, Informatorium, Praha, **1993**
- [5] J. Rejzek, *Český etymologický slovník*, LEDA, **2001**
- [6] H. Remy, *Anorganická chemie*, SNTL, Praha, **1971**
- [7] J. O. Noyce, H. Michels, C. W. Keevil, *J. Hosp. Infect.*, **2006**, 3, 289–297
- [8] A. H. Le Jeune, M. Charpin, D. Sargos, J. F. Lenain, V. Deluchat, N. Ngayila, M. Baudu, C. Amblard, *Aquat. Toxicol.*, **2007**, 83, 223–237
- [9] R. B. Heslop, K. Jones; *Anorganická chemie*, SNTL, Praha, **1982**
- [10] Lawrence Berkeley National Laboratory Nuclear Science Division, Isotope Project, cit. 23. 8. 2008, Dostupné na <http://ie.lbl.gov/education/parent/Cu_iso.htm>
- [11] P. J. Blower, J. S. Lewis, J. Zweit; *Nucl. Med. Biol.*, **1996**, 23, 957–980
(Další podrobnější citace jsou obsaženy v rámci tohoto review)
- [12] R. Schwarzbach, K. Zimmermann, P. Bläuenstein, A. Smith, P. A. Schubinger, *Appl. Radiat. Isot.*, **1995**, 46, 329–336
- [13] I. Novak-Hofer, P.A. Schubiger, *Eur. J. Nucl. Med.*, **2002**, 29, 821–830
- [14] S. Makkonen-Craig, *Pro gradu dissertation*, University of Helsinki, Helsinki, **2006**
- [15] P. Karlson, W. Gerok, W. Gross, *Pathobiochemie*, Academia, Praha, **1987**
- [16] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Curr. Pharm. Des.*, **2007**, 13, 3–16
- [17] I. Svobodová, *Diplomová práce*, PřF, Masarykova Univerzita, Brno **2002**
- [18] S. V. Smith, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 1874–1901
- [19] A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants, Amino Acids*, Plenum press, **1974**
- [20] C. S. Cutler, M. Wuest, C. J. Anderson, D. E. Reichert, Y. Sun, A. E. Martell, J. M. Welch, *Nucl. Med. Biol.*, **2000**, 27, 375–380

-
- [21] J. Yoo, D. E. Reichert, M. J. Welch, *Chem. Comm.*, **2003**, 6, 766–767
- [22] P. A. Tasker, L. Sklar, *J. Cryst. Mol. Struct.*, **1975**, 5, 329–341
- [23] S. Fůzerová, J. Kotek, I. Císařová, P. Hermann, K. Binnemans, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, **2005**, 2908–2915
- [24] P. Barbaro, C. Bianchini, G. Capannesi, L. Di Luca, F. Laschi, D. Petroni, P. A. Salvadori, A. Vacca, F. Vizza, *Dalton Trans.*, **2000**, 14, 2393–2401
- [25] L. A. Bass, M. Wang, M. J. Welch, C. J. Anderson, *Bioconjug. Chem.*, **2000**, 11, 527–532
- [26] C. Bianchini, G. Giambastiani, F. Laschi, P. Mariani, A. Vacca, F. Vizza, P. Zanello, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 879–896
- [27] S. V. Smith, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 1874–1901
- [28] X. Sun, M. Wuest, Z. Kovacs, A. D. Sherry, R. Motekaitis, Z. Wang, A. E. Martell, M. J. Welch, C. J. Anderson, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2003**, 8, 217–225
- [29] J. L. J. Dearling, J. S. Lewis, G. E. Mullen, M. J. Welch, P. J. Blower, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**, 7, 249–249
- [30] J. L. J. Dearling, J. S. Lewis, G. E. D. Mullen, M. T. Rae, J. Zweit, P. J. Blower, *Chem. Comm.*, **1998**, 2531
- [31] B. A. Gingras, R. W. Hernal, C. H. Bayley, *Can. J. Chem.*, **1960**, 38, 712–719
- [32] T. Vitha, J. Kotek, J. Rudovský, V. Kubíček, I. Císařová, P. Hermann, I. Lukeš, *Collect. Czech. Chem. Comm.*, **2006**, 71, 337–367
- [33] E. K. Barefield, F. Wagner, K. D. Hodges, *Inorg. Chem.*, **1976**, 15, 1370
- [34] L. Cronin, A. R. Mount, S. Parsons, N. Robertson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1999**, 1925–1927
- [35] T. Vitha, *Diplomová práce*, PřF UK, Praha, **2004**
- [36] J. E. Richman, T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 96, 2268–2270
- [37] D. A. Tomalia, L. R. Wilson, *U. S. Patent*, **1985**, 4, 517, 122
- [38] a) G. Royal, V. Dahaoui-Gindrey, S. Dahaoui, A. Tabard, R. Guilard, P. Pullumbi, C. Lecomte, *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 1971–1975; b) C. Bucher, G. Royal, J.-M. Barbe, R. Guilard, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 2315–2318
- [39] a) E. J. Gabe, Y. Le Page, L. Prasad, G. R. Weisman, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **1982**, B38, 2752–2754; b) R. W. Alder, E. Heilbronner, E. Honegger, A. B. McEwen, R. E. Moss, E. Olefirowicz, P. A. Petillo, R. B. Sessions, G. R. Weisman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 6580–6591

-
- [40] G. R. Weisman, S. C. H. Ho, V. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 335–338
- [41] R. Guillard, A. G. Bessmertnykh, I. P. Beletskaya, *SYNLETT*, **1997**, 1190–1192
- [42] P. J. Davies, M. R. Taylor, K. P. Wainwright, *Chem. Comm.*, **1998**, 827–828
- [43] a) E. K. Barefield, F. Wagner, A. W. Herbinger, A. R. Dahl, *Inorg. Synth.*, **1976**, 17, 220–225; b) I. Meunier, A. K. Mishra, B. Hanquet, P. Cocolios, R. Guillard, *Can. J. Chem.*, **1995**, 73, 685–695
- [44] P. J. Davies, *PhD Thesis*, Flinders University, Adelaide, **2006**
- [45] D. D. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, New York, **1988**
- [46] J. Kotek, *Diplomová práce*, PřF UK, Praha, **1999**