

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Veronika Hlinová

FOSFONÁTOVÉ A FOSFINÁTOVÉ DERIVÁTY
DIPICOLYLAMINU

Phosphonate and Phosphinate Derivates of Dipicolylamine

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

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

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

V Praze dne 17. května 2017.

ABSTRAKT

V rámci této práce byl připraven fosfonátový a dva fosfinátové deriváty dipicolylaminu. Byly stanoveny protonizační konstanty připravených ligandů prostřednictvím potenciometrických a NMR titrací. Koordinační chování látek bylo studováno kombinací potenciometrie a spektrofotometrie v UV–VIS oblasti. Jejich prostřednictvím byly vypočteny konstanty stability s vybranými ionty přechodných kovů – Cu^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} a ionty kovů alkalických zemin – Ca^{2+} , Mg^{2+} . Byly připraveny monokrystaly látek, což umožnilo studium jejich acidobazického a komplexotvorného chování v pevné fázi.

KLÍČOVÁ SLOVA

dipicolylamin, ligandy, potenciometrie, disociační konstanty, komplexy, fosfonáty, fosfináty

ABSTRACT

The Diploma Thesis deals with preparation of one phosphonate and two phosphinate derivatives of dipicolylamine. Dissociation constants of prepared ligands were determined by potentiometric and NMR titration. Coordination properties of the compounds were studied by combination of potentiometry and UV-VIS spectrophotometry. Stability constants of complexes with selected transition metal ions (Cu^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+}) and alkali-earth metals ions (Ca^{2+} , Mg^{2+}) were calculated. Acid-base and coordination properties in the solid state were studied by X-ray diffraction on single-crystals.

KEYWORDS

dipicolylamine, ligands, potentiometry, dissociation constants, complexes, phosphonates, phosphinates

OBSAH

1	Úvod.....	8
1.1	Ligandy obsahující dipicolylaminový motiv	8
1.2	Dipicolylamin jako senzor zinečnatých iontů.....	16
1.3	Komplexace radionuklidů.....	19
1.4	Cíl práce.....	22
2	Experimentální část.....	23
2.1	Použitý materiál a charakterizační metody.....	23
2.2	Syntéza.....	27
2.3	Potenciometrické titrace	35
2.4	Spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti.....	38
2.5	NMR titrace	38
3	Výsledky a diskuze	39
3.1	Syntetická část – základní ligandy.....	39
3.2	Studium acidobazických vlastností.....	42
3.3	Studium koordinačních vlastností.....	47
3.4	Syntetická část – bifunkční ligand	60
4	Závěr	66
5	Použitá literatura	67

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

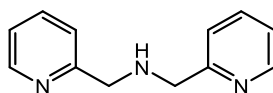
DPA	dipicolylamin
pK_a	disociační konstanta
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PET	pozitronová emisní tomografie
PP_i	pyrofosfát
P_i	anorganický fosfát
ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
NMR	nukleární magnetická rezonance
HA	kyselina hyaluronová
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinadeninmononukleotid
AMP	adenosinmonofosfát
TTP	thymidintrifosfát
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
MRI	tomografie magnetické rezonance
PET	pozitronová emisní tomografie
SPECT	jednofotonová emisní tomografie
PNA	peptidová nukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
ESI	ionizace elektrospřejem
TLC	tenkovrstvá chromatografie
EA	elementární analýza
RTG	rentgenostrukturní analýza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
M	kov
L	ligand
β	celková konstanta stability
K_w	iontový součin vody
E_0	standardní elektroodový potenciál

E	elektrodotý potenciál
J_A	kyselá odchylka elektrody
J_B	zásaditá odchylka elektrody
S	Nernstova směrnice
ACN	acetonitril
DMAc	dimethylacetamid
TFA	kyselina triflouroctová

1 ÚVOD

1.1 LIGANDY OBSAHUJÍCÍ DIPICOLYLAMINOVÝ MOTIV

Dipicolylamin (systematicky *N,N*-bis(2-pyridylmethyl)amin, zkráceně DPA) je struktura obsahující tři atomy dusíku – dva zapojené v aromatických kruzích a jeden alifatický, sekundární (**Obr. 1.1**). Příprava této látky byla poprvé publikována v 70. letech^{1,2}, kdy byly také zkoumány její acidobazické vlastnosti (stanové hodnoty pK_a byly později upravovány). Díky donorovým atomům dusíku vykazuje tato molekula koordinační vlastnosti tridentátního ligandu, který tvoří stabilní komplexy s řadou kovů. Zpočátku byl předmětem zájmu především popis těchto komplexů a některých zvláštností s tím spojených.



Obr. 1.1 Struktura 2,2'-dipicolylaminu.

Studován byl ku příkladu komplex DPA s Co^{2+} ionty, který bez přístupu kyslíku pomalu mění barvu v důsledku tvorby polymerních struktur. V nich jsou ionty kovů jinak stabilizačně vázány než v původně vzniklých dimerních jednotkách.³ Byl připraven a popsán komplex, v němž je DPA koordinován s dvoumocnou mědí dokonce dvěma strukturálně odlišnými způsoby. V rámci jedné jednotky tak vzniká jak hexakoordinovaný komplex vytvářející pseudooktaedrální geometrii, tak pentakoordinovaný komplex mající konfiguraci tetragonální pyramidy.⁴ Vědci se věnovali popisu komplexů tohoto charakteru založených na DPA ligandu a Cu^{2+} iontech s variací aniontových částic⁵ s úmyslem přiblížit se proteinovému prostředí enzymů obsahujících Cu^{2+} ionty.^{6,7,8}

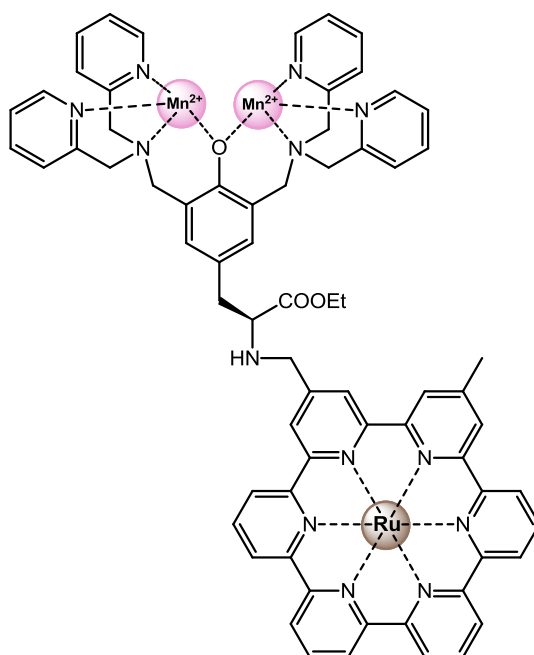
Později, když už byla známa struktura mnohých komplexů DPA, se intenzivně začalo studovat jejich biomedicínské a analytické uplatnění. Zájem o přípravu a krystalografickou analýzu komplexů derivátů DPA a sofistikovanějších koordinačních systémů obsahujících motiv DPA s různými ionty kovů (Cu a Zn,^{9,10,11,12} Ru a Mo,¹³ Ni,^{14,15} Re,¹⁶ Pd a Pt¹⁷) a studium jejich chování a vlastností však neustával.

Aplikační potenciál komplexů DPA

Ukázalo se, že komplex Cu^{2+} iontů se dvěma typy ligandů, z nichž jeden je DPA a druhý methylderivát 1,10-fenantrolinu, je schopen interkalovat do DNA a vykazovat tzv. nukleázovou aktivitu, tedy selektivně štěpit DNA, prostřednictvím svých redoxních vlastností (produkci kyslíkového radikálu). Tento model lze využít pro cílený design farmaceutik.^{18,19}

Komplexy DPA se Zn^{2+} a Ni^{2+} ionty našly uplatnění v chelatační afinitní chromatografii využívané k separaci a čištění proteinů. Tato metoda, dnes asi přesněji pojmenovaná jako afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech, je založená na vzájemné interakci biopolymeru v roztoku s ionty vázanými na pevné fázi (gelu).^{20,21,22}

Dipicolylamin byl také využit jako chelatant Mn^{2+} iontů v oblasti hledání alternativních obnovitelných zdrojů energie. Zde se setkáváme s klíčovou otázkou, jak přeměnit energii slunečního záření na energii chemickou, kterou by bylo možné skladovat. Při hledání řešení bylo třeba imitovat určité komponenty fotosystému II vyskytujícího se přirozeně v zelených rostlinách, v němž dochází k důmyslnému přenosu elektronu z manganového klastru až na molekulu kyslíku. Chlorofyl byl nahrazen rutheniovým komplexem s bipyridinovými ligandy a studovalo se, jak nejlépe imitovat komplex obsahující Mn^{2+} ionty, odkud elektron systémem putuje. Zavedení dipicolylaminových ramen, jakožto bazického substituentu schopného vytvářet silné intramolekulární vodíkové vazby a podílet se na koordinaci Mn^{2+} iontů na využívaný tyrosinový analog, urychlí přenos elektronu v porovnání s nesubstituovaným analogem voleným v předešlých experimentech (**Obr. 1.2**).^{23,24,25}



Obr. 1.2 Schématické znázornění struktury imitující Mn^{2+} klastr fotosystému II.

DPA byl rovněž testován jako koordinující funkční skupina vázaná na adsorbent na bázi agarózy určený k prekoncentraci a separaci Cr^{3+} a Cr^{5+} iontů z vody. Z výzkumu ovšem vyplynulo, že pro tyto účely lze vybrat vhodnější chelatační struktury.²⁶ O mnoho let později vyšlo najevo, že DPA jakožto chelatant má v environmentální analýze své místo, a to ve struktuře fluorescenčního senzoru určeného k detekci a odstraňování tří toxických polutantů – Cd^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} .²⁷

Bezesporu nejbohatší zájem vzbudila schopnost DPA struktury silně koordinovat Zn^{2+} ionty, která se stala předmětem zájmu mnoha výzkumných skupin a jevila se slibnou pro široké spektrum aplikací.²⁸

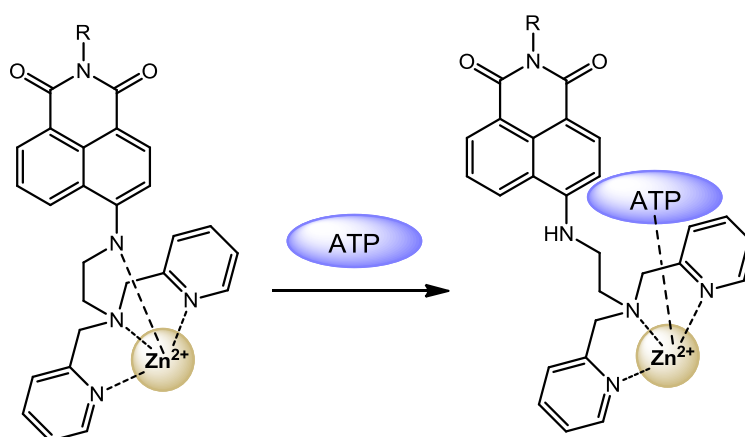
Detekce biologicky významných skupin látek

Velmi atraktivní oblastí, kde byl design zinečnatého komplexu DPA využit, byl vývoj umělých receptorů, u nichž je obecně snaha o selektivní vazbu peptidové či proteinové struktury vedoucí k modulaci jejich funkce. Může se jednat např. o peptidy mající na povrchu α -helixu specificky lokalizované histidinové zbytky.²⁹

Vazbou zinečnatého komplexu na fluorofor byl získán první umělý receptor (chemosenzor) pro fosforylované peptidy, které jsou velmi významnou cílovou skupinou mezi biologicky aktivními látkami na poli molekulárního rozpoznávání. Fosforylace hraje

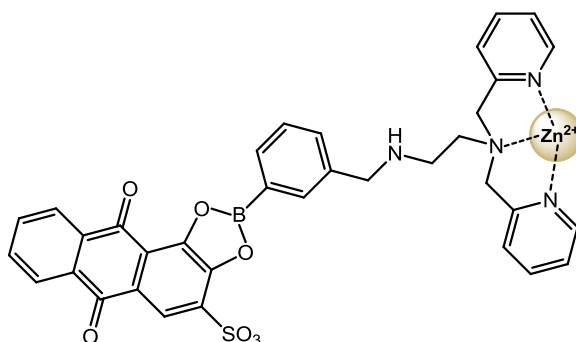
rolí v detekci závažných chorob i v protinádorové terapii. Koncept spočívá v tom, že fosfolipidy jsou v membránové dvojvrstvě buňky rozloženy asymetricky a jejich lokalizace u živé a apoptotické buňky je odlišná. Jedním z výrazných markerů apoptózy, a to dokonce v jejím raném stádiu, je i přesun fosfatidylserinu z vnitřní strany membrány na vnější. Takto translokovaný fosfatidylserin je přístupný pro navázání fluorescenční značky a posléze kvantifikovatelný průtokovou cytometrií či fluorescenční spektroskopií. Nejběžnější fluorescenční značkou pro tyto účely je konjugát proteinu annexin V s fluoresceinem, s nímž je spojena řada komplikací. Hledala se proto malá látka neproteinové povahy vykazující obdobnou selektivitu a afinitu vůči fosfatidylserinu jako annexin V, která by lépe vyhovovala. Tyto podmínky splnil zinečnatý komplex DPA ve spojení s některými UV–VIS či fluorescenčními indikátory.^{34,35,36,37,38} Některé z navržených senzorů jsou uzpůsobeny tak, aby dokázaly rozeznat časnou a pozdní fázi buněčné apoptózy. V pokročilejších fázích smrti buňky jsou tyto senzory schopné proniknout do buněčného jádra a interagovat s nukleovou kyselinou.³⁹

Koordinační sloučeniny na bázi DPA-Zn^{2+} jsou jedním z nejběžněji používaných motivů nabízejících jedno či více vakantních koordinačních míst k vazbě biologicky významných aniontů.⁴⁰ Ve spojení s antracemem lze vytvořit fluorescenční chemosenzor schopný selektivní detekce ATP, které jakožto univerzální energetický zdroj celé plejády pochodů v organismu dokáže mnohé vypovědět o zkoumaném biologickém systému.^{41,42} Později byl k detekci ATP a ADP využit senzor na bázi DPA-Zn^{2+} s naftylimidem, který lze s výhodou chemicky „napojit“ na karboxylovou skupinu za vzniku sukcinimidylesteru beze ztráty fluorescenčních vlastností, což je velice praktické pro *in vivo* aplikace (**Obr. 1.4**).⁴³



Obr. 1.4 Příklad senzoru schopného detekovat endogenní anionty vypovídající o řadě biochemických procesů probíhajících v organismu.

Ve spojení s kumarinovými deriváty lze docílit fluorescenční detekce pyrofosfátu (PP_i)⁴⁴ či anorganického fosfátu (P_i)⁴⁵ za plně fyziologických podmínek. Žádoucího zvýšení poskytnutého fluorescenčního signálu a selektivity vůči PP_i v přítomnosti jiných fosfátů jako ATP, ADP a P_i bylo dosaženo zavedením kyseliny fenylborité umožňující esterovou vazbu struktury na použitou alizarinovou značku. Fluorescence poskytovaná tímto uskupením je viditelná pouhým okem (**Obr. 1.5**).⁴⁶



Obr. 1.5 Senzor umožňující selektivní detekci pyrofosfátu.

Stejně selektivity se podařilo dosáhnout i zavedením kyanonaftalenu⁴⁷ a některých aminokyselin⁴⁸ do struktury senzoru. Spektrální metody detekce se u senzorů na pyrofosfát relativně nedávno začaly kombinovat s elektrochemickými metodami.⁴⁹ Ukázalo se rovněž, že zapojíme-li vhodně do struktury atom fluoru, můžeme po vazbě některých biologicky významných aniontů pozorovat NMR posun signálu jader ^{19}F . Tento efekt má výrazně diskriminační charakter ve prospěch pyrofosfátu.⁵⁰

Pomocí sondy založené na $DPA-Zn^{2+}$ je možno selektivně detekovat flavinadenin-dinukleotid (FAD) ve vodném roztoku na základě fluorescenční emise isoalloxazinového jádra, a to i v přítomnosti jiných flavinových derivátů. FAD je významným koenzymem v řadě metabolických drah a základní komponentou systému přenosu elektronu v mitochondriích a chloroplastech. Hraje též významnou úlohu v likvidaci patogenních organismů, neboť se účastní redoxního sledu reakcí vedoucích k produkci peroxidu vodíku a superoxidů v bílých krvinkách zajišťujících imunitní odpověď.⁵¹ Bylo zjištěno, že neurofilie (jeden z typů bílých krvinek) napadené akutní bakteriální infekcí obsahují méně FAD než-li stejné buňky zdravého organismu. Fluorescenční odezva poskytovaná samotným FAD je tak slabá, že neexistovala metoda, která by tento rozdíl objektivně zaznamenala. Inkubací vzorku krve zbaveného červených krvinek s $bis(Zn^{2+}-DPA)$ komplexem a následným měřením

fluorescence průtokovou cytometrií lze toxické neurofilní granulocyty u pacientů s infekcí detekovat.⁵²

Flavinové koenzymy nejsou v organismu syntetizovány *de novo*, ale jejich zdrojem je zpětný záchyt riboflavinu, který je jejich základní stavební komponentou. Pomocí specifických enzymů dochází následně k vzájemným přeměnám flavinů na mitochondriální membráně. Změny v hladinách těchto enzymů jsou spojovány s poruchami růstu, zhoršeným zrakem či zánětem sliznice jazyka. Podařilo se navrhnout látku obsahující bis(Zn^{2+} -DPA) komplex, která nejenže projevovala vlastnosti fluorescenčního chemosenzoru, ale zároveň vykazovala enzymatickou aktivitu a katalyzovala reakci štěpení FAD na FMN a AMP.⁵³

Velmi smělý projekt, který otevřel nové možnosti v oblasti nanomedicíny a cílené terapie nádorových onemocnění, bylo spojení DPA- Zn^{2+} a kyseliny hyaluronové (HA) navázané na nanočástice. HA obaluje farmaceutikum a jejím navázáním na nanočásticový systém je umožněn vstup buněčnou membránou. Celé toto uskupení vykazuje vysokou specifitu pro tumorové buňky. Role zinečnatého komplexu spočívá ve vazbě na cílovou strukturu, kterou je siRNA, přesněji řečeno difosfát v její struktuře.⁵⁴

Využití DPA komplexů v biomedicině

Konjugáty obsahující různé varianty fluoroforu a některý z řady dipicolylaminových derivátů koordinačně vázaný se Zn^{2+} ionty jsou využívány při výběru vhodných kandidátů na antibiotickou léčbu. Jedním z hodnocených faktorů nových antibiotik je selektivní rozpoznávání bakteriální membrány oproti savčí, tělu vlastní. Typicky je toto rozeznávání prováděno na základě rozložení lipidů a náboje na povrchu buněčné membrány. Zatímco plazmatická membrána savčích buněk je bohatá na zwitteriontovou formu fosfolipidů typu sfingomyelin a fosfatidylcholin, povrch bakteriální membrány nabývá spíše aniontový charakter díky velkému množství negativně nabitých molekul např. fosfatidylglycerolu a je vhodný pro vazbu kladně nabitého komplexu. Struktury využívaných komplexů jsou navrženy tak, aby byly schopné se nejen navázat, ale také membránou proniknout dovnitř do buňky.^{55,56} Kromě klasických fluorescenčních značek se pro tyto účely dobře osvědčily i fluorescenční značky v blízké infračervené oblasti³², „core-shell“ CdSe/ZnS nanočástice⁵⁷ či Au nanočástice⁵⁸, populární kvantové tečky. Relativní novinkou je využití rotaxanu, organické fluorescenční barvy patřící do skupiny squarainů.^{59,60}

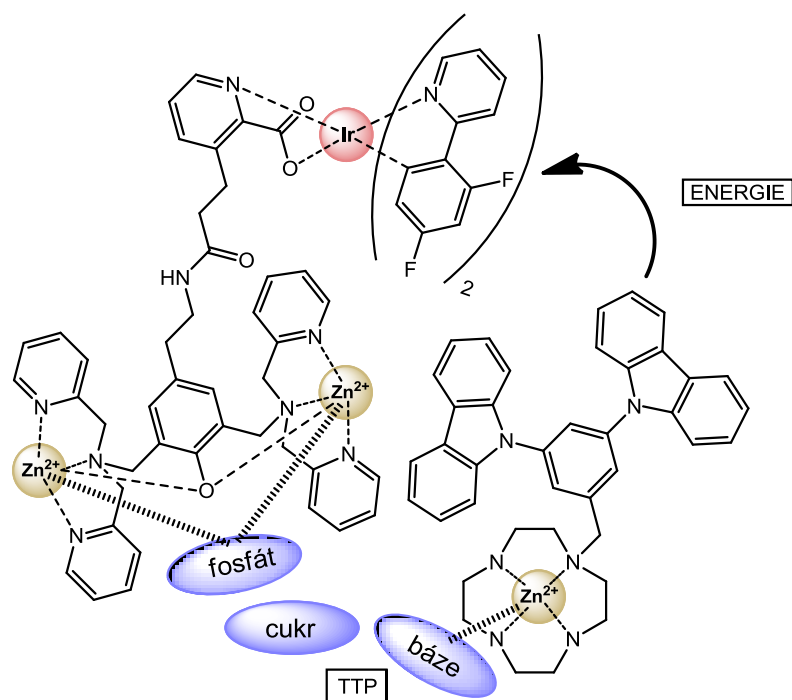
Později se také začaly využívat systémy, v nichž dochází k přenosu energie mezi dvěma chromofory tzv. *Förster / fluorescence resonance energy transfer* (FRET). Takové systémy jsou schopny detekovat určité komponenty buněčných membrán gramnegativních i grampozitivních bakterií a odhalit tak bakteriální infekci *in vivo*.⁶¹ U některých testovaných derivátů DPA byla dokonce pozorována selektivní cytotoxicita pro bakteriální buňky oproti buňkám savčím, a to u grampozitivního kmene bakterií *Staphylococcus aureus*, který je již rezistentní proti léčbě dosud užívanými, velmi účinnými antibiotiky vankomycin a oxacilin.^{62,63}

Po dlouhých letech vývoje využili vědci své znalosti o schopnostech připravených senzorů rozeznávat buňky podléhající smrti a s tím související negativní náboj povrchu membrány a podařilo se připravit sondu založenou na DPA–Zn²⁺, která dokázala detekovat nádorové buňky podléhající apoptóze v důsledku užívání cytostatik. Jednalo se o tumor prostaty a prsu implantovaný do zvířat. To by mohlo mít do budoucna velký význam k určení prognózy protirakovinové léčby.^{63,64}

DPA motiv se objevil také v senzorech detekujících sulforylované glykosaminoglykany. Takové senzory mohou nalézt uplatnění např. v kontrole farmaceutických preparátů obsahujících heparin, u nichž by kromě obsahu účinných látek mohly být zjištěny i případné příbuzné kontaminanty, neboť různé glykosaminy detekované pomocí tohoto senzoru poskytují charakteristickou odezvu.⁶⁵

Řada z výše uvedených senzorů (ne všechny) je založena na přenosu elektronové excitační energie mezi donorem a fluoreskujícím akceptorem tzv. *Photoinduced electron transfer* v klasickém uspořádání fluorofor–spacer–receptor. Tento formát nabývá dvou stavů – on/off, které se po excitaci fluoroforu projeví naprosto odlišným chováním. Stav „off“ zahrnuje zbavení se přebytečné energie přenosem elektronu z receptoru na fluorofor. Ve stavu „on“ se receptor nachází po vazbě na analyt a je charakterizován vyzářením fluorescence po excitaci fluoroforu.⁶⁶

Vědci využili také druhého luminiscenčního jevu – fosforescence. Byl připraven senzor na thymidintrifosfát (TTP) se záměrem monitorování aktivity thymidylátsyntázy, která je velmi aktivní v rychle rostoucích nádorových buňkách, v němž se opět objevil motiv DPA–Zn²⁺. Ve struktuře senzoru dále figuruje komplex tetraazacyklododekanového skeletu cyclenu se Zn²⁺ ionty, který vykazuje vysokou afinitu k imidovým skupinám nukleotidu. Selektivita pouze k jednomu typu nukleotidu a využití intramolekulárního energetického přenosu usnadňujícímu detekci jsou možné díky vhodným chemickým vlastnostem a sterickým poměrům vytvořených dalšími součástmi senzoru (**Obr. 1.6**).⁶⁷



Obr. 1.6 Schématické znázornění senzoru určeného k selektivnímu rozpoznávání TPP.

V nemalém výčtu uplatnění zinečnatého komplexu DPA je třeba zmínit také řadu aromatických sloučenin, v jejichž struktuře tento komplex figuruje a které se ukázaly být selektivními a silnými antagonisty CXCR4 receptoru. Ten využívají určité typy viru HIV ke vstupu do buňky, ale je spjatý i s dalšími vážnými nemocemi (revmatoidní artritida, jisté druhy rakoviny, leukemie atd.). Stal se předmětem zájmu ve snaze předcházet takovému onemocnění a bojovat s nimi.^{68,69,70}

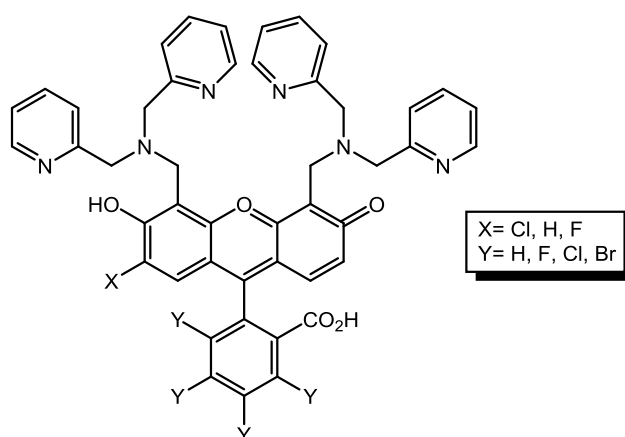
V průběhu posledních 20 let bylo připraveno nepřehledné množství senzorů založených na komplexu DPA–Zn²⁺ umožňujících detekci biologicky aktivních cílů. Nabízelo se vysoce prozkoumané fluorescenční chování těchto senzorů využít tak trochu „obráceně“, k detekci zinečnatých iontů.⁷¹

1.2 DIPICOLYLAMIN JAKO SENZOR ZINEČNATÝCH IONTŮ

Zinek je nepostradatelnou složkou živého organismu, po železe dokonce druhým nejzastoupenějším prvkem v organismu z d-bloku periodické soustavy. Většina zinečnatých iontů v organismu je součástí metaloproteinů, jejichž katalytická aktivita se významným způsobem uplatňuje v řadě procesů probíhajících v lidském organismu.⁷² Kromě toho však existuje zásoba volných disponibilních Zn²⁺ iontů, k jejichž sekreci dochází například

v epitelových buňkách prostaty⁷³, v β -buňkách a buňkách exokrinní části pankreatu⁷⁴, v buňkách slinných žláz⁷⁵ i v nervových buňkách⁷⁶. V některých tkáních a orgánech dosahuje koncentrace zinečnatých iontů až mikro– a milimolárních koncentrací a jejich hladina je přísně regulována. Poruchy homeostázy Zn^{2+} iontů indikují závažná onemocnění typu Alzheimerovy choroby, diabetu a některých druhů rakoviny. Včasná detekce může být užitečným nástrojem k lepší prognóze takových onemocnění. Jelikož Zn^{2+} vykazující d^{10} konfiguraci nejsou spektrofotometricky stanovitelné, byly původní metody jejich stanovení omezené na invazivní histologické procedury, při nichž dochází ke vzniku ireverzibilních precipitátů zinečnatých komplexů, využitelné prakticky pouze po smrti pacienta.

Velký průlom přineslo zavedení fluorescenčních senzorů schopných selektivně a reverzibilně detekovat Zn^{2+} ionty v živých buňkách. Nabízí se řada látek, které mohou být inkorporovány jako fluorofor do konstrukce takového senzoru. Velice dobře se osvědčily deriváty kumarinu a iminokumarinu⁷⁷, mohutně používaný antracen³², ale také třeba méně obvyklý fluorofor benzoessorufin.³² Ligandů, které by bylo možné využít k vazbě zinečnatého kationtu, zdaleka tolik není. Problémem je většinou nízká iontová selektivita. Široce používaným motivem při navrhování takových struktur je DPA, a to díky vysoké afinitě a selektivitě vůči Zn^{2+} iontům oproti fyziologicky se v organismu vyskytujícím kationtům kovů alkalických zemin. První generaci těchto senzorů představovala Zinpyr rodina chemosenzorů založená na fluoresceinu (**Obr. 1.7**).⁷⁸ Tyto látky disponovaly mnoha dalšími příznivými vlastnostmi, jakými jsou rozpustnost ve vodě a prostupnost buněčnou membránou, bohužel poskytovaná fluorescence byla značně omezená vlivem protonizace aminoskupin DPA za fyziologického pH.



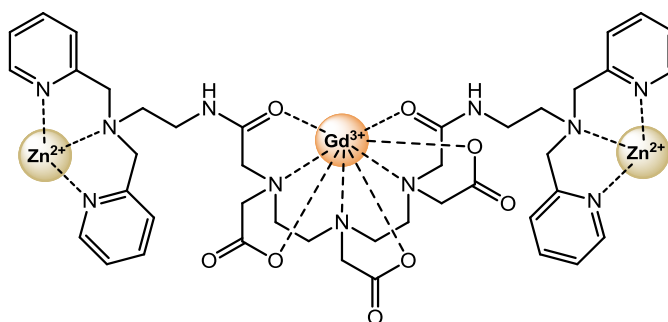
Obr. 1.7 Obecná struktura Zinpyr senzorů (s variací substituentů) vykazujících vysokou afinitu k volným Zn^{2+} iontům.

Původně volenou strategií, jak tomuto problému předcházet, byla substituce DPA methylovými, benzylovými, thioetherovými a dalšími skupinami, která ovšem znamenala snížení afinity takové molekuly k Zn^{2+} iontům. Velmi výhodnou možností, jak toto řešit, se ukázala být výměna chelatační složky 2,2'-DPA za 2,4'-DPA, který sice vykazuje nižší afinitu k Zn^{2+} iontů, ale zase poskytuje vyšší selektivitu v porovnání s jinými volně se v organismu vyskytujícími dvoumocnými ionty a hlavně dochází k žádoucímu snížení pK_a aminoskupin. Tento krok přinesl některé další výhody, které by mohly otevřít cestu k potenciálně výhodné strukturální náhradě u více typů již existujících senzorů zmíněných výše.⁷⁹

Metoda fluorescenční mikroskopie má bohužel jednu obrovskou nevýhodu, a tou je omezená hloubka a šířka dosahu. Její využití pro prostorově rozsáhlé a „neprůhledné“ vzorky, jakými je živý organismus, není možné. Velice efektivní způsob obcházející tyto nedostatky je zobrazování magnetickou rezonancí (MRI), které však poskytuje o poznání nižší rozlišení oproti fluorescenčnímu zobrazování. Spojení těchto dvou metod by vytvořilo unikátní nástroj pro *in vivo* detekci Zn^{2+} iontů. Úkolem vědců bylo sestavit molekulovou platformu s duální funkcí, která by v sobě zahrnovala možnost poskytnutí jak fluorescenčního, tak MRI signálu.⁸⁰

MRI je dnes jednou z nejběžnějších klinicky využívaných zobrazovacích metod. Je založena na sledování NMR signálu protonů molekul vody. Pro zvýšení citlivosti jsou často zaváděny kontrastní látky na bázi iontů paramagnetických kovů ovlivňující relaxační čas NMR aktivních protonů. Jedná se především o komplexy Gd^{3+} s lineárními ligandy (uvedme např. diethylentriaminpentaoctovou kyselinu DTPA) nebo polyazamakrocykly (např. DOTA). Vhodnou variantou se ukázala i kombinace DPA motivu s komplexy Mn^{2+} -porfyrin.⁸⁰

Došlo k provázání předešlých znalostí o chování DPA- Zn^{2+} komplexů a zjistilo se, že po vazbě pyrofosfátu na DPA chelatační ramena dochází k pozitivnímu ovlivnění relaxivity kontrastní látky. Zvýšení kontrastu zabudováním aniontu do struktury kontrastní látky lze vysvětlit snížením stericých zábran v místě vazby molekuly vody (**Obr. 1.8**).⁸¹



Obr. 1.8 Senzor detekující pyrofosfát a umožňující zobrazení magnetickou rezonancí.

Příliš pomalá výměna molekul vody je právě tím limitujícím faktorem zodpovědným za nízkou citlivost metody MRI. Na konci roku 2015 byla zveřejněna práce, v níž byly na DPA napojeny fosfinátové skupiny ovlivňující koordinační vlastnosti molekuly díky donorovým kyslíkovým atomům a tím vazebnou schopnost kontrastní látky na makromolekuly (lidský sérový albumin). To má další konsekvence ve vzrůstu relaxačního času protonů vázaných na kontrastní látku Gd^{3+} -DOTA a pozitivním ovlivnění citlivosti metody. Celý tento návrh směřoval k reakci na Zn^{2+} ionty produkované β -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu při sekreci inzulínu za účelem ověření fyziologické funkce tohoto mechanismu.⁸²

Syntézou senzoru, v němž jsou na naftylimid navázána DPA ramena, byla zkombinována možnost tohoto uskupení komplexovat intracelulární Zn^{2+} (jev provázený vzrůstem intenzity fluorescence) a následné selektivní vazby PP_i ke vzniklému komplexu (provázeno dramatickým uhasínáním fluorescence). Pozitivní diskriminační efekt poskytovaný tímto uskupením převyšuje selektivitu dosahovanou senzory uvedenými výše v textu.⁸³

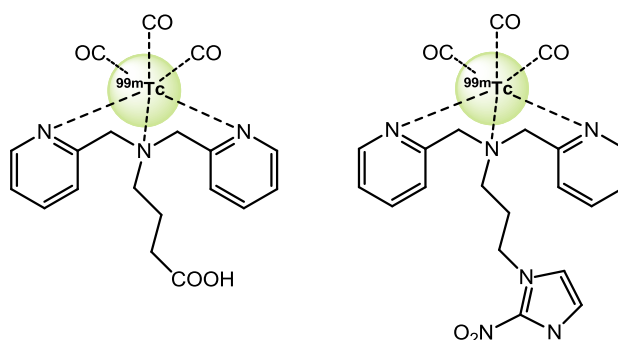
1.3 KOMPLEXACE RADIONUKLIDŮ

Bifunkční ligandy založené na DPA lze využít k radioaktivnímu značení biomolekul. Dobře definované a radiochemicky vysoce čisté komplexy DPA vznikají s ^{99m}Tc a ^{188}Re , resp. s jejich trikarbonyly – $(CO)_3$.⁸⁴ Trikarbonyly jsou výhodné vzhledem k jejich malé velikosti, nízkému spinu d^6 elektronové konfigurace a kompatibilitě s vodným prostředím. Komplexy s DPA ligandem vykazují vysokou stabilitu a nalézají tak uplatnění v diagnostických a terapeutických medicínálních aplikacích.

Nejběžnější izotop využívaný k zobrazování nádorových tkání metodou SPECT je ^{99m}Tc , a to díky jeho příznivým vlastnostem ($t_{1/2} \sim 6$ hod, $\gamma \sim 143$ keV) a relativně snadné izolaci (jako $Na^{99m}TcO_4$ z ^{99}Mo). Podobně ^{188}Re ($t_{1/2} \sim 3,68$ dní, $\beta \sim 1$ MeV, $\gamma \sim 137$ keV) je součástí radiofarmak pro léčbu nádorů. Do těla se vpravují prostřednictvím sacharidů, na které je navázáno DPA pendantní rameno koordinující iont kovu. Sacharidy jsou primárním zdrojem energie, účastní se většiny metabolických drah a organismus disponuje velmi precizním transportním systémem pro tyto látky. Toho se využilo i v případě radioaktivně značených komplexů. Ostatně 2-deoxy-2- $[^{18}F]$ fluor-D-glukóza je dosud nejpoužívanějším zobrazovacím činidlem pro pozitronovou emisní tomografii. Krátký poločas rozpadu ^{18}F a vysoké náklady spojené s jeho přípravou dávají podnět k rozvoji různých alternativ, jakými jsou právě SPECT izotopy ^{99m}Tc a ^{188}Re .⁸⁵ U řady konjugátů lišících se sacharidovou částí bifunkčního ligandu

zodpovědnou za vazbu na biomakromolekuly byly testovány farmakokinetické parametry jako biodistribuce, zapojení se do metabolismu, exkrece z organismu apod.⁸⁶

Byl studován také komplex $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ s *N,N*-bis(2-pyridylmethyl)-4-aminobutanovou kyselinou, který se v *in vivo* experimentech jevil velice nadějně díky relativně snadné přípravě a rychlému a specifickému odbourávání v játrech.⁸⁷ Příznivé distribuční parametry vykazoval také komplex 2-nitroimidazol–DPA– $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ umožňující detekci nádorové hypoxie vznikající v důsledku nekontrolovatelné proliferace buněk (**Obr. 1.9**).⁸⁸

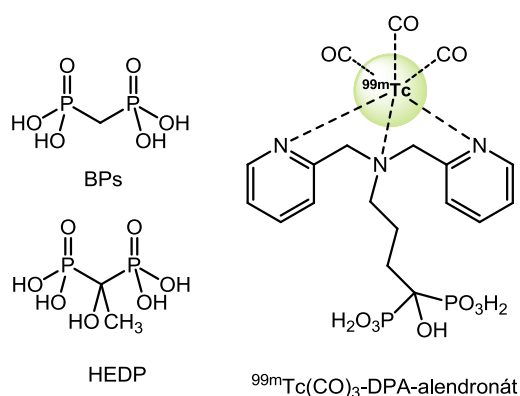


Obr. 1.9 Struktury obsahující dipicolylaminový motiv vhodné ke komplexaci radionuklidů.

Motiv dipicolylaminu, konkrétně jeho azidoderivát vhodný pro „click“ chemii, byl navázán na peptidovou nukleovou kyselinu (PNA). Jedná se o uměle připravený analog nukleových kyselin, v němž je cukr–fosfátový řetězec nahrazen *N*-(2-aminoethyl)glycinovými jednotkami spojenými peptidovou vazbou. PNA má spoustu pozitivních vlastností (vysokou afinitu k DNA/RNA, vysokou chemickou stabilitu, odolnost vůči nukleázám a proteázám), které umožnily jeho využití jakožto komponenty radioaktivních sond. Připravený konjugát byl značen ^{99m}Tc a podroben *in vivo* testům, ze kterých vyšel jako velice nadějný kandidát pro imunoterapii.⁸⁹

Nabízelo se využití ^{188}Re jakožto β^- -emitoru v paliativní léčbě kostních metastáz, ve které dosud dominovaly především dva jiné radionuklidy – ^{89}Sr a ^{153}Sm , k jejichž produkci je vyžadován speciální reaktor a jejichž příprava je nákladná. Využilo se podoby chemického chování ^{188}Re a ^{99m}Tc a byl připraven $^{186/188}\text{Re}$ -hydroxyethyliden-1,1-bisfosfonát ($^{186/188}\text{Re}$ -HEDP), „terapeutický analog“ ^{99m}Tc -bisfosfonátu (^{99m}Tc -BPs) (**Obr. 1.10**), který je rutinně používaným zobrazovacím činidlem nádorů kostí. Farmaceutické vlastnosti této látky však nebyly ideální, což se připisovalo tomu, že bisfosfonát hraje roli jak vazebného ligandu pro radionuklid, tak látky určující cílenou distribuci v organismu (kost). Bylo žádoucí tyto dvě funkce přidělit dvěma chemickým podstrukturám, které budou konjugačně spojeny

do jedné molekuly. Použití bisfosfonátů s vysokou afinitou k metabolicky aktivní kostní tkáni je tradiční a dobře odzkoušenou záležitostí. Zvolil se tedy aledronát, účinná látka komerčně dostupných preparátů pro léčbu různých kostních onemocnění, a spojil se s DPA, vhodným chelatačním činidlem vybraných radionuklidů.⁹⁰ Velmi záhy přišla další inovace. Vědci si uvědomili si, že kromě afinity ke kostem je známá také afinita bisfosfonátů ke kovovým povrchům.⁹¹ Uskupení $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DPA-aledronát}$ (**Obr. 1.10**) bylo navázáno na kontrastní látku užívanou pro MRI – nanočástice paramagnetického oxidu železa, vzniklá vazba je velmi silná v porovnání s jinými běžně používanými skupinami u těchto kontrastních látek. Spojení umožňuje unikátní skloubení výhod radiomedicínských metod typu PET/SPECT (extrémní citlivost poskytující *in vivo* informace na molekulární a buněčné úrovni) s výhodami MRI, jimiž je především excelentní prostorové rozlišení (použije-li se dostatečné množství kontrastní látky) podávající anatomickou informaci.⁹²



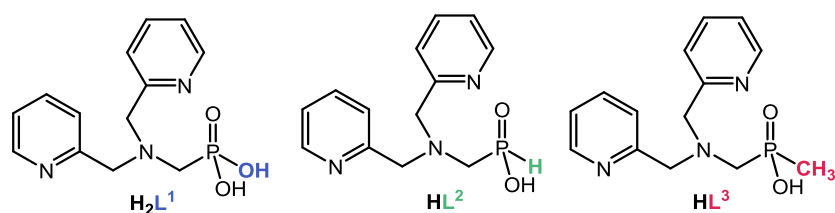
Obr. 1.10 Ligandy komplexující radioizotopy vhodné k zobrazování a terapii nádorových onemocnění kostí.

Jak již bylo uvedeno, uskupení DPA-Zn^{2+} je schopno rozeznávat bakteriální buněčnou stěnu v přirozeném prostředí buněk savců. Toho se využilo k zobrazování míst postižených infekcí metodou SPECT za použití kontrastních látek na bázi DTPA či DOTA koordinujících radioizotop ^{111}In a obsahujících DPA-Zn^{2+} rameno(a).⁹³

Spojením již dlouho studovaného uplatnění motivu DPA-Zn^{2+} v senzorech rozpoznávajících buňky podléhající buněčné smrti a schopnosti DPA komplexovat radioaktivní nuklidy bylo možné v rámci jedné molekuly (použití více DPA ramen) zobrazení a cílená terapie nádorů metodami SPECT a PET.⁹⁴

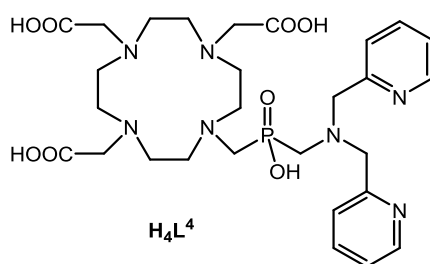
1.4 CÍL PRÁCE

Cílem práce byla syntéza základních ligandů, v nichž bude dipicolylaminová struktura napojena přes methylenový můstek na fosforovou komponentu (**Obr. 1.11**). Jelikož toto uskupení poskytuje unikátní koordinační vlastnosti a bylo dosud jen velmi málo studováno, bylo žádoucí zjistit co možná nejvíce o acidobazickém a komplexotvorném chování takových látek jak v roztoku, tak v pevné fázi, a to prostřednictvím metod potenciometrické a NMR titrace, UV–VIS spektrofotometrie a rentgenostrukturní analýzy.



Obr. 1.11 Struktury připravovaných fosforových analogů obsahujících DPA.

V případě splnění našich předpokladů o chování derivátu obsahujícího vazbu P–H bylo druhým záměrem projektu využít syntetické možnosti napojení ligandu **HL²** na makrocyclickou strukturu za účelem získání bifunkčního ligandu potenciálně schopného komplexovat dva nezávislé ionty kovu (**Obr. 1.12**). Jeden by byl například zodpovědný za vytvoření kontrastu v molekulárním zobrazování magnetickou rezonancí (Gd^{3+}) – koordinován substituovaným tetraazadodekanovým cyklem – a druhým by byl selektivně detekovaný Zn^{2+} iont – koordinován DPA a fosfinátovou –OH skupinou.



Obr.1.12 Struktura bifunkčního ligandu **H₄L⁴**.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHARAKTERIZAČNÍ METODY

Rozpouštědla a komerčně dostupné chemikálie byly zakoupeny od dodavatelů Sigma Aldrich, TCI Europe N.V., Acros Organic a Lach-Ner s.r.o.

Není-li uvedeno jinak, byla použita deionizovaná H₂O připravená iontově výměnnou chromatografií systémem ROWAPUR 200/100.

K charakterizaci látek byly využity následující metody:

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Pro zjištění průběhu reakcí byla měřena ¹H, ³¹P a ³¹P{¹H} spektra na spektrometru Varian VNMRs 300. Pro charakterizaci látek byla využita ³¹P a ³¹P{¹H} spektra pořízená na stejném přístroji při frekvenci 121,4 MHz a ¹³C{¹H} a ¹H spektra měřená na spektrometru Bruker Avance III 600 s kryo sondou při frekvenci 600,2 MHz pro ¹H a 150,9 MHz pro ¹³C. Za účelem přesného přiřazení jednotlivých signálů byly provedeny 2D experimenty – HSQC, HMBC, ¹H–¹H COSY. Měření byla prováděna v 5 mm kyvetách při teplotě 25 °C. Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm a v případě použití D₂O (99,8 % D, Chemotrade) referencovány vzhledem k externímu nebo internímu standardu *t*-BuOH (δ = 1,25 ppm pro ¹H, δ = 30,3 ppm pro ¹³C) a externímu standardu 85 % H₃PO₄ (δ = 0,0 ppm pro ³¹P). Spektra měřená v CDCl₃ (99,8 % D, Armar Chemicals) byla referencována na signál rozpouštědla (7,26 ppm pro ¹H a 77,0 ppm pro ¹³C), nebo na interní standard tetramethylsilanu (δ = 0,0(0) ppm pro ¹H a ¹³C). Multiplicita signálů je vyjádřena běžně užívanými zkratkami, vedle nich se v NMR charakterizačních výpisech objevují zkratky „bs“ a „bm“ vyjadřující široký singlet, případně multiplet.

Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla změřena na přístroji Bruker ESQUIRE 300 (ionizace pomocí ESI, hmotnostním analyzátozem iontová past). Byla měřena spektra kladných (+) i záporných (–) iontů. Uvedeny jsou pouze intenzivní signály, které dokazují přítomnost předpokládané struktury.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách pokrytých vrstvou silikagelu MERK 60 F₂₅₄. K vizualizaci látek bylo použito UV záření a Dragendorffovo detekční činidlo, které bylo připraveno smícháním 5 ml roztoku A (1,7 g Bi(NO₃)₃ ve 100 ml směsi H₂O: AcOH = 80:20), 5 ml roztoku B (40g KI ve 100 ml H₂O), 20 ml AcOH a 70 ml H₂O. Činidlo bylo nanášeno na rozpouštědel zbařený chromatogram rozprášením. Používané mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých látek.

Elementární analýza (EA)

U pevných látek byl přesný obsah uhlíku, vodíku a dusíku zjištěn elementární analýzou provedenou servisním pracovištěm Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR na přístroji Perkin Elmer 2400. Výsledky jsou uvedeny v podobě hmotnostních procent.

Vysokoučinná (vysokotlaká) kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC záznamy byly pořízeny na kapalinovém chromatografu s duálním spektrometrickým UV–VIS detektorem Topaz (při vlnových délkách 210, resp. 280 nm a 254 nm), gradientovou pumpou Beta a dynamickou směšovací komorou Knauer. K odplynění mobilní fáze byl zapojen degaser DG 3014 a průtoková rychlost byla nastavena na 1 ml·min⁻¹. Analýzy byly provedeny výhradně za použití deionizované H₂O připravované na přístroji MILIPORE. Chromatografie byla prováděna v reverzním modu na analytické C8 silikagelové koloně ReproSil Gold (rozměr 150 × 4,6 mm, průměr částic 5 μm, zrnitost 120 Å) s gradientovou elucí. Mobilní fází byla H₂O (A) s konstantním přídavkem 100mM NH₄OAc/AcOH pufru o pH ~5,5 (B₁) či 0,1% TFA (B₂) a gradientem ACN (ROTISOLV® HPLC Gradient grade) (C), případně pouze gradientem ACN (C) bez přídavku aditiva. Průběhy eluce byly následující – metoda *M*₁ – A:B₁:C 85:10:5 → 0:10:90 (10 min); *M*₂ – A:B₂:C 85:10:5 → 0:10:90 → 0:10:90 (5+5 min) a metoda *M*₃ – A:C 95:5 → 0:100 (10 min). Chemikálie použité na přípravu aditiv byly pořízeny v HPLC kvalitě. Látka byla injektována rozpuštěná v H₂O, ACN, případně jejich směsi v poměru 1:1 v HPLC kvalitě (~20 μl; 0,5 mM). Sběr a zpracování dat bylo provedeno v programu Clarity. Mrtvý čas kolony (~2 min) není zohledněn v uvedených retenčních časech.

Rentgenostrukturní analýza (RTG)

Difrakce rentgenového záření na vzniklých krystalech byla měřena na přístroji Bruker APEX II s plošných CDC detektorem při teplotě 150 K. Zdrojem záření byla molybdenová elektroda (emisní linie K_{α}) s grafitovým monochromátorem o vlnové délce 0,71073 Å. Získaná data byla řešena za pomoci programu SIR92 a k upřesnění parametrů geometrického uspořádání struktur byl použit program SHELX-97 (**Tab. 2.1**).

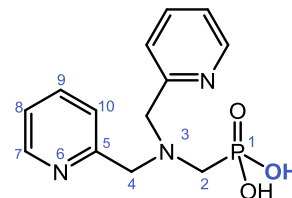
Tab. 2.1 Experimentální data získaných monokrystalových struktur.

Struktura	$[\text{H}_3\text{L}^1]^+\cdot\text{Cl}^-\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$[\text{Li}_2(\text{HL}^1)_2]$	$[\text{Cu}(\text{HL}^1)(\text{Cl})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\frac{[\text{Cu}(\text{HL}^1)(\text{Cl})]}{[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{Cl})]^+\cdot\text{Cl}^-\cdot\text{H}_2\text{O}}$	$\frac{[\text{Ni}_2(\text{L}^1)_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})\{\text{Li}(\text{H}_2\text{O})\}]}{\{\text{Li}(\text{H}_2\text{O})_2\}^+\cdot(\text{ClO}_4)^-\cdot 11,25\text{H}_2\text{O}}$	$[\text{Ni}_2(\text{L}^3)_2(\text{NCS})_2]$
Vzorec	$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{P}$	$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{Li}_2\text{N}_6\text{O}_6\text{P}_2$	$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{ClCuN}_3\text{O}_6\text{P}$	$\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{Cl}_3\text{Cu}_2\text{N}_6\text{O}_7\text{P}_2$	$\text{C}_{26}\text{H}_{59,5}\text{ClLi}_2\text{N}_6\text{Ni}_2\text{O}_{26,25}\text{P}_2$	$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{Ni}_2\text{O}_4\text{P}_2\text{S}_2$
M_r	365,75	598,38	445,29	836,95	1104,99	814,13
Rozměry (mm)	0,17×0,07×0,06	0,25×0,19×0,06	0,26×0,19×0,07	0,14×0,13×0,11	0,31×0,31×0,14	0,19×0,10×0,04
Soustava	ortorombická	monoklinická	monoklinická	triklinická	monoklinická	monoklinická
Prostorová grupa	$\text{Pna}2_1$	$\text{P}2_1/\text{n}$	$\text{P}2_1/\text{c}$	$\text{P}-1$	$\text{P}2_1/\text{c}$	$\text{P}2_1/\text{c}$
a (Å)	8,6070(2)	9,3018(3)	8,0880(4)	8,3721(2)	9,3666(4)	12,4639(4)
b (Å)	25,0089(5)	9,3173(3)	8,5326(5)	22,6005(6)	35,0692(15)	10,6323(4)
c (Å)	7,6190(2)	16,7701(5)	14,6161(8)	17,3031(6)	14,1635(5)	15,2654(5)
α (°)	90,00	90,00	73,868(2)	90,00	90,00	90,00
β (°)	90,00	95,057(1)	74,070(2)	97,159(2)	101,461(2)	102,271(1)
γ (°)	90,00	90,00	69,458(2)	90,00	90,00	90,00
V (Å ³)	1640,00(7)	1447,77(8)	889,62(8)	3248,46(16)	4559,6(3)	1976,75(12)
Z	4	2	2	4	4	2
D_c (g·cm ⁻³)	1,481	1,373	1,662	1,711	1,610	1,368
μ (mm ⁻¹)	3,254	1,795	1,503	1,709	1,048	1,181
$F(000)$	768	624	458	1704	2306	840
Počet všech difrakcí; počet pozorovaných ($I_0 > 2\sigma(I)$)	3203; 3093	2864; 2663	4103; 3392	7476; 5598	10490; 9453	3880; 3374
Parametry	236	194	228	416	614	225
G-o-f on F^2	1,085	1,237	1,053	1,056	1,038	1,040
R ; R' (všechna data)	0,0278; 0,0264	0,0392; 0,0363	0,0453; 0,0345	0,0809; 0,0543	0,0453; 0,0404	0,0343; 0,0278
wR ; wR' (všechna data)	0,0659; 0,0651	0,1023; 0,1009	0,0938; 0,0889	0,1405; 0,1271	0,1051; 0,1017	0,0696; 0,0673
Diferenční maxima max; min (e Å ⁻³)	0,174; -0,291	0,308; -0,362	0,520; -0,403	2,129; -1,375	1,040; -0,813	0,647; -0,419

2.2 SYNTÉZA

N,N-bis(2-pyridylmethyl)aminomethylfosfonová kyselina $\mathbf{H_2L^1}$ ve formě $[\mathbf{H_3L^1}]^+\cdot\text{Cl}^-\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Do baňky opatřené magnetickým míchadlem byl navážen paraformaldehyd (837 mg; 27,9 mmol; 1,1 ekv.), DPA (5,05 g; 25,3 mmol; 1,0 ekv.) a H_3PO_4 (20,6 g; 251 mmol; 9,9 ekv.). K navážce byla přidána HCl (aq.; 12M; 100 ml) a směs byla míchána 2 dny při teplotě 80 °C. Průběh reakce byl sledován pomocí ^{31}P NMR spektroskopie. Rozpouštědlo bylo odstraněno na rotační vakuové odparce a získaný odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silném kationtovém iontoměnič (DOWEX 50, ~150 ml, H^+ -cyklus). Produkt byl eluován vodným roztokem pyridinu (10% v/v). Pyridin byl poté odstraněn několikanásobnou destilací s H_2O na vakuové odparce. Byla získána látka $\mathbf{H_2L^1}$ v podobě žlutého oleje, který představoval produkt ve formě zwitteriontu (~6,3 g, ~85 %). Krystalizace byla provedena rozpuštěním oleje ve 30 ml 3% HCl a přidáním nadbytku *i*-PrOH (~100 ml). Po několikadenním stání byly vzniklé krystaly separovány filtrací přes skleněnou fritu S3 s následným promytím Et_2O a dosušením na vzduchu. Rentgenostrukturní analýzou bylo zjištěno, že produkt za těchto podmínek krystaluje jako hydrochlorid dihydrát (6,15 g; 66 %).



NMR (D_2O , pD ~ 5): ^1H δ = 3,14 ($\text{CH}_2\text{-P}$, d, 2H, $^2J_{\text{HP}} = 11$ Hz); 4,30 ($\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$, s, 4H); 7,53 (H_8 arom., m, 2H); 7,55 (H_{10} arom., d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz); 8,02 (H_9 arom., td, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2$ Hz); 8,47 (H_7 arom., d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5$ Hz); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ δ = 54,6 ($\text{CH}_2\text{-P}$, d, $^1J_{\text{CP}} = 147$ Hz); 59,9 ($\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$, d, $^3J_{\text{CP}} = 7$ Hz); 125,3 (C_8 arom., s); 126,2 (C_{10} arom., s); 142,9 (C_7 arom., s); 145,3 (C_9 arom., s); 154,8 (C_5 arom., s); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ δ = 17,2 (s).

MS: (-) 291,9 [M-H^+]⁻.

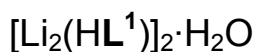
(+) 294,1 [M+H^+]⁺; 316,0 [M+Na^+]⁺.

TLC ($\text{EtOH-NH}_4\text{OH}$ 3:1): $R_f \sim 0,2$.

RTG: [H_2L^1] $\cdot\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

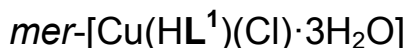
EA ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{P}\cdot\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $M_R = 365,8$): C 42,7 (42,9); H 5,8 (5,8); N 11,5 (11,4).

HPLC: $t_R \sim 5,7$ min (metoda M_1).



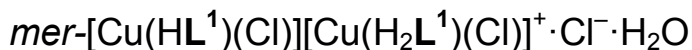
Navážka $[\text{H}_2\text{L}^1] \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (103 mg; 0,280 mmol; 1,0 ekv.) a $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (24,0 mg; 0,572 mmol; 2,0 ekv.) byla rozpuštěna v deionizované vodě (500 μl). Směs byla následně převrstvena *i*-PrOH (~15 ml). Po pěti dnech stání byly vzniklé krystaly odfiltrovány na S4 fritě a promyty Et_2O . Dosušením na vzduchu bylo získáno 77,9 mg (~88 %) pevné krystalické látky.

EA ($\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{PLi} \cdot \text{H}_2\text{O}$; $M_R = 317,2$): C 49,2 (49,0); H 5,4 (5,0); N 13,3 (13,3).

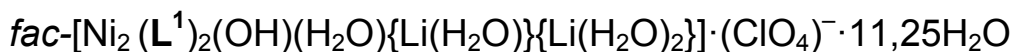


Do skleněné vialky byl navážen $[\text{H}_2\text{L}^1] \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99,8 mg; 0,273 mmol; 1,0 ekv.) a CuCl_2 (36,5 mg; 0,271 mmol; 1,0 ekv.). Navážka byla rozpuštěna v deionizované vody (500 μl). Byl přidán $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (26,7 mg; 0,636 mmol; 2,3 ekv.). Vzniklý roztok byl promíchán a krystalován převrstvením *i*-PrOH. Po třech dnech byly vytvořené krystaly odfiltrovány na S4 fritě a promyty Et_2O . Po dosušení na vysokém vakuu bylo získáno 74,5 mg (~64 %) pevné krystalické látky modré barvy.

EA ($\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{PCuCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M_R = 427,3$): C 49,2 (49,0); H 5,4 (5,0); N 13,3 (13,3).



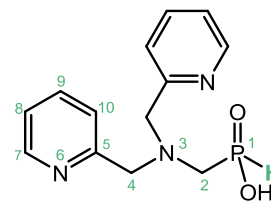
Do skleněné vialky byl navážen $[\text{H}_2\text{L}^1] \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (97,3 mg; 0,266 mmol; 1,0 ekv.) a CuCl_2 (37,1 mg; 0,276 mmol; 1,0 ekv.). Navážka byla rozpuštěna v deionizované vody (500 μl). Byl přidán $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (23,9 mg; 0,569 mmol; 2,1 ekv.). Vzniklý roztok byl promíchán a krystalován difúzí *i*-PrOH přes plynnou fázi. Po pěti dnech byly vytvořené krystaly odfiltrovány na S4 fritě a promyty Et_2O . Po dosušení na vysokém vakuu bylo získáno 68,2 mg (~60 %) pevné krystalické látky modré barvy.



Navážka $[\text{H}_2\text{L}^1] \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99,3 mg; 0,271 mmol; 1,0 ekv.), NiCl_2 (35,2 mg; 0,271 mmol; 1,0 ekv.), $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (45,7 mg; 1,09 mmol; 4,0 ekv.) a $\text{LiClO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (22,2 mg; 0,138 mmol; 0,5 ekv.) byla rozpuštěna v deionizované vodě (500 μl). Roztok byl následně převrstven *i*-PrOH (~15 ml). Po pěti dnech stání byly vzniklé krystaly odfiltrovány na S4 fritě a promyty Et_2O . Dosušením na vzduchu bylo získáno 117 mg (~39 %) krystalů modrošedé barvy.

N,N-bis(2-pyridylmethyl)aminomethylfosfinová kyselina **HL²**

Navážka DPA (5,07 g; 25,4 mmol; 1,0 ekv.), paraformaldehydu (1,30 g; 43,3 mmol; 1,7 ekv.) a H₃PO₂ (16,5 g; 250 mmol; 9,8 ekv.) byla rozpuštěna v HCl (aq.; 12M; 100 ml). Reakční směs byla míchána 1 den při teplotě 30 °C. Stupeň konverze reaktantů na produkt byl zjištěn pomocí ³¹P NMR spektroskopie. Směs byla odpařena dosucha, odparek byl rozpuštěn v malém množství H₂O a nanesen na silný kationtový iontoměnič (DOWEX 50, ~100 ml, H⁺-cyklus). Sloupec byl promyt H₂O (~500 ml), produkt byl eluován vodným roztokem pyridinu (10% v/v; ~300 ml). Pyridin byl odstraněn na rotační vakuové odparce několikanásobnou destilací s H₂O. Získaný odparek byl rozpuštěn v H₂O (~150 ml) a lyofilizován za vzniku žluté tuhé olejovité formy látky **HL²** (~6,24 g, ~89 %).



NMR (D₂O, pD~5): ¹H δ 2,96 (CH₂-P, d, 2H, ²J_{HP} = 9 Hz); 4,11 (CH₂-N-CH₂, s, 4H); 6,99 (P-H, d, 1H, ¹J_{HP} = 518 Hz); 7,46 (H₈ arom., m, 2H); 7,52 (H₁₀ arom., d, 2H, ³J_{HH} = 8 Hz); 7,96 (H₉ arom., td, 2H, ³J_{HH} = 8 Hz, ⁴J_{HH} = 2 Hz); 8,40 (H₇ arom., d, 2H, ³J_{HH} = 5 Hz); ¹³C{¹H} δ 57,3 (CH₂-P, d, ¹J_{CP} = 102 Hz); 60,3 (CH₂-N-CH₂, d, ³J_{CP} = 7 Hz); 125,2 (C₈ arom., s); 126,2 (C₁₀ arom., s); 142,7 (C₇ arom., s); 145,3 (C₉ arom., s); 155,3; (C₅ arom., s); ³¹P δ 22,0 (dt, ¹J_{HP} = 518 Hz, ²J_{HP} = 9 Hz).

MS: (-) 275,9 [M-H⁺]⁻.

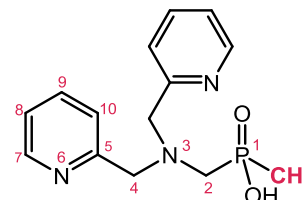
(+) 300,1 [M+Na⁺]⁺.

TLC (EtOH-NH₄OH 50:1): R_f ~ 0,5.

HPLC: t_R ~ 6,3 min (metoda M₁).

N,N-bis(2-pyridylmethyl)aminomethylmethylfosfinová kyselina **HL³**

K navážce DPA (320 mg; 1,61 mmol; 1,0 ekv.) byla přidána kyselina methylfosfinová (~95%; 1405 mg; ~16,7 mmol; ~10,4 ekv.) a paraformaldehyd (245 mg; 8,17 mmol; 5,1 ekv.). Směs byla rozpuštěna v HCl (aq.; 12M, 5 ml) a míchána 2 dny při teplotě 95 °C. Určení konverze reaktantů na produkt bylo provedeno ³¹P NMR spektroskopií. Po vychlazení na laboratorní teplotu byla směs odpařena



do sucha a rozpuštěna v malém množství v H₂O. Nezareagovaná kyselina methylfosfinová a část vedlejších produktů byly odstraněny za použití silného kationtového iontoměníče (DOWEX 50, ~75 ml, H⁺-cyklus), z něhož byly vymyty H₂O. Promytím sloupce pyridinem (10% v/v *aq.*, ~500 ml) byla získána frakce s produktem. Maximálního možného odstranění pyridinu bylo docíleno několikanásobnou destilací s H₂O na rotační vakuové odparce. Následné čištění produktu bylo provedeno flash chromatografií na reverzní fázi C18. Směs byla nanesena v H₂O (3 ml). K eluci byl využit gradient H₂O:MeCN (HPLC kvalita; bez aditiva) 95:5 → 0:100 (20 min) s průtokovou rychlostí mobilní fáze 40 ml·min⁻¹. Po odpaření byl získán produkt v podobě nažloutlého oleje zwitteriontové formy ligandu **HL**³ (~206 mg; ~44 %).

NMR (D₂O, pD~4): ¹H δ 1,32 (CH₃, d, 3H, ²J_{HP} = 14 Hz); 3,10 (CH₂-P, d, 2H, ²J_{HP} = 7 Hz); 4,35 (CH₂-N-CH₂, s, 4H); 7,77 (H₈+H₁₀ arom., m, 4H); 8,28 (H₉ arom., t, 2H, ³J_{HH} = 8 Hz); 8,63 (H₇ arom., d, 2H, ³J_{HH} = 6 Hz); ¹³C{¹H} δ 15,1 (CH₃, d, ¹J_{CP} = 93 Hz); 56,0 (CH₂-P, d, ¹J_{CP} = 102 Hz); 58,6 (CH₂-N-CH₂, d, ³J_{CP} = 7 Hz); 125,4 (C₈ arom., s); 126,2 (C₁₀ arom., s); 143,0 (C₇ arom., s); 144,6 (C₉ arom., s); 153,6 (C₅ arom., s); ³¹P{¹H} δ 43,6 (s).

MS: (-) 290,1 [M-H⁺].

(+) 292,3 [M+H⁺]⁺; 314,3 [M+Na⁺]⁺.

TLC (EtOH-NH₄OH 50:1): R_f ~ 0,3.

HPLC: t_R ~ 7,4 min (metoda M₁).

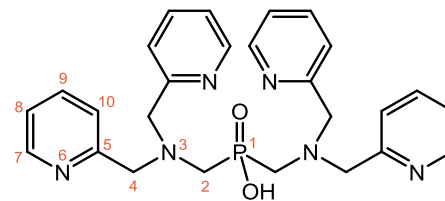
fac-[Ni₂(L³)₂(NCS)₂]

Vodný roztok ligandu **HL**³ (0,77 mM; 0,367 ml; 0,283 mmol; 1,0 ekv.) byl přidán k roztoku Ni(NCS)₂ (49,1 mg; 0,281 mmol; 1,0 ekv.) ve vodě (450 μl). Směs byla důkladně promíchána a převrstvena *i*-PrOH. Po čtyřech dnech byly vzniklé krystaly odfiltrovány na S4 fritě a promyty Et₂O. Po dosušení na vysokém vakuu bylo získáno 128 mg (~56 %) zelenomodrých krystalů.

Bis(*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl)fosfinová kyselina (**3**)

Tento boční produkt vznikl dlouhodobým stáním (měsíce) v koncentrované zwitteriontové formě látky **HL**². Byl izolován flash chromatografií na reverzní fázi C18 s gradientovou elucí H₂O:ACN (obě složky v HPLC kvalitě) 95:5 → 0:100 (20 min).

Průtoková rychlost mobilní fáze činila 40 ml·min⁻¹. Frakce s produktem byla odpařena do sucha za zisku oranžově zbarvené tuhé látky (**3**).



NMR (D₂O, pD~5): ¹H δ 2,85 (CH₂-P, d, 4H, ²J_{HP} = 9 Hz); 3,87 (CH₂-N-CH₂, s, 8H); 7,31 (H₈, m, 4H); 7,34 (H₁₀, d, 4H, ³J_{HH} = 8 Hz); 7,77 (H₉, td, 4H, ³J_{HH} = 8 Hz, ⁴J_{HH} = 2 Hz); 8,33 (H₇, dm, 4H, ³J_{HH} = 5 Hz); ¹³C{¹H} δ 54,4 (CH₂-P, d, ¹J_{CP} = 105 Hz); 61,1 (CH₂-N-CH₂, d, ³J_{CP} = 7 Hz); 124,3 (C₈, s); 125,4 (C₁₀, s); 140,3 (C₇, s); 147,1 (C₉, s); 156,9 (C₅, s); ³¹P{¹H} δ 34,9 (s).

MS: (-) 487,0 [M-H⁺].

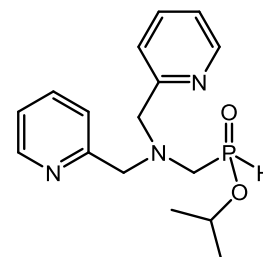
(+) 489,1 [M+H⁺]⁺; 511, 1 [M+Na⁺]⁺; 527,1 [M+K⁺]⁺.

TLC (EtOH-NH₄OH 7:1): R_f ~ 0,6.

HPLC: t_R ~ 8,5 min (metoda M₁).

Isopropylester kyseliny *N,N*-bis(2-pyridylmethyl)aminomethylfosfinové (**6**)

Látka **HL**² (553 mg, 2,0 mmol, 1,0 ekv.) byla rozpuštěna v ACN (~100 ml) a sušena pomocí bezvodého MgSO₄, který byl následně odfiltrován přes S4 fritu. Filtrát byl odpařen do sucha a opakovaně s ACN, nakonec byl získaný odparek rozpuštěn v ACN (~20 ml) a byl k němu přidán *i*-PrOH (230 μl, 3,0 mmol, 1,5 ekv.). Reakce byla zahájena jednorázovým přidavkem EDC·HCl (577 mg, 3,0 mmol, 1,5 ekv.) a ponechána míchat při laboratorní teplotě. Po 30 minutách bylo dosaženo kvantitativní konverze (kontrolováno pomocí ³¹P NMR spektroskopie) a reakční směs byla odpařena do sucha za sníženého tlaku při teplotě nepřesahující 40 °C. K odstranění zbytkového nezreagovaného *i*-PrOH byla směs ještě třikrát odpařena s CHCl₃. Získaný olej byl rozpuštěn v CHCl₃ (20 ml) a extrahován s vodným roztokem HCl (20 ml, 10 mM, pH = 2,0). Organická fáze byla sušena bezvodým MgSO₄



a filtrována přes skleněnou fritu S3. Filtrát byl odpařen do konstantní hmotnosti za stejných podmínek jako reakční směs. Odparek látky (**6**) měl podobu nažloutlého čirého oleje (534 mg; ~84 %).

NMR (CDCl₃): ¹H δ 1,26 (CH₃, d, 3H, ³J_{HH} = 6 Hz); 1,30 (CH₃, d, 3H, ³J_{HH} = 6 Hz); 3,04 (N-CH₂-P, m, 2H); 3,98 (CH₂-N-CH₂, m, 4H); 4,61 (CH-O, d, 1H, ³J_{HP} = 9 Hz, ³J_{HH} = 6 Hz); 7,04 (P-H, dt, 1H, ¹J_{HP} = 540 Hz, ³J_{HH} = 2 Hz); 7,15 (arom., m, 2H); 7,50 (arom., m, 2H); 7,65 (arom., m, 2H); 8,50 (arom., m, 2H); ¹³C{¹H} δ 23,5 (CH₃, d, ³J_{CP} = 4 Hz); 24,4 (CH₃, d, ³J_{CP} = 4 Hz); 52,7 (N-CH₂-P, d, ¹J_{CP} = 115 Hz); 61,6 (CH₂-N-CH₂, d, ³J_{CP} = 8 Hz); 71,6 (CH-CH₃, d, ²J_{CP} = 7 Hz); 122,5 (arom., s); 123,6 (arom., s); 136,8 (arom., s); 149,1 (arom., s); 158,5 (arom., s); ³¹P δ 32,3 (dt, ¹J_{HP} = 540 Hz).

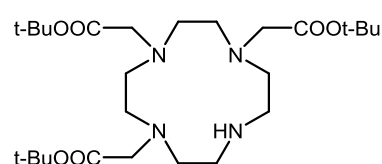
MS: (+) 320,1 [M+H]⁺; 342,0 [M+Na]⁺.

HPLC: *t_R* ~ 6,3 min (metoda M₂);

t_R ~ 8,0 min (metoda M₃).

1,4,7-(tris(*t*-butylkarboxymethyl))-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (**7**) ve formě (**7**)·HBr

Reakce byla prováděna dle postupu známého z literatury.⁹⁵ Do 1000 ml baňky opatřené magnetickým míchadlem bylo naváženo 15,0 g cyclenu (87,6 mmol; 1,0 ekv.) a 39 g NaOAc·3H₂O (287 mmol; 3,3 ekv.).



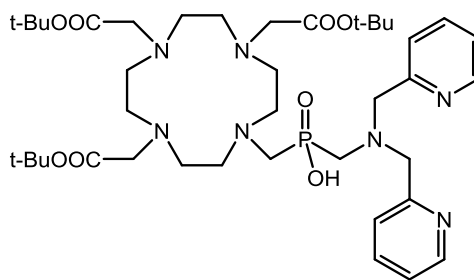
Navážka byla rozpuštěna v DMAc (120 ml) a ponechána míchat po dobu 30 min. Následně byla reakční směs vychlazena na 15 °C ponořením baňky do vodní lázně obsahující led. Za stálého chlazení byl během 45 min přikapán *t*-butylbromacetát (43 ml; 291 mmol; 3,3 ekv.) rozpuštěný v DMAc (45 ml). Reakce byla míchána při laboratorní teplotě, docházelo k vylučování bílé sraženiny. Po třech dnech byla směs ochlazena na -15 °C, byl přidán Et₂O (60 ml) a mícháno 2 hod při této teplotě. Vyloučil se velký podíl sraženiny, který byl odfiltrován na S4 fritě a promyt ledovým DMAc (~50 ml), ledovým Et₂O (~100 ml) a dosušen prosáváním vzduchu. Izolovaná sraženina byla rozpuštěna v CHCl₃ (~300 ml) a promývána s H₂O (3×50 ml). Organické frakce byly spojeny a sušeny pomocí bezvodého MgSO₄. Po filtraci MgSO₄ přes S4 fritu byl filtrát odpařen na rotační vakuové odparce. K získanému transparentnímu oleji byl následně za míchání přilit hexan (~200 ml).

Po několika minutách začal produkt krystalizovat. Po 4 hodinách míchání byla směs vychlazena na $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a míchána ještě 2 hod. Následně byla chlazena přes noc na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Druhý den byly vzniklé krystaly odfiltrovány na S3 fritě. Bylo získáno 30,7 g (59 %) bílého lehkého prášku látky **(7)**·HBr.

NMR (CDCl_3): ^1H δ 1,45 (CH_3 , s, 9H); 1,46 (CH_3 , s, 18H); 2,87 (CH_2 , bm, 4H); 2,93 (CH_2 , bm, 8H); 3,10 (CH_2 , bm, 4H); 3,30 ($\text{CH}_2\text{-O}$, s, 2H); 3,34 ($\text{CH}_2\text{-O}$, s, 4H) $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ δ 28,1 (CH_3 , 6C); 28,2 (CH_3 , 3C); 47,5 (CH_2 , 2C); 48,7 ($\text{CH}_2\text{-CO}$, 1C); 49,1 (CH_2 , 2C); 51,3 (CH_2 , 2C); 51,4 (CH_2 , 2C); 58,1 (CH_2 , 2C); 81,7 ($\text{C-(CH}_3)_3$, 1C); 81,9 ($\text{C-(CH}_3)_3$, 2C); 169,8 ($\text{CH}_2\text{-CO}$, 1C); 170,5 ($\text{CH}_2\text{-CO}$, 2C).

MS: (+) 515,5 [$\text{M}+\text{H}^+$] $^+$.

1,4,7-(tris(*t*-butylkarboxymethyl))-10-(*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)amino)methylfosfinát)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (8**) ve formě **(8)**·5TFA·H₂O**



Látka **HL**₂ (334 mg; 1,20 mmol; 1,3 ekv.) byla vysušena pod vysokým vakuem a společně s *t*-BuDO3A·HBr (555 mg, 932 μmol ; 1,0 ekv.) rozpuštěna v suchém pyridinu (~8,5 ml). Následně byl přidán BnOH (479 μl ; 4,62 mmol; 5,0 ekv.), $(\text{CH}_2\text{O})_n$ (284 mg; 9,47 mmol; 10,2 ekv.) a EDC·HCl (530 mg; 2,76 mmol; 3,0 ekv.). Suspensní směs byla míchána 2 dny při teplotě $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakce byla považována za dokončenou na základě analýzy reakční směsi ^{31}P NMR spektroskopii. Po vychlazení na laboratorní teplotu byly pomocí stříkačkového mikrofiltru (0,22 μm) filtrovány nerozpuštěné složky. Filtrát byl odpařen do sucha a třikrát s ACN (~5 ml), aby bylo odstraněno maximální možné množství pyridinu. Odparek byl sušen 2 hod pod vysokým vakuem při teplotě $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ za účelem odstranění nezreagovaného BnOH. Úbytek alkoholu byl sledován ^1H NMR. Získaný tuhý olej sytě hnědé barvy byl rozpuštěn v ACN (~4 ml) a nanesen na flash chromatografickou kolonu s reverzní stacionární fází C18. K separaci byla využita metoda s následujícím průběhem eluce H₂O:ACN (obojí s obsahem

0,2 % CF₃COOH) 97:3 → 97:3 (2 min), 97:3 → 0:100 (15 min), 0:100 → 0:100 (3 min) a průtokovou rychlostí mobilní fáze 40 ml·min⁻¹. Frakce s čistým produktem byly spojeny, naředěny ACN na ~200 ml a lyofilizovány. Produkt byl získán ve formě trifluoracetátové soli a měl podobu pevné bílé látky (**8**) s hygroskopickými vlastnostmi (861 mg; 66 %).

NMR (CDCl₃): ¹H δ 1,44 (CH₃, s, 18H); 1,47 (CH₃, s, 9H); 2,92–3,61 (cyklus + N–CH₂–P, bm, 20H); 3,63–3,95 (N–CH₂–CO, bm, 6H); 4,46 (CH₂–arom., s, 4H); 7,70 (arom., m, 2H); 7,97 (arom., d, 2H, ³J_{HH} = 8 Hz); 8,23 (arom., m, 2H); 8,77 (arom., d, 2H, ³J_{HH} = 6 Hz); ¹³C{¹H} δ 28,1 (CH₃, s); 28,2 (CH₃, s); 49,1–55,5 (cyklus + N–CH₂–P + N–CH₂–CO, bm); 57,9 (CH₂–arom., d, ³J_{CP} = 5 Hz); 84,0 (C–CH₃, bs); 125,5 (arom., s); 127,4 (arom., s); 143,1 (arom., s); 144,7 (arom., s); 153,9 (arom., s); 167,9 (CO, bs) ³¹P{¹H} δ 29,8 (bs).

MS: (+) 803,3 [M+H⁺]⁺; (+) 825,3 [M+Na⁺]⁺; (+) 840,9 [M+K⁺]⁺.

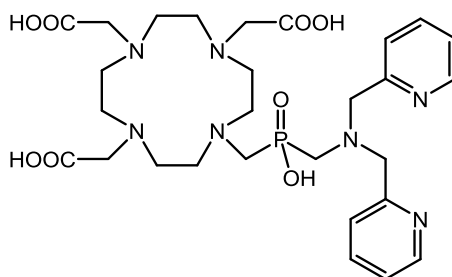
(–) 801,4 [M–H⁺][–]; (–) 839,4 [M–2H⁺+K⁺][–].

EA (C₄₀H₆₆N₇O₈·5TFA·H₂O, M_R = 1392,1): C 43,1 (43,0); H 5,3 (5,2); N 7,0 (7,0).

HPLC: t_R ~ 6,4 min (metoda M₂);

t_R ~ 8,7 min (metoda M₃; široký pík).

1,4,7-(triskarboxymethyl)-10-*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl-fosfinát-1,4,7,10-tetraazacyklododekan **H₄L⁴** ve formě **H₄L⁴·3,5TFA·H₂O**



Látka (**8**)·5TFA·H₂O (794 mg; 570 μmol; 1 ekv.) byla rozpuštěna v TFA (40 ml, ~392 mmol, 690 ekv.) a směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. TFA a zbytky isobutenu byly odstraněny na rotační vakuové odparce odpařením do sucha a opakovaně s H₂O. Odparek byl rozpuštěn v H₂O (~150 ml) a lyofilizován. Lyofilizát měl podobu bílé houbovitě látky a představoval trifluoracetátovou sůl **H₄L⁴** (583 mg; 97 %).

NMR ($D_2O+CsOD$, $pD \geq 13$): 1H δ 2,38–3,04 (*cyklus* + CH_2-P-CH_2 , bm, 20H); 3,19 (CH_2-CO , m, 6H); 3,87 (CH_2 -arom., s, 4H); 7,34 (*arom.*, m, 2H); 7,59 (*arom.*, d, 2H, $^3J_{HH} = 8$ Hz); 7,84 (*arom.*, td, 2H, $^3J_{HH} = 8$ Hz, $^4J_{HH} = 2$ Hz); 8,41 (*arom.*, dm, 2H, $^3J_{HH} = 5$ Hz); $^{13}C\{^1H\}$ δ 50,2 (*cyklus*, s); 50,7 (*cyklus*, s); 51,1 (*cyklus*, s); 51,4 (*cyklus*, s); 53,6 (CH_2-P , d, $^1J_{CP} = 96$ Hz); 55,5 (CH_2-P , d, $^1J_{CP} = 102$ Hz); 58,9 (CH_2-CO , s); 59,0 (CH_2-CO , s); 62,0 (CH_2 -arom., d, $^3J_{CP} = 7$ Hz); 123,6 (*arom.*, s); 125,2 (*arom.*, s); 138,7 (*arom.*, s); 148,5 (*arom.*, s); 158,7 (*arom.*, s); 178,9 (CO, s); 179,3 (CO, s) $^{31}P\{^1H\}$ δ 36,2 (s).

MS: (+) 636,1 $[M+H^+]^+$; (+) 658,1 $[M+Na^+]^+$; (+) 674,1 $[M+K^+]^+$.

(-) 634,0 $[M-H^+]^-$; (-) 671,9 $[M-2H^+K^+]^-$.

EA ($C_{28}H_{42}N_7O_8P \cdot 3,5TFA \cdot H_2O$, $M_R = 1053$): C 39,9 (39,8); H 4,6 (4,4); N 9,3 (9,4).

HPLC: Žádná retence.

2.3 POTENCIOMETRICKÉ TITRACE

K potenciometrickým titracím byla využívána deionizovaná voda připravovaná iontovýměnou na přístroji MILIPORE na katedře Analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK (odpor 18,2 Ω).

Odměrné roztoky

Zásobní roztok ligandu H_2L^1 (přibližně 0,02 M přesně) byl připraven kvantitativním převedením navážky do odměrné baňky, jejíž přesný objem byl zjištěn kalibrací H_2O při teplotě 25 $^{\circ}C$, a následným rozpuštěním v H_2O . K přípravě zásobních roztoků ligandů HL^2 a HL^3 bylo využito čerstvě připravených zwitteriontových forem (oleje), které byly naředěny H_2O na přibližnou koncentraci 0,02 M a okyseleny HCl (3%, 1 ekv.), aby nedocházelo k jejich degradaci. Stanovení přesné koncentrace bylo provedeno kvantitativní NMR spektroskopií oproti kyselině maleinové v D_2O jako kalibrovanému externímu standardu ($\delta_H = 6,42$ ppm, kalibrace proti 1,1,2,2-tetrachlorethanu (čerstvě destilován) a 2,3,4,5-tetramethylbenzenu v CCl_4 o známé koncentraci) a titrací roztokem NMe_4OH o známé koncentraci.

Příprava odměrného roztoku NMe_4OH byla zahájena rekrystalizací NMe_4Cl , který byl následně nanesen na sloupec aniontového iontoměniče (DOWEX 1, OH^- -cyklus), z něhož

byl eluován převařenou vodou. Získaný roztok byl filtrován s aktivním uhlím. Faktor odměrného roztoku byl stanoven na rekrystalizovaný ftalát draselný.

Kyselé pH na počátku titrace bylo vytvořeno pomocí HCl (přibližně 0,03 M přesně). Iontové síla byla udržována pomocí NMe_4Cl (0,1 M).

Komplexometrickou titrací roztokem Chelatonu III byly stanoveny koncentrace zásobních roztoků $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ na hodnotu přibližně 0,5 M přesně a zásobních roztoků CuCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ na hodnotu přibližně 0,6 M přesně.

Teoretický základ a praktické provedení

Aparatura využívaná k provedení potenciometrických titrací byla temperována na konstantní teplotu $25 \pm 0,1$ °C. Titrace byly provedeny přibližně v rozmezí pH 1,5–11,5. V případě, že na počátku titrace nebylo v roztoku přítomno dostatečné množství volného kovu (~10 %), bylo počáteční pH sníženo přidávkem koncentrovanějšího roztoku HCl (přibližně 0,2 M přesně). Horní hranice intervalu pH, v němž bylo titrováno, byla v některých případech vymezena vylučováním hydroxidu příslušného kovu.

Roztoky byly do titrační cely přidávány pomocí byret s mikrometrickými šrouby (VŠCHT Pardubice, META Brno). Koncentrace ligandu na počátku titrace byla přibližně 0,004 M přesně a objem roztoku činil ~5 ml. Inertní atmosféra nad hladinou byla udržována nepřetržitým přívodem argonu syceného vodní parou průchodem přes NMe_4Cl o koncentraci 0,1 M.

Koncentrace H^+ iontů v roztoku byla sledována kombinovanou skleněnou elektrodou (s referenční argentchloridovou elektrodou) GK 240 C a potenciál byl měřen pH metrem PHM 240 v režimu voltmetr. Odměrný roztok NMe_4OH o koncentraci ~0,2 M přesně byl přidáván automatickou byretou ABU 900 o výtlačném objemu 2 ml.

Před zahájením měření byla pracovní elektroda opakovaně ponořena do vodného roztoku HCl (~0,1 M) a vodného roztoku KOH (~0,1 M) za účelem zrychlení odezvy na změnu koncentrace H^+ iontů. Ke zjištění parametrů elektrody byly prováděny kalibrační titrace (do pracovních nádob pipetováno ~2,5 ml H_2O a ~2,5 ml vodného roztoku HCl). Titrace ligandu a systémů ligand:kov v poměrech 1:1 a 2:1 byly provedeny v triplikátech (pokud se některé z měření viditelně odchylovalo, provedlo se další opakování). Mezi jednotlivé titrace byla vždy vložena kalibrační titrace, jak je uvedeno výše.

U každého titračního systému byla nejprve provedena tzv. poloautomatická titrace za účelem sledování rychlosti, s jakou se ustanoví rovnovážné napětí po přidavku odměrného roztoku. Získaná data sloužila k sestavení cyklu programových příkazů, které řídily průběh automatické titrace. Titrační křivka se v závislosti na konkrétním systému sestávala přibližně ze 40 až 60 experimentálních bodů ($E/V(\text{NMe}_4\text{OH})$). Oblast ekvivalence byla řešena vyššími přídávky titračního roztoku, neboť hodnoty potenciálu jsou zde zatíženy velkou chybou.

Data byla matematicky vyhodnocena programovým balíkem OPIUM⁹⁶. Disociační konstanty ligandu a konstanty stability jednotlivých koordinačních systémů byly získány nelineární regresí metodou nejmenších čtverců.

Disociaci obecné vícesytné kyseliny H_nL lze popsat rovnicí (2.1). Hodnota disociační konstanty se nejčastěji udává jako $\text{p}K_a$ ($\text{p}K_a = -\log K_a$). Na děj vyjádřený rovnicí (2.1) lze nahlížet také jako na protonizaci částice $(\text{H}_{n-1}\text{L})^-$. Vzhledem ke složitosti výpočtu aktivitních koeficientů se při konstantní iontové síle v literatuře obvykle zavádějí tzv. koncentrační protonizační konstanty dle vztahu (2.2).



$$\beta_n = [\text{H}_n\text{L}] / [\text{H}^+] \cdot [(\text{H}_{n-1}\text{L})^-] \quad (2.2)$$

Z protonizačních konstant β_n lze konstantu $\text{p}K_a$ získat výpočtem (2.3).

$$\text{p}K_a = \log \beta_n - \log \beta_{(n-1)} \quad (2.3)$$

Konstanty stability komplexů ligandů s kovy lze definovat analogicky (2.4).

$$\beta = [\text{MH}_n\text{L}] / [\text{M}] \cdot [\text{H}]^n \cdot [\text{L}] \quad (2.4)$$

Pomocí vztahu (2.5) vycházejícího z Nernstovy rovnice byly určeny parametry elektrody E_0 , S , J_A , J_B získané kalibrací.

$$E = E_0 + S \cdot \log[\text{H}^+] + J_A \cdot [\text{H}^+] + J_B \cdot K_w / [\text{H}^+], \quad (2.5)$$

kde E_0 je standardní elektrodový potenciál, S je Nernstova konstanta, parametry J_A a J_B představují odchýlení od lineární závislosti $E / -\log[\text{H}^+]$ v silně kyselé a silně zásadité oblasti ($\text{pH} < 2$ nebo > 12), K_w je iontový součin vody. Hodnota záporného dekadického logaritmu iontového součinu vody $\text{p}K_w$ 13,81 pro $I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ M}$ při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a konstanty stability hydroxidokomplexů použitých iontů kovů byly převzaty z literatury.⁹⁷

2.4 SPEKTROSKOPIE V ULTRAFIALOVÉ A VIDITELNÉ OBLASTI

Spektra komplexů v roztoku byla měřena na přístroji Specord 50 PLUS v rozsahu vlnových délek 200–1000 nm s použitím deuteriové a wolframové lampy jako zdroje záření a referencována na kyvetu naplněnou H₂O. Voda používaná pro UV–VIS spektroskopii byla připravena přístrojem MILIPORE. Měření bylo prováděno v 10mm křemenných kyvetách při konstantní teplotě 25 °C. Získaná data byla zpracována v programu WinASPECT PLUS.

Jednotlivé vzorky pro zjištění konstanty stability systémů s Cu²⁺ byly připraveny smícháním roztoku ligandu (200 μL; ~0,02 M přesně), CuCl₂ (60 μL; ~0,6 M přesně), HCl (objem dle potřebného množství H⁺ v roztoku k dosažení požadovaného pH; 1 M a 0,2 M) a takového množství H₂O, aby výsledný objem každého z roztoků činil 1,00 ml.

Vzorky pro změření spekter při pH odpovídajícím maximu zastoupení částic [M(HL¹)] a [ML¹], kde M = Cu, Ni, byly připraveny ve dvou koncentracích smícháním roztoku ligandu (100 μL nebo 10 μL; ~0,02 M přesně) a CuCl₂ (38 μL, resp. 3,8 μL; ~0,05 M přesně) či NiCl₂ (33 μL, resp. 3,3 μL; ~0,06 M přesně) a takového množství H₂O, aby výsledný objem každého z roztoků činil 1,00 ml. Hodnota pH roztoku byla následně upravována pomocí 0,2M NMe₄OH a 0,2M HCl (drobná změna koncentrace zanedbána).

Odrazová spektra komplexů v pevné fázi byla změřena na přístroji Agilent Cary 4000 v rozsahu vlnových délek 300–900 nm. Reference byla provedena na lisovaný pevný materiál dodaný od výrobce. Vzorky pro tato měření byly připraveny rozetřením krystalů na jemný prášek a umístěním mezi dvě krycí sklička tak, aby v homogenní vrstvě pokrývaly plochu ~2 cm².

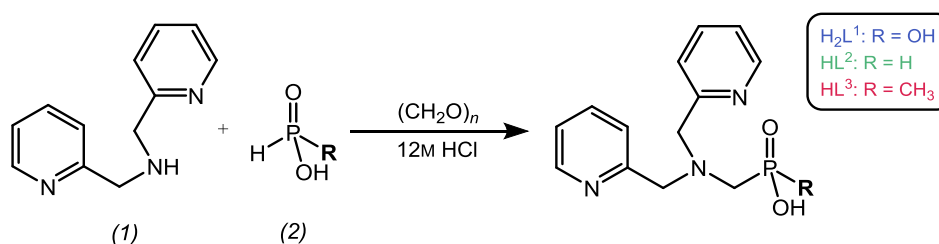
2.5 NMR TITRACE

NMR spektra byla pořízena na přístroji Bruker Avance III 400. Jednotlivé vzorky byly připraveny rozpuštěním ligandu (~11 mg) v 0,5 ml H₂O s 10% přídavkem D₂O a potřebných hodnot pH bylo dosaženo přídavkem CsOH (1% a 10%). K měření pH byla využita kalibrovaná kombinovaná skleněná elektroda Mettler Toledo s pH metrem JENWAY 3505. Spektrometr byl v průběhu měření temperován na teplotu 25 °C, iontová síla nebyla upravována. Byla měřena spektra pro ¹H, ¹³C, a ³¹P{¹H}. Naměřená data byla následně zpracována programem OPIUM.⁹⁶

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 SYNTETICKÁ ČÁST – ZÁKLADNÍ LIGANDY

Ligandy $\mathbf{H_2L^1}$, $\mathbf{HL^2}$, $\mathbf{HL^3}$ byly připraveny Kabachnik-Fields reakcí DPA (1), paraformaldehydu a odpovídající kyseliny fosforu (2) (Obr. 3.1). Reakční mechanismus je obdobný jako u Mannichovy reakce (často nese označení reakce Mannichova typu). Nejprve dochází k *in situ* generaci iminiové částice reakcí aminu s formaldehydem, na kterou se následně aduje nukleofil v podobě kyseliny fosforu.

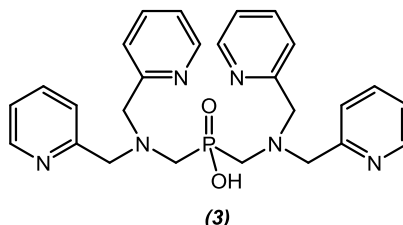


Obr. 3.1 Reakční schéma přípravy základních ligandů.

Klíčovou roli z hlediska konverze reaktantů na produkt a čistoty získané reakční směsi při syntéze ligandu $\mathbf{H_2L^1}$ hrál velký nadbytek fosforové vstupní komponenty H_3PO_3 (~10 ekv.). Využití 96% EtOH jako rozpouštědla běžně používaného na tyto typy reakcí nevedlo k příznivému výsledku. Velmi dobře se osvědčilo provedení v prostředí HCl, která byla zkoušena ve dvou koncentracích (6M a 12M). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití koncentrované formy. Při hledání vhodných reakčních podmínek byl podstatný teplotní parametr. Optimem vedoucím k nejvyšším reakčním výtěžkům při syntéze $\mathbf{H_2L^1}$ se ukázalo být 80 °C. Reakce byla studována při změně stechiometrie nejreaktivnější komponenty – paraformaldehydu. Dva ekvivalenty (vzhledem k použitému množství aminu) jsou hraniční hodnotou, při které je stále ještě podporován vznik produktu. Větší nadbytek nepřispívá k vyšším výtěžkům reakce, dochází pouze ke vzniku hydroxomethylové formy vstupní fosforové komponenty. Látka $\mathbf{H_2L^1}$ byla připravena ve výtěžku 66% v krystalické formě hydrochloridu, v níž lze skladovat dlouhodobě při pokojové teplotě beze změny vlastností.

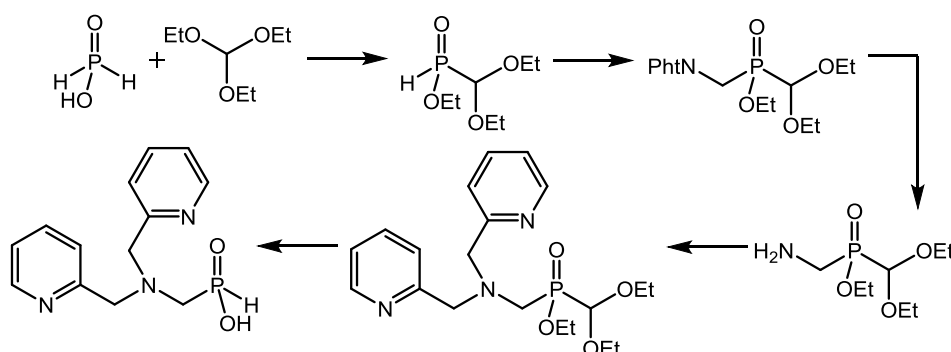
Fosfinátový derivát $\mathbf{HL^2}$ byl rovněž připravován se značným přebytkem H_3PO_2 , jelikož se opět jedná o snadno dostupný fosforový substrát. Reaktivita H_3PO_2 je podstatně vyšší a reakční teplota 30 °C postačuje k optimálnímu průběhu reakce s výtěžkem ~89 %.

V případě tohoto ligandu se nepodařilo připravit krystalickou podobu a lyofilizace vedla pouze k získu viskózního oleje s omezenou stabilitou, který se při delším skladování rozkládá. Majoritním degradačním produktem je látka (3) (**Obr. 3.2**), již se podařilo izolovat a plně charakterizovat z dlouho stojící koncentrované frakce ligandu **HL**².



Obr. 3.2 Majoritní produkt degradace ligandu **HL**².

Ligand **HL**² byl prakticky ve stejné době připraven a jeho syntéza publikována i jinou výzkumnou skupinou.⁸² V publikaci je popsán mnohakrokový postup, při němž byl nejprve z komerčně dostupných substrátů připraven chráněný ethyl(aminomethyl)(diethoxymethyl)-fosfinát, který byl po redukci (zisku primární aminoskupiny) ponechán reagovat s 2-(chlormethyl)pyridinem. Po odstranění chránících skupin na fosforu lze získat konečný produkt, jak naznačuje reakční schéma (**Obr. 3.3**), s celkovým výtěžkem ~8 %.



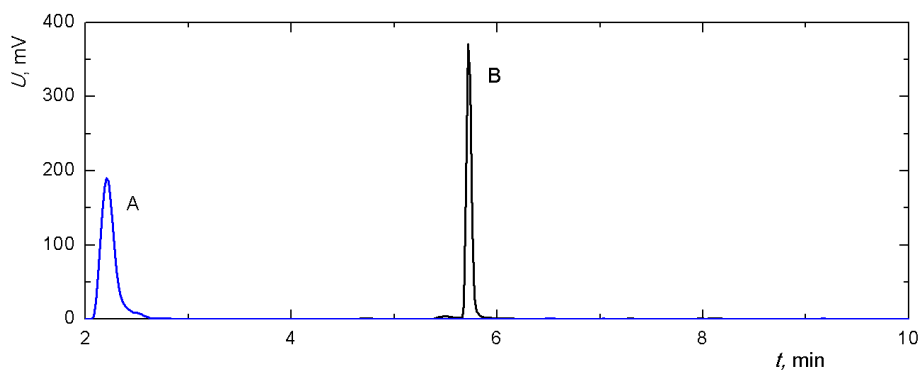
Obr. 3.3 Dříve publikovaná příprava ligandu **HL**².^{82,98}

Námi zvolený syntetický postup se jeví jako elegantní cesta obcházející komplikace a ztráty při jednotlivých reakcích doložené nízkými výtěžky některých dílčích kroků.

Methylfosfinátový analog **HL**³ byl nejprve připravován pouze s malým přebytkem fosforové vstupní komponenty (kyseliny methylfosfinové) z důvodu její horší syntetické dostupnosti. Mnohem výhodnější z hlediska čistoty získané reakční směsi, a tedy časové a materiálové náročnosti kladené na zpracování reakce se však ukázalo využití jejího značného přebytku jako v předešlých dvou případech. Nejvyššího výtěžku bylo na rozdíl

od předešlých syntéz dosaženo použitím pěti ekvivalentů paraformaldehydu. Vznikalo pochopitelně větší množství vedlejšího hydroxomethylového produktu, který ovšem vykazuje značně odlišné fyzikálně-chemické chování, a lze ho tedy snadno separovat na silném kationtovém iontoměniči. Reakční teplota musela být zvýšena až na 95 °C, při nižší teplotě byla pozorována omezená reaktivita vstupní fosforové komponenty. Výrazně se projevovala konkurenčně probíhající reakce, již je methylace vstupního aminu. Substituovaný amin není dále dostupný jako reaktant a výtěžek reakce je tak snížen (~44 %). Této alkylaci se nelze zcela vyhnout a je obecně hlavním důvodem nekvantitativní konverze reaktantů na produkt při syntéze diskutovaných ligandů. U látky **HL**³ byl při skladování v podobě zředěného roztoku v chladu a tmě pozorován poměrně rychlý rozklad, kterému lze předcházet okyselením roztoku pomocí HCl (~1 ekv.).

Připravené ligandy byly podrobeny HPLC analýze za účelem zjištění dalšího charakterizačního údaje pro nové látky. U **HL**² se jednalo rovněž o nalezení potenciálně vhodné purifikační metody pro následné reakce. Použití TFA jakožto aditiva do mobilní fáze (metoda *M*₂) vedlo k protonizaci aminoskupin a v reverzním chromatografickém módu nebyly tyto látky na koloně zadržovány, jak je patrné z **Obr. 3.4** (mrtvý čas analýzy 2 min, detekce při 254 nm). Proto byl jako aditivum mobilní fáze používán acetátový pufr o pH 5,5 (metoda *M*₁), v němž každá z připravených látek vykazuje retenci, což umožňuje jejich čištění pomocí kapalinové chromatografie v reverzním uspořádání (**Obr. 3.4**).



Obr. 3.4 HPLC záznam analýzy **H₂L¹** provedené s TFA jako aditivem (A) a acetátovým pufrům jako aditivem (B), detekce při 254 nm.

3.2 STUDIUM ACIDOBAZICKÝCH VLASTNOSTÍ

Ke studiu acidobazického chování připravených ligandů v roztoku bylo využito potenciometrických a NMR titrací. Fosfonátový analog $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ poskytuje čtyři místa schopná protonizace, jejichž rovnovážné konstanty lze stanovit těmito metodami. Pro ligandy \mathbf{HL}^2 a \mathbf{HL}^3 pak byly potenciometrickými titracemi v titrované oblasti pH (1,5–12,5) nalezeny tři protonizační konstanty. Zjištěné hodnoty jsou shrnuty v tabulce (**Tab. 3.1**).

Potenciometrická titrace jakožto metoda je limitována použitelností skleněné elektrody s dolní hranicí pH kolem 1,5 až 2. Při těchto hodnotách pH není zastoupení částic $[\mathbf{H}_5\mathbf{L}]^{4+}$ ligandu $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$, resp. $[\mathbf{H}_4\mathbf{L}]^{3+}$ derivátů \mathbf{HL}^2 a \mathbf{HL}^3 dostatečné na to, aby bylo možné stanovit disociační konstanty všech teoreticky protonizovatelných skupin.

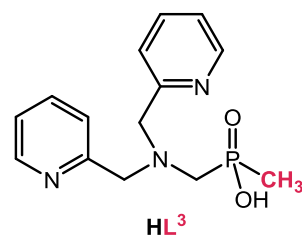
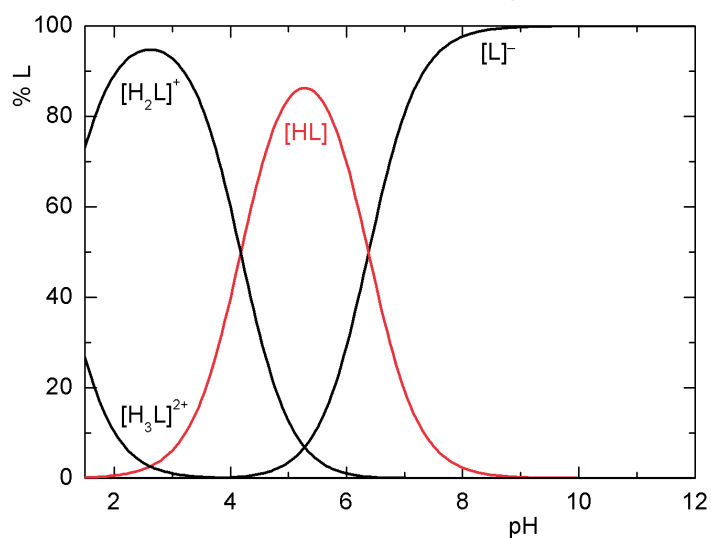
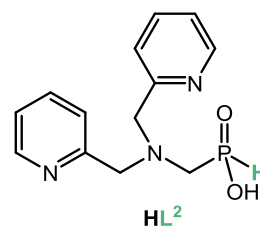
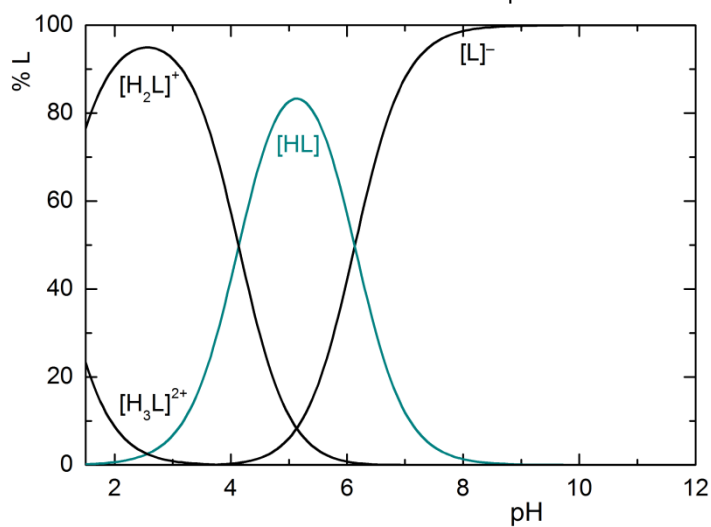
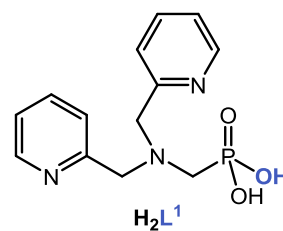
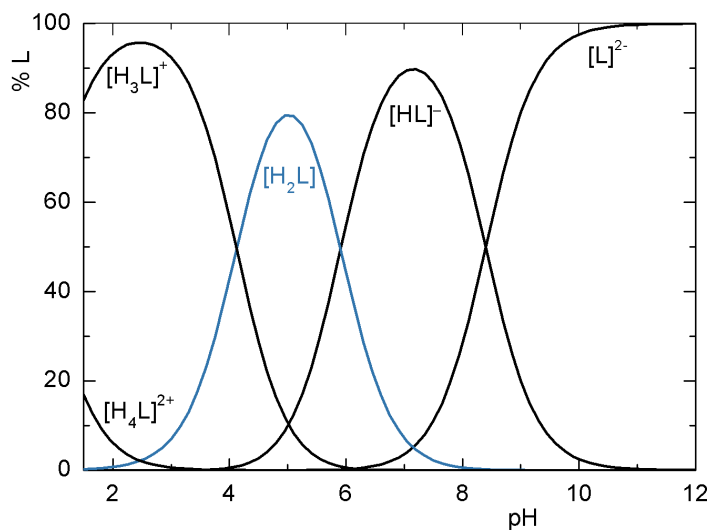
Tab. 3.1 Celkové protonizační konstanty $\log\beta$ a disociační konstanty základních ligandů získané potenciometrickou titrací ($t = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,1\text{ M}$ (NMe_4Cl)).

	$\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$		\mathbf{HL}^2		\mathbf{HL}^3		DPA pK_a
	$\log\beta$	pK_a	$\log\beta$	pK_a	$\log\beta$	pK_a	
[HL]	8,39(1)	8,39	6,13(1)	6,13	6,38(2)	6,38	7,20
[$\mathbf{H}_2\mathbf{L}$]	14,31(1)	5,92	10,27(1)	4,14	10,56(2)	4,18	2,50
[$\mathbf{H}_3\mathbf{L}$]	18,43(1)	4,12	11,62(3)	0,98	11,62(3)	1,06	1,40
[$\mathbf{H}_4\mathbf{L}$]	19,24(4)	0,81	–	–	–	–	–

Fosfonátový derivát $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$ vykazuje dle očekávání vyšší hodnotu první protonizační konstanty v porovnání s fosfinátovým \mathbf{HL}^2 a methylfosfinátovým \mathbf{HL}^3 analogem, což je dáno rozdílným nábojem fosfonátové a fosfinátové skupiny. Podíváme-li se na samotný strukturální motiv DPA, lze pozorovat obecný trend zvýšení bazicity dusíkového atomu v sousedství fosfonátu (u ligandu $\mathbf{H}_2\mathbf{L}^1$) a snížení v sousedství fosfinátu (u \mathbf{HL}^2 a \mathbf{HL}^3). Změny acidobazických poměrů v molekule se následně odrážejí ve stabilitě vznikajících komplexních sloučenin.

Mezi hodnotami druhých protonizačních konstant fosfinátových derivátů a třetí fosfonátového jsou pouze zanedbatelné rozdíly. To může indikovat, že ke změnám v protonizaci molekuly patrně dochází na pyridinových kruzích a nikoli v blízkosti atomů fosforu.

Ze získaných dat byly sestrojeny distribuční diagramy jednotlivých protonizačních forem ligandů (**Obr. 3.5**). Ty jednak ukazují acidobazické chování látky, a jednak jsou užitečným nástrojem při stanovení vhodného pH pro krystalizační experimenty tak, aby byla majoritně přítomna pouze jedna forma látky.

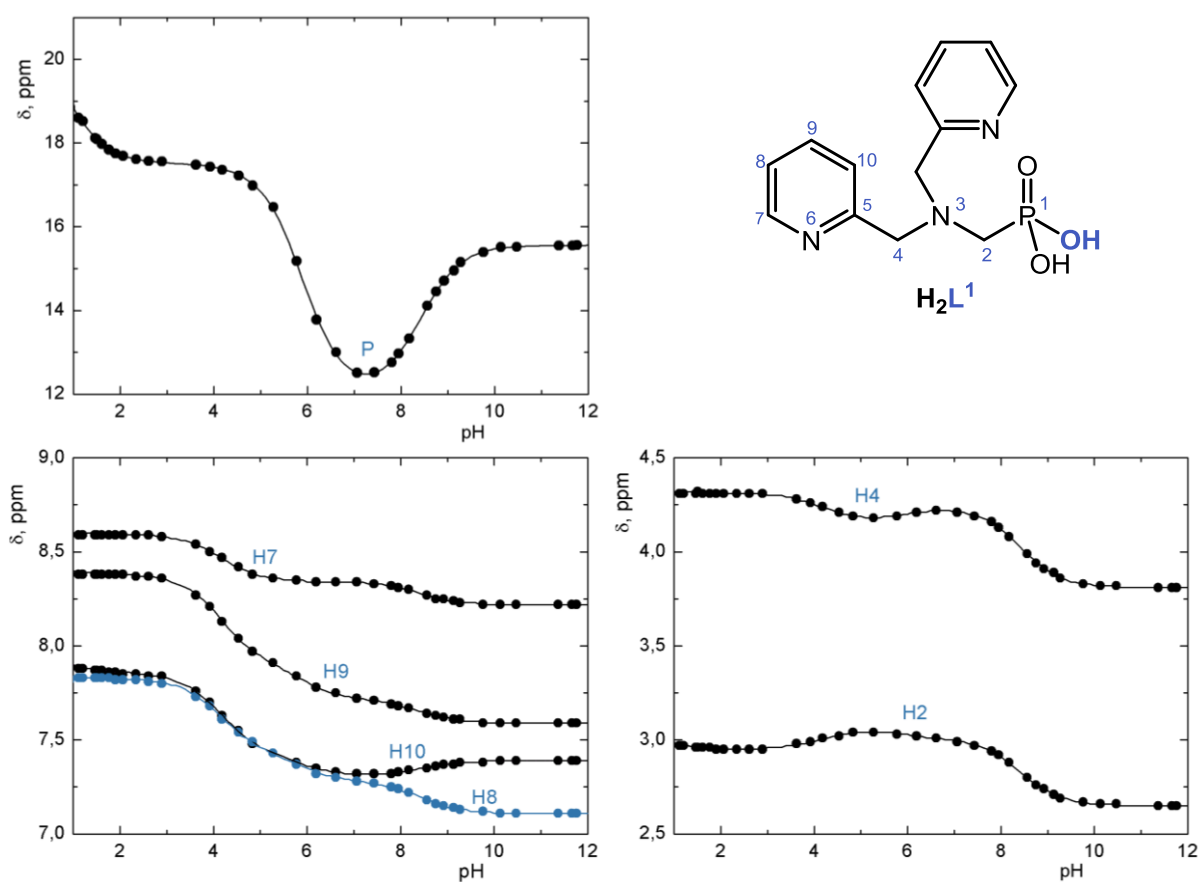


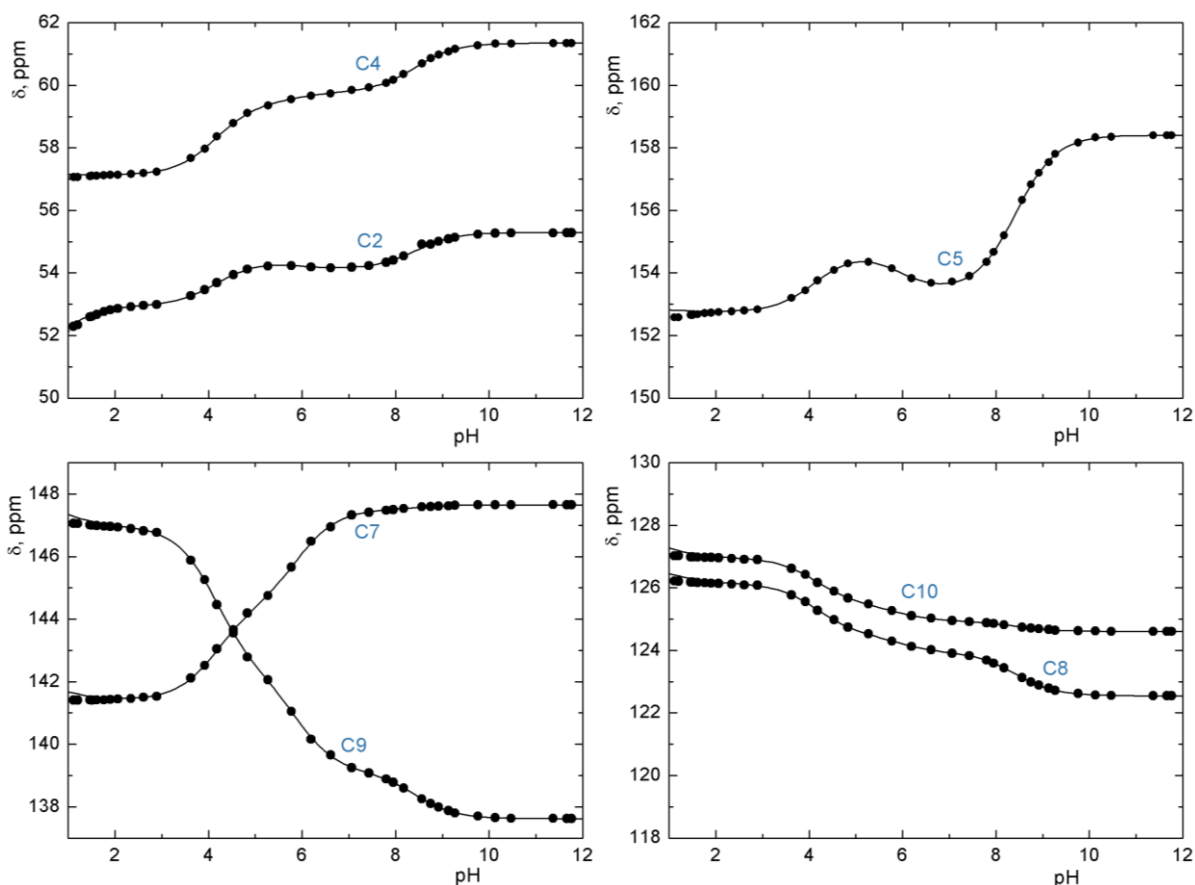
Obř. 3.5 Distribuční diagramy jednotlivých protonizovaných forem ligandů H_2L^1 , HL^2 a HL^3

$c_{\text{lig}} = 0,004 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ M (NMe}_4\text{Cl)}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Je zřejmé, že na počátku titrace dominují vícekrát protonizované formy. S úbytkem množství H^+ iontů v roztoku nabývají na významu jednou/dvakrát protonizované zwitteriontové formy ligandů, které dosahují maximálního zastoupení při $pH \sim 5$. Při pH o jednotku větším se stávají majoritně zastoupenými záporně nabitě deprotonované formy ligandů.

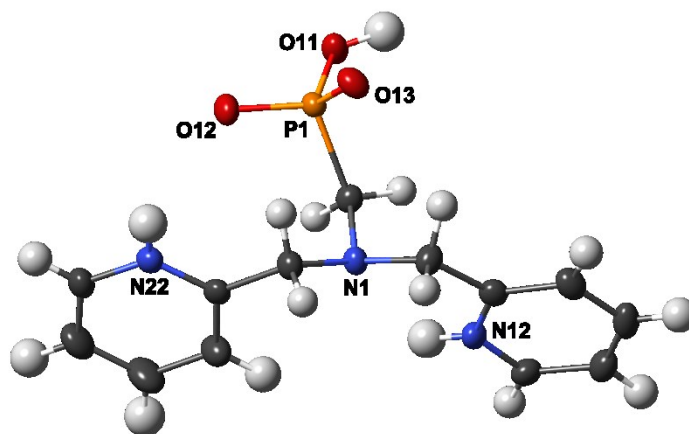
Pro ligand H_2L^1 byla prostřednictvím NMR titrace rozšířena studovaná škála pH o oblast 0–2. Zde dochází ke zvýšení výskytu částice $[H_4L]^{3+}$ na množství potřebné ke spolehlivějšímu stanovení čtvrté protonizační konstanty, která by za použití pouze potenciometrické titrace mohla být stanovena nepřesně. Závislosti posunů jádra ^{31}P a všech jader 1H a ^{13}C v molekule na pH byly vyneseny do grafů (**Obr. 3.6**). Přiřazení jednotlivých signálů bylo provedeno již v rámci charakterizace látek pomocí 2D experimentů – HMBC, HSQC a 1H – 1H COSY.





Obr. 3.6 Závislosti chemických posunů NMR aktivních jader molekuly H_2L^1 na pH roztoku získané provedením NMR titrace, experimentálně zjištěné body jsou proloženy simulovanou titrační křivkou vypočtenou v programu OPIUM⁹⁶ ($c_{\text{lig}} \sim 0,06 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

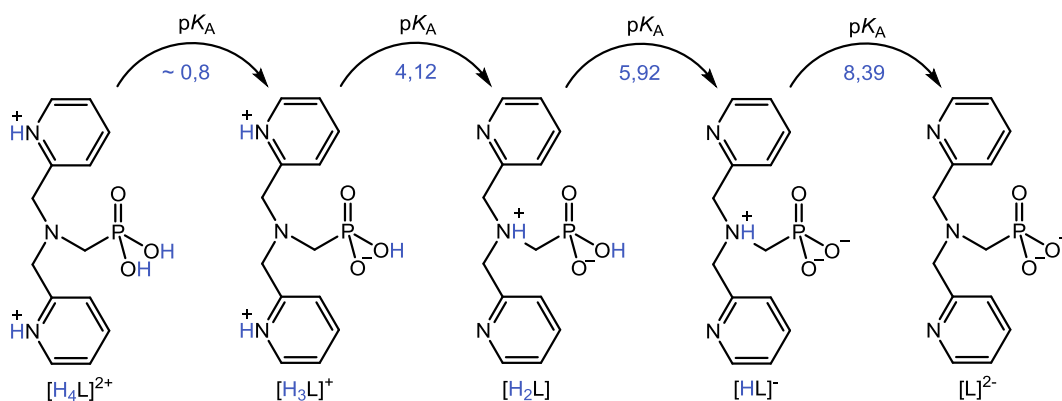
Pokles chemického posunu ^{31}P v oblasti pH $10 \rightarrow 8$ souvisí s protonizací dusíkového atomu v blízkosti fosforového jádra. Tento efekt doprovázený tvorbou intramolekulární vodíkové vazby na fosfonátovou skupinu je znám z literatury.^{99,100} Následný vzrůst v oblasti pH $7 \rightarrow 5$ demonstruje protonizaci hydroxylové skupiny na fosforu, což je typický jev, ke kterému dochází u amimomethylfosfonátů v této oblasti pH. Zatímco na fosforovém jádře nebyla zaznamenána žádná výrazná změna chemického posunu v intervalu pH 2–4, u vodíkových a uhlíkových jader zapojených v aromatickém kruhu je změna jejich chemického okolí patrná. Z toho lze usuzovat, že se bude jednat o protonizaci jednoho z aromatických atomů dusíku doprovázenou přesunem protonu z nejméně bazického atomu dusíku v molekule na druhý aromatický v důsledku obecné tendence molekul separovat co nejvíce náboj. Tato zajímavá skutečnost byla potvrzena získáním struktury v pevné fázi (**Obr. 3.7**).



Obr. 3.7 Krystalová struktura $[\text{H}_3\text{L}^1]^+\cdot\text{Cl}^-\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, molekuly H_2O a Cl^- ionty nejsou pro přehlednost zobrazeny.

Ve struktuře je ligand třikrát protonizován. Na první pohled je patrná protonizace obou aminoskupin zapojených v pyridinových cyklech. Další proton se nachází na jedné z hydroxylových skupin na fosforu. Na každou monomerní jednotku připadají dvě molekuly vody. Kladný náboj struktury je kompenzován chloridovým aniontem.

Na základě získaných dat a znalosti trendů lze navrhnout předpokládané protonizační schéma studovaného ligandu (**Obr. 3.8**). Bazicita sekundárního alifatického dusíku je pochopitelně nejvyšší. Následně se protonizuje jedna z fosfonátových skupin. Při dalším snižování pH najdeme protony vázané na oba dusíkové atomy pyridinových kruhů na úkor deprotonace alifatického dusíkového atomu, jak bylo diskutováno výše. Při $\text{pH} < 1$ jsou dle pozorované tendence změny chemického posunu jader ^{31}P protonizované obě hydroxylové skupiny. Disociační konstanty zjištěné prostřednictvím NMR titrace ($\text{p}K_{\text{a}1} = 8,42$; $\text{p}K_{\text{a}2} = 5,90$; $\text{p}K_{\text{a}3} = 4,15$ a $\text{p}K_{\text{a}4} = 0,83$) vykazují velmi dobrou shodu s hodnotami získanými potenciometricky.



Obr. 3.8 Předpokládané protonizační schéma ligandu H_2L^1 navržené na základě dat získaných NMR titrací, uvedené hodnoty $\text{p}K_{\text{a}}$ byly stanoveny potenciometricky.

3.3 STUDIUM KOORDINAČNÍCH VLASTNOSTÍ

Koordinační chování připravených ligandů bylo zkoumáno potenciometrickými titracemi a UV–VIS spektroskopickými měřeními s vybranými ionty kovů – Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} a Mg^{2+} .

Systémy obsahující Cu^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} byly potenciometricky titrovány ve dvou poměrech ligandu a kovu (1:1 a 2:1 – přebytek ligandu). V žádném z vybraných modelů, které nejlépe simulovaly koordinační vlastnosti látek v roztoku (doprovázeny nejmenší chybou) se nevyskytla částice obsahující dvě molekuly ligandu na jeden iont kovu.

Ligandy jsou dobrými koordinačními činidly iontů přechodných kovů, o čemž svědčí fakt, že ke komplexaci dochází při nízkých hodnotách pH, kdy je systém bohatý na H^+ ionty, s nimiž vybrané ionty přechodných kovů kompetují. To je dáno obecně nízkou bazicitou všech tří dusíkových atomů DPA.

Ke tvorbě komplexů s Cu^{2+} ionty dochází při tak nízkých hodnotách pH, že na počátku titrace při pH 1,5–2 jsou Cu^{2+} ionty téměř kvantitativně zakomplexovány. Modelování nejpravděpodobnějšího systému částic a výpočet jednotlivých konstant stability je ovšem možný pouze za podmínek přítomnosti významného procenta (~20%) volné kovové částice v roztoku na počátku experimentu. Proto bylo třeba ke stanovení konstant stability příslušných komplexů doplnit tyto systémy o data z oblasti pH 0–2 získaná spektrofotometricky. Hodnoty rovnovážných konstant stability komplexů, vypočtené společným zpracováním výsledků potenciometrických titrací a UV–VIS spektroskopie programem OPIUM⁹⁶, jsou uvedeny v tabulce (**Tab. 3.2**).

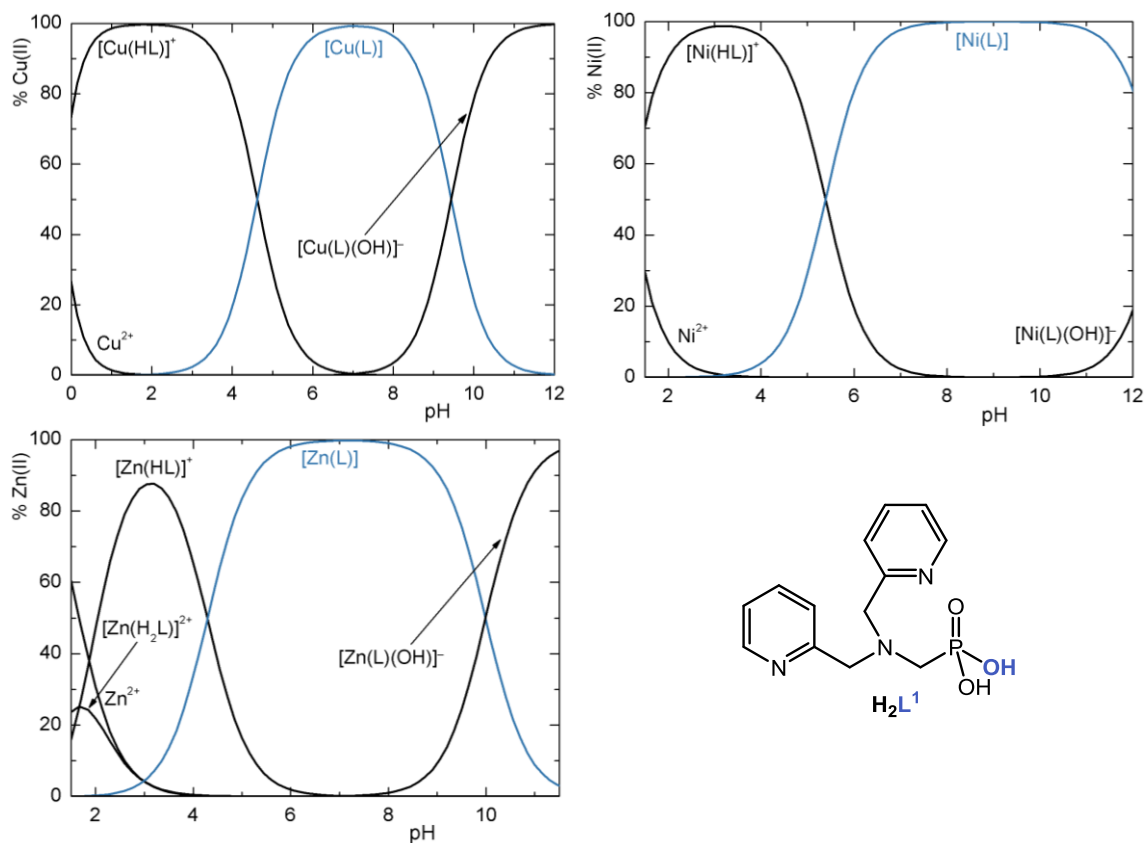
Tab. 3.2 Rovnovážné konstanty stability $\log\beta$ studovaných komplexů ligandů s vybranými ionty kovů ($t = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,1\text{ M}$ (NMe₄Cl)).

	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
H₂L¹					
[M(H ₂ L)]	–	–	19,22(6)	16,97(4)	16,93(4)
[M(HL)]	22,73(3)	18,82(2)	17,55(2)	11,50(5)	11,43(4)
[M(L)]	18,11(3)	13,43(2)	13,26(2)	4,18(4)	4,89(3)
[M(L)(OH)]	8,67(3)	0,80(3)	3,27(3)	–	–
HL²					
[M(HL)]	–	–	10,70(6)	–	–
[M(L)]	14,64(3)	10,94(2)	9,16(1)	< 1	< 1
[M(L)(OH)]	5,84(3)	–0,77(2)	–0,13(2)	–	–
[M(L)(OH) ₂]	–	–	–12,61(4)	–	–
HL³					
[M(HL)]	14,43(2)	–	11,07(9)	–	–
[M(L)]	13,41(3)	10,68(2)	9,61(2)	< 1	< 1
[M(L)(OH)]	4,66(3)	–1,06(3)	0,40(3)	–	–
[M(L)(OH) ₂]	–7,92(3)	–	–11,95(4)	–	–

Ve všech systémech s ionty přechodných kovů jsou v neutrální oblasti pH dominantní částice typu [M(L)]. Fosfonátový derivát poskytuje v oblasti lehce kyselého pH protonizovaný komplex [M(HL)]. Další protonizované částice objevující se v některých systémech při silně kyselém pH vypovídají o rozrušení některé koordinační vazby a vazby protonu na jednu z pyridinových amino- či fosfo(i)nátových hydroxo- skupin.

Koordinační sféra iontu kovu není v bazické oblasti vysycena a je pozorován vznik hydroxidokomplexů [M(L)(OH)]. U systému s fosfonátovým derivátem se toto děje při vyšším pH než-li u systémů s fosfinátovými analogy v důsledku dvou záporně nabitých deprotonovaných skupin. Při silně bazickém pH roztoku se u systémů fosfinátových ligandů se Zn²⁺ a Cu²⁺ ionty se vyskytují dihydroxidokomplexy [M(L)(OH)₂].

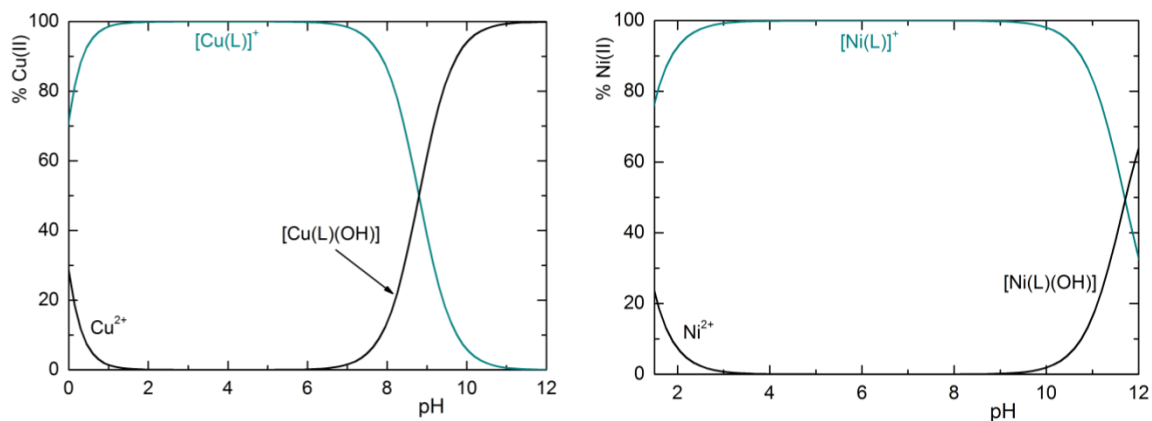
Od pH 11–12 se začínají vylučovat hydroxidy kovů, případná tvorba pevné fáze způsobí kolísání potenciálu elektrody a ztrátu relevance získaných dat. Proto jsou na níže zobrazovaných distribučních diagramech (**Obr. 3.9–3.11**) rozdílné pH škály.

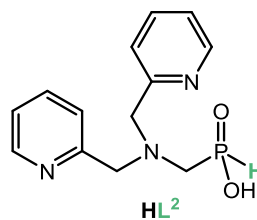
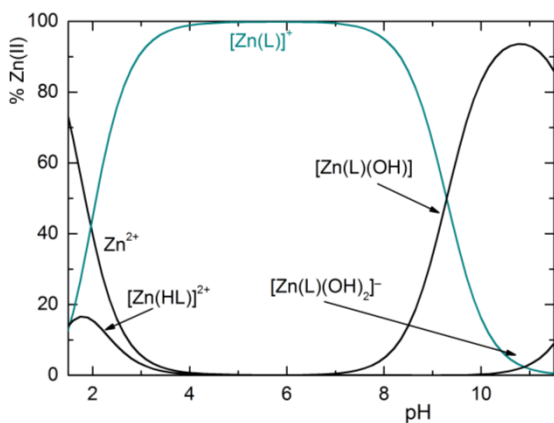


Obr. 3.9 Distribuční diagramy nalezených forem komplexů H_2L^1

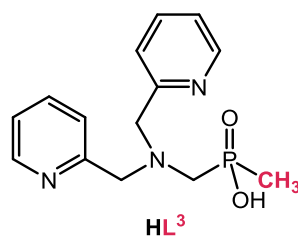
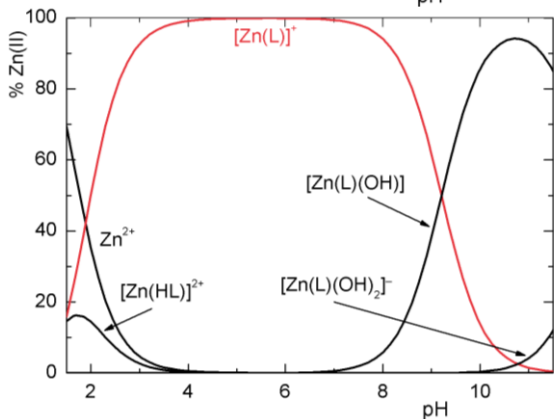
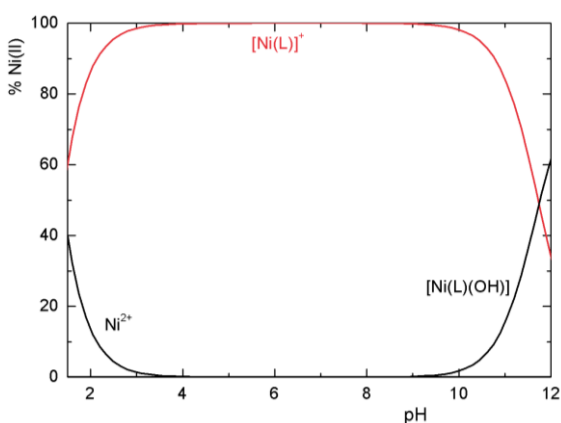
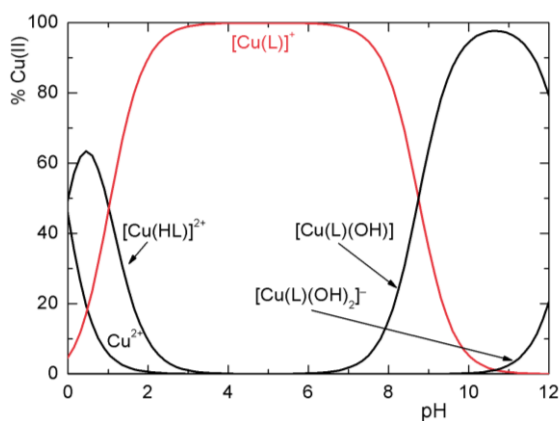
s ionty Cu^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} v závislosti na pH

($c_{\text{lig}} = c_{\text{kov}} = 0,004 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ M (NMe}_4\text{Cl)}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).





Obr. 3.10 Distribuční diagramy nalezených forem komplexů HL^2 s ionty Cu^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} v závislosti na pH
 $(c_{\text{lig}} = c_{\text{kov}} = 0,004 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}, I = 0,1 \text{ M (NMe}_4\text{Cl)}, t = 25 \text{ }^\circ\text{C})$.



Obr. 3.11 Distribuční diagramy nalezených forem komplexů HL^3 s ionty Cu^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} v závislosti na pH
 $(c_{\text{lig}} = c_{\text{kov}} = 0,004 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}, I = 0,1 \text{ M (NMe}_4\text{Cl)}, t = 25 \text{ }^\circ\text{C})$.

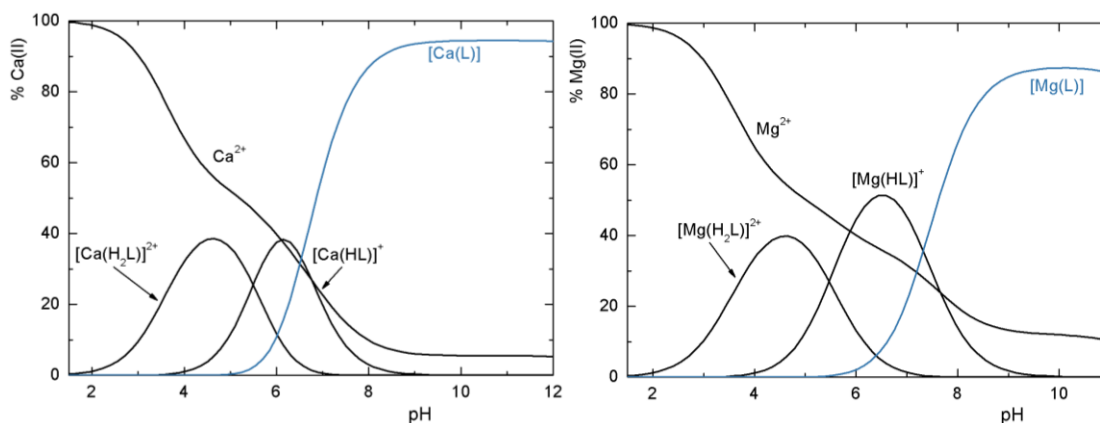
Zkoumané ligandy svým koordinačním chováním následují trend Irwing-Williamsovy řady s převažujícím vlivem dusíkových atomů, kde platí klesající trend hodnot konstant stability v pořadí $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (**Tab. 3.3**). Výjimku tvoří analog H_2L^1 , kde je stabilita komplexů $[\text{Ni}(\text{L})]$ a $[\text{Zn}(\text{L})]$ prakticky totožná, což je dáno koordinačním vlivem kyslíkového atomu fosfonátové skupiny. Obecně jsou hodnoty konstant stability komplexů tohoto ligandu s ionty přechodných kovů vyšší v porovnání s fosfinátovými analogy díky vyšší bazicitě dusíkového atomu a jiným nábojovým poměrům v molekule.

Tab. 3.3 Porovnání konstant stability $\log\beta$ $[\text{M}(\text{L})]$ komplexů jednotlivých studovaných ligandů s vybranými ionty kovů.

Ligand	$\log\beta$		
	$[\text{Cu}(\text{L})]$	$[\text{Ni}(\text{L})]$	$[\text{Zn}(\text{L})]$
H_2L^1	18,1	13,4	13,3
HL^2	14,6	10,9	9,2
HL^3	13,4	10,7	9,6

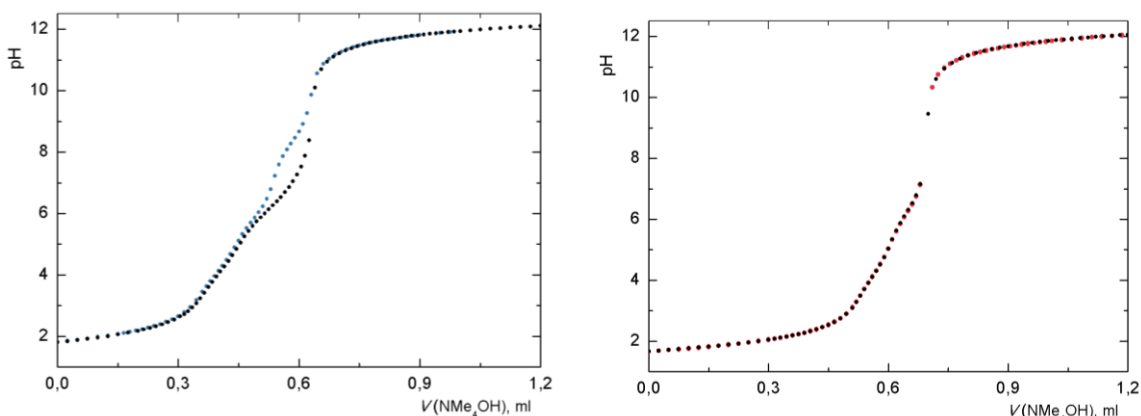
Důraz byl kladen zejména na studium chování nově připravených látek s ionty Zn^{2+} , neboť samotný strukturní motiv DPA je známý a hojně využíván díky preferenci komplexace právě těchto iontů. V biogenním prostředí lze za potenciálně největší interferenty Zn^{2+} iontů považovat ionty Mg^{2+} a Ca^{2+} , proto i s nimi byly provedeny potenciometrické titrace (v poměru ligand:kov 1:1).

V případě ligandu H_2L^1 dochází s ionty kovů alkalických zemin ke tvorbě komplexů s markantně nižšími hodnotami konstant stability než u analogických komplexů s ionty přechodných kovů (**Tab. 3.2**). Ještě ve slabě bazickém prostředí jsou majoritně vzniklými částicemi protonizované komplexy $[\text{M}(\text{HL})]$, přičemž hodnoty protonizačních konstant indikují, že proton je lokalizován na atomu dusíku. To poukazuje na jeho slabou koordinační schopnost a převládající vliv interakce kyslíkových atomů fosfonátu v těchto systémech. Zastoupení částic v titrovaném rozsahu pH je zobrazeno na distribučních diagramech (**Obr. 3.12**).



Obr. 3.12 Distribuční diagramy nalezených forem komplexů H_2L^1 s Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty v závislosti na pH ($c_{\text{lig}} = c_{\text{kov}} = 0,004 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ M (NMe}_4\text{Cl)}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

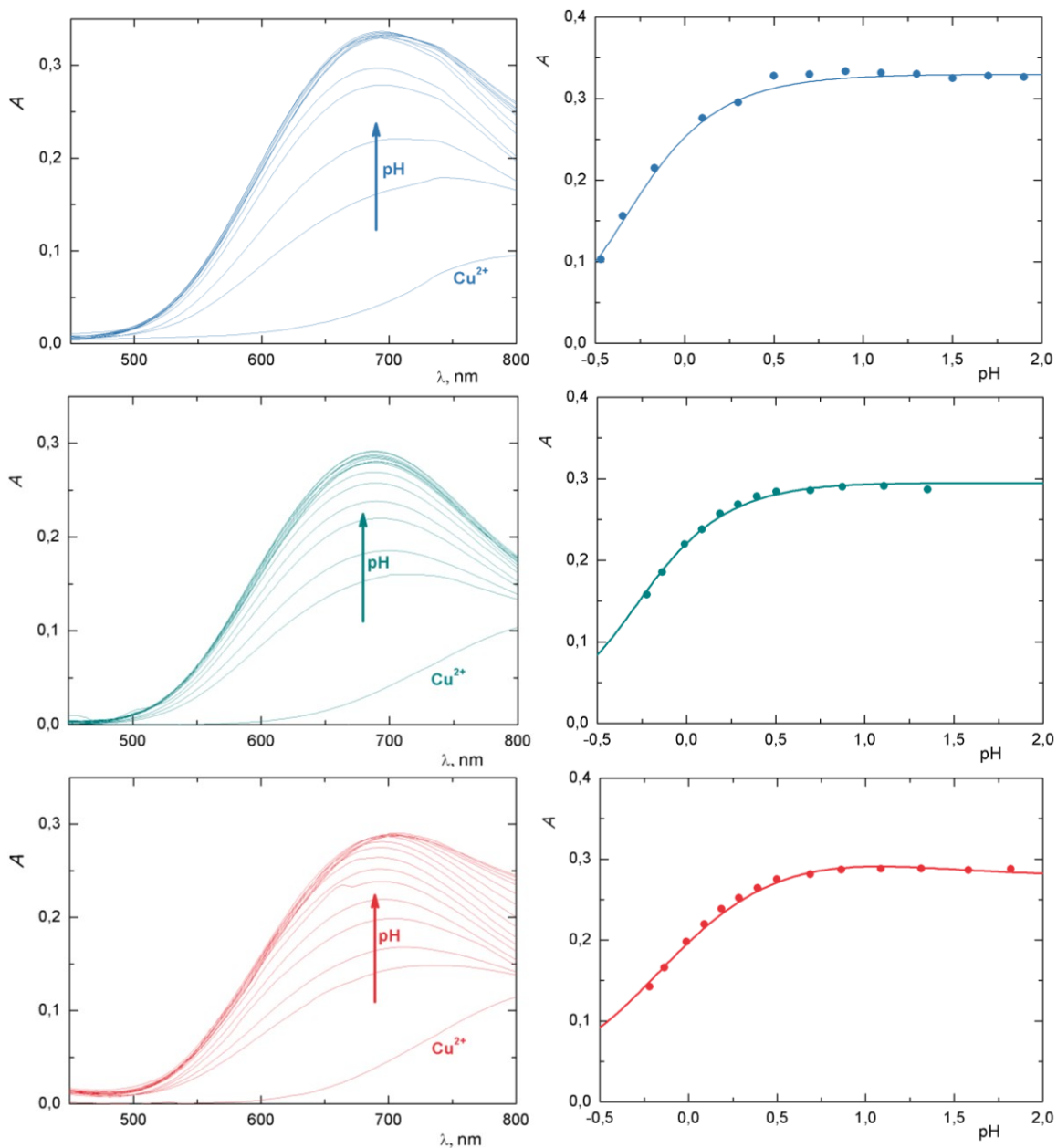
Komplexy ligandů HL^2 a HL^3 s Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty nevznikají, jak je zřejmé např. ze zobrazené titrační křivky systému $\text{HL}^3\text{--Ca}^{2+}$ (**Obr. 3.13**), která se prakticky neliší od titrační křivky samotného ligandu. Příčinou je slabá koordinační schopnost fosfinátových skupin. Žádoucí selektivita vůči Zn^{2+} byla potvrzena, volné Mg^{2+} a Ca^{2+} nepředstavují konkurenci při potenciálních biomedicínských aplikacích.



Obr. 3.13 Titrační křivky ligandu H_2L^1 (vlevo) a HL^3 (vpravo) v přítomnosti Ca^{2+} (barevná) a srovnání s titrační křivkou volných ligandů (černá) ($c_{\text{lig}} = c_{\text{kov}} = 0,004 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ M (NMe}_4\text{Cl)}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Jak již bylo zmíněno, konstanty stability komplexů s Cu^{2+} ionty nemohly být stanoveny potenciometrickou titrací, neboť veškeré ionty jsou již na počátku titrace prakticky kvantitativně komplexovány. Situaci nezlepší ani snížení počátečního pH na hodnotu $\sim 1,5$ použitím silnější kyseliny. Byla tedy provedena spektrofotometrická měření komplexů v UV–VIS oblasti, jejichž průběh zobrazuje **Obr. 3.14**. Oblast nižších vlnových délek,

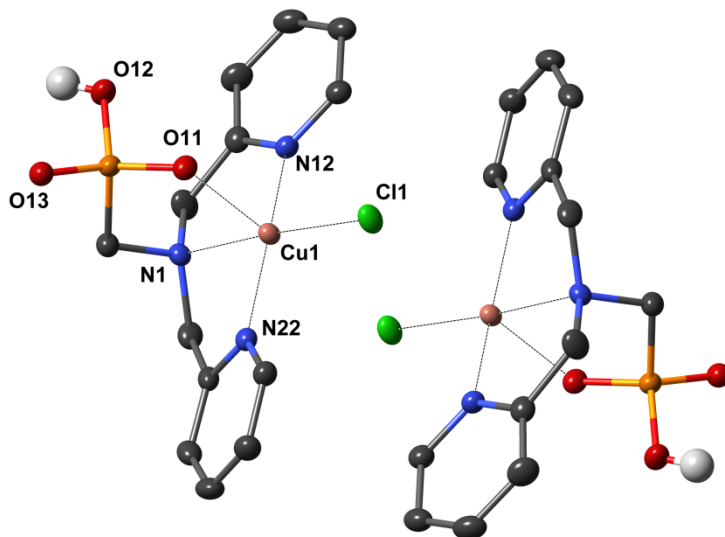
ve které se nacházejí CT přechody, byla rušena absorpcí pyridinových kruhů obsažených v molekule. Byly tedy využity d–d přechody při zvýšené koncentraci ligandu (vykazují zhruba 10× nižší intenzitu než-li CT přechody). Proložení závislosti absorpance na pH při vlnové délce maxima absorpance 680, resp. 695 nm (**Obr. 3.14** – vpravo) bylo následně využito k výpočtům stabilitních konstant.

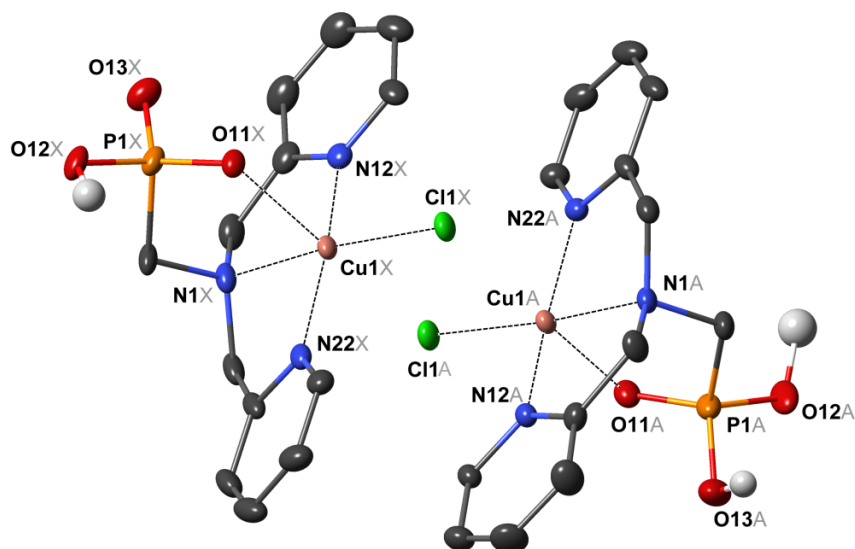


Obr. 3.14 UV–VIS spektra komplexů H_2L^1 , HL^2 a HL^3 (odshora) s ionty Cu^{2+} , vlevo – závislost absorpance komplexu na vlnové délce při proměnlivém pH, vpravo – závislost absorpance komplexu na pH při maximální vlnové délce, experimentální body změřené spektrofotometricky jsou proloženy simulovanou křivkou získanou výpočtem v programu OPIUM⁹⁶ ($c_{\text{lig}} = c_{\text{kov}} \sim 0,004 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Byly provedeny krystalizační experimenty a podařilo se připravit monokrystaly, které reflektují komplexotvorné vlastnosti připravených ligandů v pevné fázi. Získané krystaly byly podrobeny rentgenostrukturní analýze, při níž byly odhaleny dva základní typy koordinačních izomerů. DPA skupiny vykazují v závislosti na iontu kovu zapojeném ve struktuře faciální či meridionální geometrii komplexu.

Komplex fosfonátového ligandu H_2L^1 s Cu^{2+} krystaluje jako dimer s různě protonizovanými formami monomerních jednotek v závislosti na použitém postupu přípravy monokrystalu (**Obr. 3.15**). Přímé donor-akceptorové vazby se v obou případech účastní všechny tři dusíkové atomy DPA, kyslíkový atom fosfonátové skupiny a atom chloru. Na stabilizaci struktur se podílí ještě atom chloru koordinačně vázaný ve druhé dimerní jednotce, který je ovšem příliš vzdálený na to, aby bylo možné použít označení vazba, nicméně umožňuje vznik zobrazených krystalových struktur. Lze tedy konstatovat, že měď je pseudohexakoordinována. U obou komplexů bylo pozorováno meridionální uspořádání, v němž si Cu^{2+} iont vynucuje polohu koordinujících atomů dusíku v ekvatoriální rovině. V obou strukturách dochází v důsledku Jahn-Tellerova efektu k výraznému protažení oktaedru ve směru vazeb O11–Cu–Cl1 (**Tab. 3.4**) podobně jako v případě měďnatého komplexu bisfosfinátového derivátu DPA připraveného v naší laboratoři.¹⁰¹



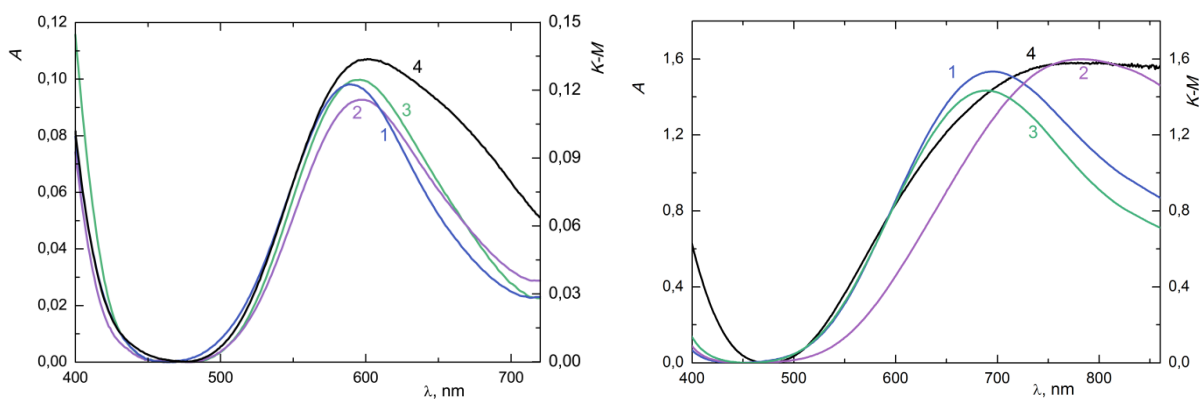


Obr. 3.15 Krystalová struktura $mer\text{-}[\text{Cu}(\text{HL}^1)(\text{Cl})]_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (nahore) a $mer\text{-}[\text{Cu}(\text{HL}^1)(\text{Cl})][\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{Cl})]^+ \cdot \text{Cl}^- \cdot \text{H}_2\text{O}$ (dole), atomy vodíků navázané na atomech uhlíků, nekoordinovaný Cl^- iont a molekuly H_2O nejsou pro přehlednost zobrazeny.

Tab. 3.4 Parametry krystalové struktury $mer\text{-}[\text{Cu}(\text{HL}^1)(\text{Cl})]_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a $mer\text{-}[\text{Cu}(\text{HL}^1)(\text{Cl})][\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}^1)(\text{Cl})]^+ \cdot \text{Cl}^- \cdot \text{H}_2\text{O}$.

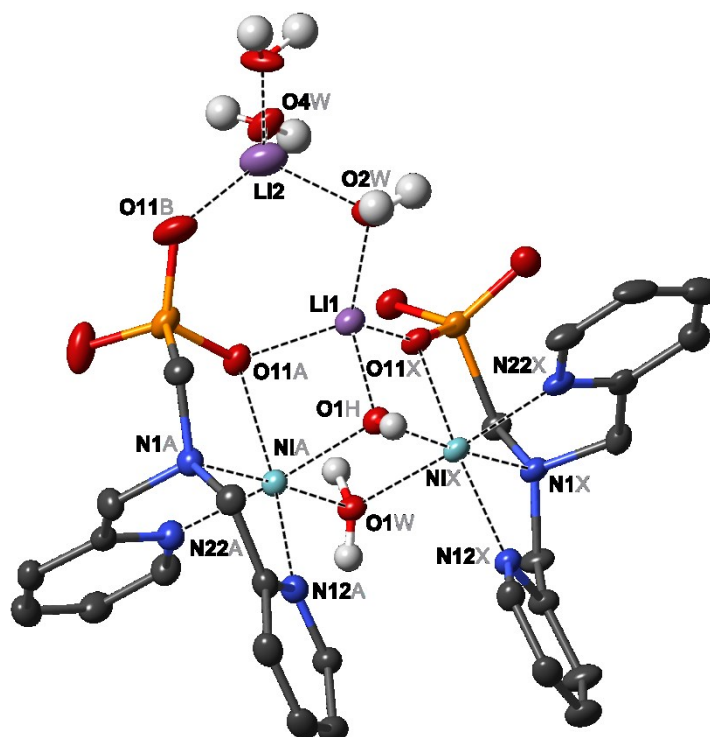
atomy účastníci se koordinací vazby	vzdálenost [Å]	vazebný úhel [°] s atomem				
		N11	O11	O12	N12	
Cu1	N12	1,992(2)	–	–	–	
	N22	1,994(2)	157,75(8)	–	–	
	N1	2,086(2)	83,06(8)	80,94(8)	–	
	Cl1	2,2597(6)	98,51(6)	96,49(6)	175,83(5)	
	O11	2,269(2)	92,23(7)	101,84(7)	85,71(6)	
			N12A	N22A	N1A	O11A
Cu1A	N12A	1,991(4)	–	–	–	
	N22A	1,995(4)	159,9(2)	–	–	
	N1A	2,076(4)	83,0(2)	81,2(2)	–	
	O11A	2,218(3)	94,9(1)	97,3(1)	89,2(1)	
	Cl1A	2,265(1)	97,7(1)	96,7(1)	174,0(1)	
			N12X	N22X	N1X	O11X
Cu1X	N12X	1,988(4)	–	–	–	
	N22X	1,995(4)	162,7(2)	–	–	
	N1X	2,054(4)	83,9(2)	81,4(2)	–	
	O11X	2,245(1)	98,0(1)	95,7(1)	173,6(1)	
	Cl1X	2,388(3)	89,3(1)	98,5(1)	85,5(1)	

Pro získání uceleného pohledu a možnosti porovnání koordinačního chování v roztoku byla proměřena UV–VIS spektra při pH odpovídajícímu maximálnímu zastoupení částic $[\text{HM}(\text{L}^1)]$ a $[\text{M}(\text{L}^1)]$, resp. $[\text{M}(\text{L}^2)]$ u komplexů, které má význam takto spektrofotometricky měřit (s Cu^{2+} a Ni^{2+}). Ve spektrech v systému $\text{Cu}^{2+}-\text{H}_2\text{L}^1$ je patrný značný posun vlnové délky (~ 90 nm) maxima absorpance pro částice $[\text{M}(\text{L})]$ a $[\text{M}(\text{HL})]$. Změnu absorpčního pásu lze vysvětlit odlišnou koordinační schopností monoprotionizované a plně deprotonované formy ligandu H_2L^1 . Monoprotionizovaný fosfonát je slabým donorem elektronového páru a v ekvatoriální rovině nalezneme koordinované N,N,N,O atomy, jak je vidět i ve struktuře výše (**Obr. 3.16**). Plně deprotonovaná fosfonátová skupina projevuje mnohem silnější donorové vlastnosti a koordinační okolí v ekvatoriální rovině se změní na N,N,O,O . Tato skutečnost byla ověřována změřením UV–VIS spektra připraveného komplexu *mer*- $[\text{Cu}(\text{HL}^1)(\text{Cl})]_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ v pevné fázi. Je zřejmé, že v oblasti vlnových délek 500–650 nm kopíruje získané spektrum komplexu v pevné fázi protonizovanou formu komplexu $\text{Cu}^{2+}-\text{H}_2\text{L}^1$ v roztoku. Na informaci poskytovanou detektorem u vyšších vlnových délek, kam pásy bohužel zasahují, se nelze zcela spolehnout. Užitečným nástrojem k posouzení platnosti našich tvrzení byla také spektra komplexu $[\text{M}(\text{L}^2)]$, v nichž se promítá slabá koordinační schopnost fosfinátové skupiny, která odpovídá spíše monoprotionizovanému fosfonátu (**Obr. 3.16** – vpravo).



Obr. 3.16 UV–VIS spektra komplexů ligandů s Cu^{2+} (vpravo) a Ni^{2+} (vlevo) – monoprotionizovaný komplex $[\text{HM}(\text{L}^1)]$ v roztoku (1), plně deprotonovaný komplex $[\text{M}(\text{L}^1)]$ v roztoku (2), deprotonovaný komplex $[\text{M}(\text{L}^2)]$ v roztoku (3) a komplexy $[\text{Cu}(\text{HL}^1)]^+$ resp. $[\text{Ni}(\text{L}^1)]$ v pevné fázi (4) ($t = 25$ °C, pro roztok $c_{\text{lig}} = c_{\text{kov}} \sim 0,02$ mol·dm⁻³).

Oproti tomu UV–VIS spektra systému $\text{Ni}^{2+} - \text{H}_2\text{L}^1$ jsou pro komplex $[\text{M}(\text{L})]$ (pH 8,5) i $[\text{M}(\text{HL})]$ (pH 2,9) obdobná a u obou komplexů lze tedy očekávat totožné koordinační okolí (**Obr. 3.16** – vlevo). Připravená struktura v pevné fázi tvoří dimery a DPA se koordinuje faciálně (**Obr. 3.17**). Koordinační oktaedr je jen mírně deformován (**Tab. 3.5**). Do nejbližšího koordinačního okolí se kromě dusíkových atomů DPA a kyslíkových atomů hydroxylových skupin vázaných na fosforu zapojuje i OH^- anion a můstková molekula vody. Celé uspořádání stabilizuje přítomnost dvou Li^+ iontů. Pás komplexu získaný odrazovou UV–VIS spektroskopií dobře odpovídá spektroskopickému chování komplexu v roztoku (**Obr. 3.16** – vlevo).

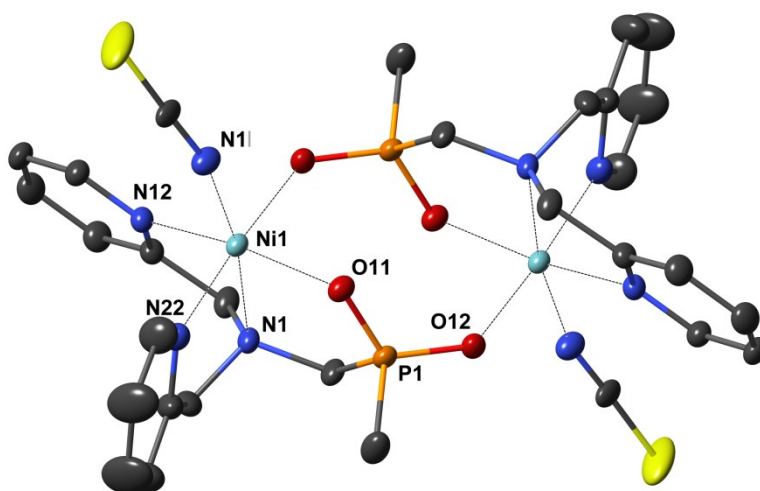


Obr. 3.17 Krystalová struktura $\text{fac-}[\text{Ni}_2(\text{L}^1)_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})\{\text{Li}(\text{H}_2\text{O})\}\{\text{Li}(\text{H}_2\text{O})_2\}]^+(\text{ClO}_4)^- \cdot 11,25\text{H}_2\text{O}$, atomy vodíků navázané na atomech uhlíků, $(\text{ClO}_4)^-$ aniont a nekoordinované molekuly vody nejsou pro přehlednost znázorněny.

Tab. 3.5 Parametry výše zobrazené krystalové struktury
fac-[Ni₂(L¹)₂(OH)(H₂O){Li(H₂O)}{Li(H₂O)₂}]⁺(ClO₄)⁻·11,25H₂O.

atomy účastníci se koordinační vazby	vzdálenost [Å]	vazebný úhel [°] s atomem					
		O1W	O1H	N22A	N12A	O11A	
Ni1A	O1W	2,051(2)	–	–	–	–	–
	O1H	2,059(2)	82,25(6)	–	–	–	–
	N22A	2,065(2)	95,89(7)	174,15(7)	–	–	–
	N12A	2,089(2)	98,94(7)	95,19(7)	90,58(8)	–	–
	N1A	2,146(2)	177,14(7)	100,24(7)	81,77(8)	79,49(8)	–
	O11A	2,181(2)	96,94(6)	83,20(6)	91,54(7)	163,67(7)	84,79(7)
			O1H	N12X	O1W	N22X	N1X
Ni1X	O1H	2,034(2)	–	–	–	–	–
	N12X	2,070(2)	105,25(7)	–	–	–	–
	O1W	2,083(2)	82,07(6)	91,83(7)	–	–	–
	N22X	2,093(2)	98,81(7)	92,43(7)	175,26(7)	–	–
	N1X	2,113(2)	174,32(7)	80,32(7)	96,83(7)	81,84(7)	–
	O11X	2,114(2)	87,48(6)	167,04(7)	87,42(7)	87,97(7)	86,91(7)

I komplex fosfinátového derivátu **HL**³ s hexakooordinovanými Ni²⁺ ionty vykazuje faciální geometrické uspořádání. Koordinační oktaedr je i zde jen mírně deformován (**Tab. 3.6**). Ve vnitřní koordinační sféře Ni²⁺ iontů nacházíme opět všechny dusíkové atomy, atomy kyslíku a navázaný protiiont NCS (**Obr. 3.18**). UV–VIS spektrum tohoto komplexu v roztoku vykazuje vysokou podobnost se spektry komplexů fosfonátového analogu s Ni²⁺, což pravděpodobně vypovídá o stejném koordinačním okolí (**Obr. 3.16**).



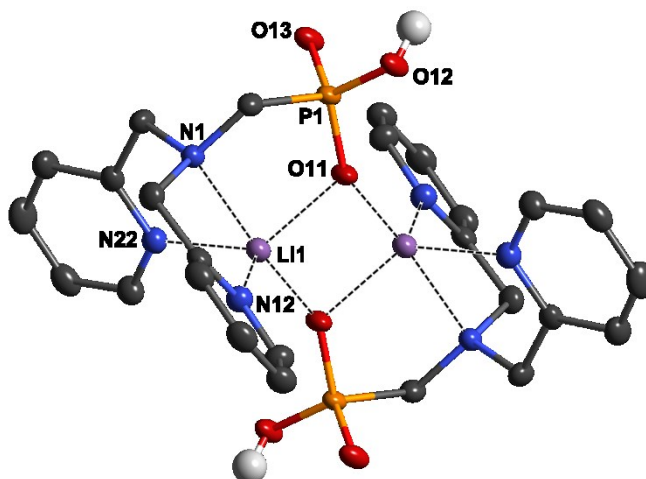
Obr. 3.18 Krystalová struktura *fac*-[Ni₂(L³)₂(NCS)₂],
atomy vodíků navázané na atomech uhlíků nejsou pro přehlednost zobrazeny.

Tab. 3.6 Parametry výše zobrazené krystalové struktury *fac*-[Ni₂(L³)₂(NCS)₂].

atomy účastníci se koordinační vazby	vzdálenost [Å]	vazebný úhel [°] s atomem					
		N1I	O11	O12	N12	N22	
NiI	N1I	2,025(2)	–	–	–	–	–
	O11	2,070(1)	99,40(6)	–	–	–	–
	O12 ^S	2,075(1)	91,66(6)	91,16(5)	–	–	–
	N12	2,079(2)	95,31(6)	165,14(6)	86,32(5)	–	–
	N22	2,100(2)	91,94(7)	86,09(6)	175,79(6)	95,53(6)	–
	N1	2,142(2)	170,09(6)	87,17(5)	95,63(6)	78,52(6)	81,06(6)

^S Symetricky sdružená poloha.

Dále se podařilo získat monokrystal komplexu **H₂L¹** s Li⁺ ionty, které jsou pentakoordinované. Tvoří vazbu s dusíkovými atomy DPA a kyslíkovým atomem fosfonátu jedné molekuly ligandu. Druhý kyslíkový atom je protonizován a vytváří vodíkovou vazbu se sousední dimerní jednotkou (**Obr 3.19**).

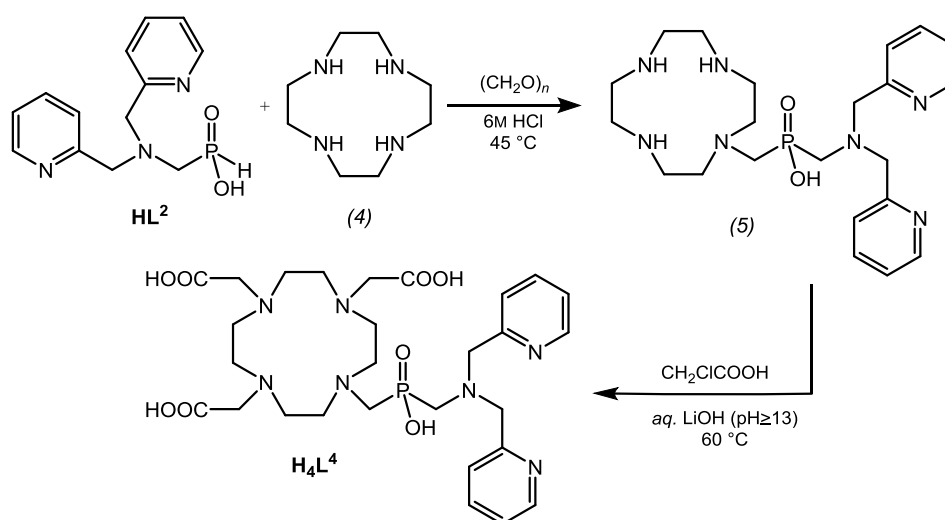
**Obr. 3.19** Krystalová struktura [Li₂(HL¹)₂],

atomy vodíků navázané na atomech uhlíků nejsou pro přehlednost zobrazeny.

3.4 SYNTETICKÁ ČÁST – BIFUNKČNÍ LIGAND

Projekt si dále kladl za cíl přípravu bifunkčního ligandu vazbou připraveného fosfinátového derivátu **HL²** na dusíkový makrocyklus se záměrem možné komplexace dvou různých iontů kovů, z nichž každý by plnil jinou úlohu.

První zvolenou syntetickou cestou bylo navázání připraveného ligandového ramena **HL²** na 1,4,7,10-tetraazacyklododekanový skelet (**4**) Kabachnik-Fields reakcí následované substitucí zbývajících –NH skupin makrocyklu acetátovými skupinami, jak naznačuje **Obr. 3.20**.



Obr. 3.20 Schéma přípravy bifunkčního ligandu „vodnou“ syntetickou cestou.

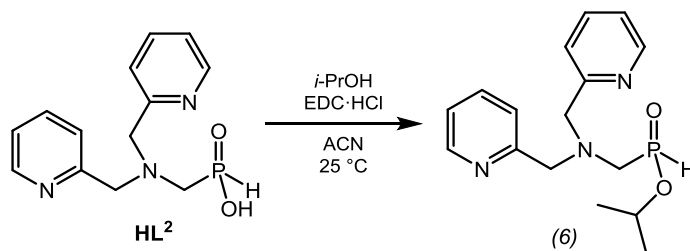
Skupina NH– cyklového skeletu nejprve reaguje „mannichovský“ s P–H vazbou ligandu v prostředí HCl, hovoříme tedy o tzv. „vodné“ formě reakce Mannichova typu. Vazby pouze jednoho pendantního ramene je docíleno vhodnou stechiometrií reakčních komponent. Nezareagovaný přebytek makrocyklu zamezující vzniku vedlejších produktů (struktur s více pendantními rameny) je nutné následně separovat z reakční směsi. Provedení separace na silném aniontovém iontoměniči, kde tato látka není nijak zadržována a eluuje s H_2O , je výhodné s ohledem na možnost její regenerace a dalšího použití. Produkt společně s různými formami nevázaného fosfinátového ramene (oxidovaná forma, hydroxomethylová forma), které při reakci v malém množství vznikají jakožto běžné vedlejší produkty, je z kolony vymyt roztokem kyseliny octové (10% v/v). K oddělení produktu od těchto nežádoucích složek je třeba směs nanést na sloupec silného kationtového iontoměniče, kde značná část nečistot eluuje již roztokem pyridinu (10% v/v), zatímco produkt a produktu strukturně velmi blízká látka (lze se domnívat, že se jedná o produkt substituovaný methylovým zbytkem

na dusíkovém atomu, nebylo dále zkoumáno) je možné z kolony vymýt až roztokem NH_4OH (5% v/v). Tato strukturně blízká látka vykazuje produktu značně podobné chování, což komplikuje separaci. Tenkovrstvou chromatografií s použitím neutrální aluminu jako stacionární fáze a směsi $\text{NH}_4\text{OH}:\text{EtOH}$ (1:4) jako mobilní fáze bylo dosaženo uspokojivé separace na to, aby chromatografickou metodu bylo možné přenést do sloupcového uspořádání. Provedená čistící operace byla velmi ztrátová a aditivně s předešlými purifikačními kroky vedla k dosažení poměrně nízkých výtěžků izolovaného meziprojektu (5) (~30 %).

Ten byl následně podroben substituci zbylých tří cyklových aminoskupin. Při použití ClCH_2COOH v bazickém prostředí LiOH lze očekávat konkurenční reakci – alkylaci, resp. acylaci dusíkových atomů DPA zapojených v pyridinových kruzích. Tento proces nebyl pozorován a možné vysvětlení podává získaná krystalová struktura ligandu H_2L^1 s Li^+ , v níž se všechny dusíkové atomy dipicolylaminu podílejí na koordinaci lithného kationtu, a jsou tudíž „zablokovány“ pro případné další reakce (**Obr 3.19**).

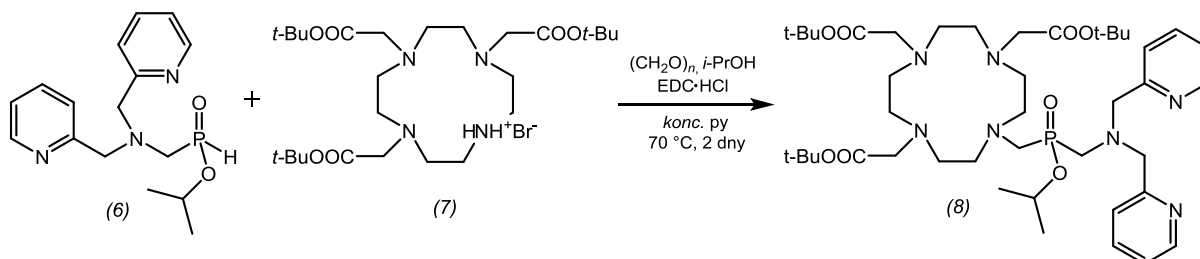
K alkylaci tak docházelo na patřičných místech a byla získána reakční směs obsahující finální bifunkční produkt H_4L^4 . Bylo ovšem nutné odstranění přebytečné nezreagované kyseliny chloroctové a hydroxidu lithného, které byly použity v nadbytku, na silném kationtovém iontoměniči, a dále čištění produktu na sloupci neutrální aluminu, kde opět docházelo k výrazným ztrátám. Konečný výtěžek přese všechny ztrátové čistící operace obou kroků nebyl uspokojivý (~12 %, vztaženo k HL^2) a bylo třeba hledat jiný syntetický přístup.

Možnou alternativou navázání fosforové pendantní skupiny na makrocyklus je „nevodná forma“ reakce mannichova typu, která vyžaduje nukleofilní reaktant i použitý dusíkový makrocyklus (DO3A) ve formě esteru. Isopropylový ester fosfinátového ligandu HL^2 byl připraven esterifikací Steglichova typu, při níž je nejprve kyselina aktivována vazbou na *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid. Aktivovaná forma posléze reaguje s alkoholem za vzniku esterového produktu (6) s kvantitativní konverzí reaktantu na produkt (**Obr. 3.21**).



Obr. 3.21 Reakce vedoucí k zisku esterové formy ligandu HL^2 .

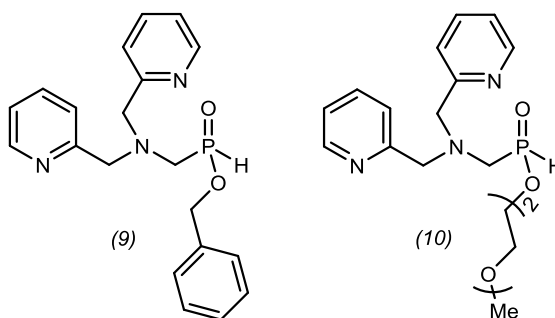
Esterová forma tetraazacyklododekanu se třemi atomy dusíku substituovanými alkylovanými acetátovými zbytky – *t*-BuDO3A – byla připravena jako hydrobromid (7) dle publikovaného postupu.⁹⁵ Kabachnik-Fields reakcí těchto dvou připravených esterů s paraformaldehydem v pyridinu jako rozpouštědle byla získána esterová struktura (8) (Obr. 3.22).



Obr. 3.22 Schéma přípravy bifunkčního ligandu bezvodou syntetickou cestou se vznikem esterové formy produktu.

Problém nastal při čištění a izolaci produktu. K odstranění minoritně zastoupených vedlejších produktů reakce a nadbytku reakčních komponent byla využita vysokoúčinná kapalinová, resp. flash chromatografie. Chování produktu (8) a nezreagované *t*-BuDO3A (7) na reverzní fázi bylo obdobné a i při běžně prováděných změnách podmínek je bylo obtížné separovat.

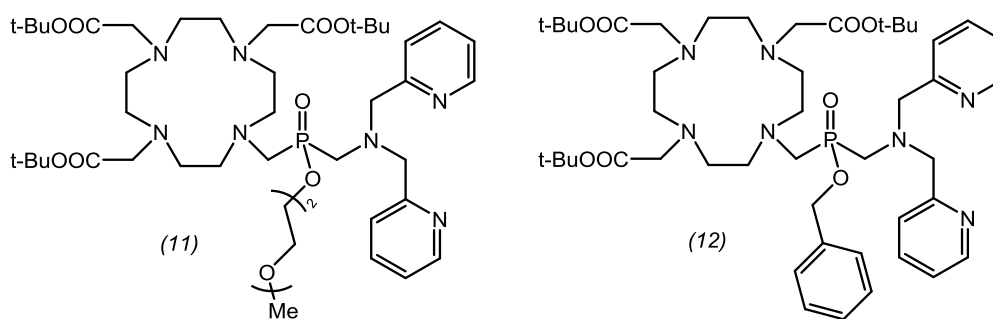
Nabízelo se východisko v podobě volby jiného alkylového zbytku na esteru fosforové komponenty, který zásadně ovlivní retenci výsledné struktury. Byly vybrány dva polaritou se velmi lišící alkoholy – diethylenglykolmonoethylether (DGME) vedoucí k látce (9) a benzylalkohol (BnOH) vedoucí k látce (10) (Obr. 3.23).



Obr. 3.23 Navržené esterové struktury využitelné k přípravě bifunkčního ligandu bezvodou syntetickou cestou.

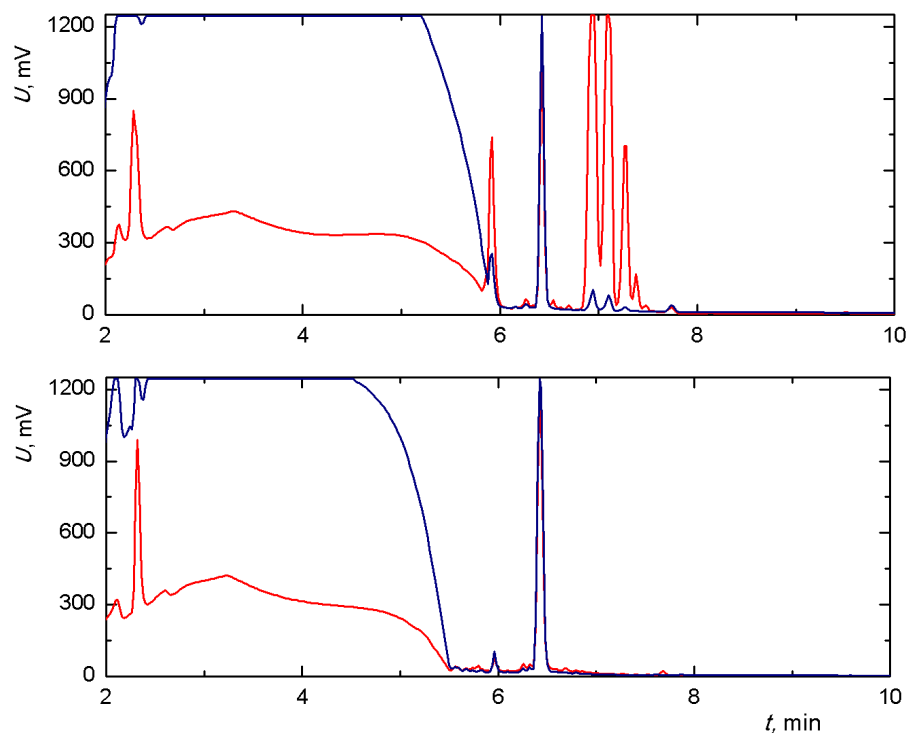
Průběh reakcí byl sledován pomocí HPLC s využitím spektrofotometrické detekce. V případě benzylalkoholu lze s výhodou díky aromatickému charakteru molekuly pozorovat i veškeré vedlejší a rozkladné produkty reakce. K zajištění vysokého výtěžku reakce je totiž třeba použít alkoholovou komponentu v přebytku. Nezareagovaná část byla odstraňována dvěma nezávislými způsoby – lyofilizací a vakuovou destilací v Kugelrohr aparatuře. Při obou metodách docházelo k nedefinovanému rozkladu produktu a jeho izolace nebyla za těchto podmínek možná.

Velmi schůdným řešením se ukázalo být „one pot“ pojetí celé reakce, při níž je ester fosforové vstupní komponenty generován *in situ* a přímo bez izolace je ponechán reagovat s $(\text{CH}_2\text{O})_n$ a $t\text{-BuDO3A}\cdot\text{HBr}$ v prostředí suchého pyridinu. Uvedený postup byl zkoušen jak s BnOH se záměrem připravit (11), tak s DGME se záměrem připravit (12) (**Obr. 3.24**).



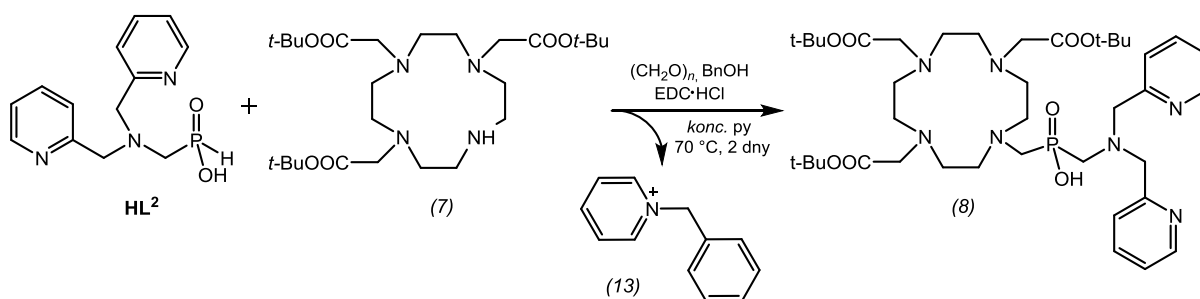
Obr. 3.24 Struktury navržené jako produkty „one pot“ reakce.

„Bezvodá“ varianta reakce Mannichova typu vede běžně k získání esterové formy produktu dle zvoleného alkoholu. Překvapivě byl výsledkem reakcí s oběma alkoholy identický produkt (píky vykazují shodné retenční časy při HPLC analýze, jak je vidět na **Obr. 3.25**). Ten byl po izolaci identifikován NMR a MS spektroskopii jako navrhovaný bifunkční ligand s esterově chráněnými karboxyly (8). Při jeho separaci flash chromatografií byla rovněž získána frakce s čistou látkou, která vykazovala podstatně nižší retenci a pomohla v objasnění průběhu obou reakcí s neočekávaným výsledkem.



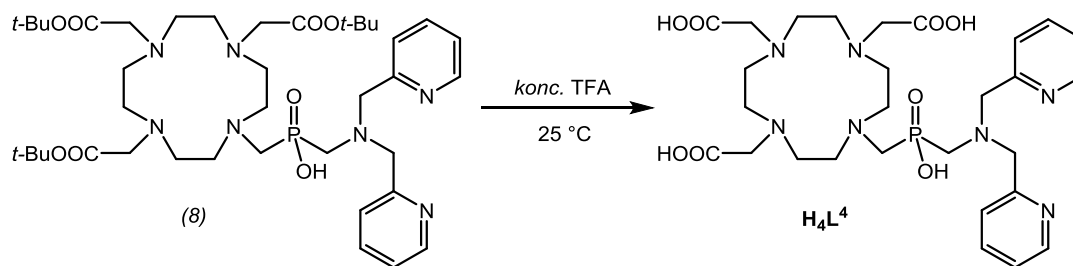
Obr. 3.25 Záznam HPLC analýzy „one pot“ reakce s využitím BnOH (nahore) a DGME (dole), eluce produktu ~ 6,5 min, detekce při 210 nm (červená) a 254 nm (modrá).

Po identifikaci látky (13) bylo zřejmé, že in situ vzniklé fosfinové estery vykazují chování alkylačních činidel a alkylují pyridin použitý jako rozpouštědlo (**Obr. 3.26**).



Obr. 3.26 Schéma přípravy bifunkčního ligandu „one pot“ syntetickou cestou vedoucí k zisku „neesterové“ formy produktu.

Posledním krokem vedoucím k finální bifunkční struktuře bylo odstranění chránících *t*-butylových skupin na karboxylových substituentech. Reakce eliminačního charakteru probíhá v koncentrované TFA za vzniku $\mathbf{H}_4\mathbf{L}^4$ a isobutenu jako vedlejšího produktu (**Obr. 3.27**). Při reakci je dosahováno vysokých výtěžků, jednoduchým zpracováním a izolací nedochází k prakticky žádným ztrátám. Celkový výtěžek této syntetické cesty činil 64 % (vztaženo k *t*-BuDO3A·HBr).



Obr. 3.27 Reakce odstranění chránících skupin vedoucí k zisku konečné struktury bifunkčního ligandu.

4 ZÁVĚR

Efektivní jedнокrokovou syntetickou cestou vedoucí k vysokým reakčním výtěžkům byly připraveny struktury obsahující dipicolylaminový motiv v blízkosti fosfo(i)natové skupiny. Při studiu jejich acidobazických vlastností se ukázala nízká bazicita dusíkových atomů DPA v těchto molekulách, která se odráží v koordinačním chování zkoumaných látek. Komplexy studovaných ligandů s vybranými ionty přechodných kovů (Cu^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+}) vznikaly již při nízkém pH. Fosfonátový analog tvoří slabé komplexy s Mg^{2+} a Ca^{2+} ionty, naproti tomu fosfinátové deriváty tyto ionty nekomplexují vůbec. To potvrzuje selektivitu DPA motivu vůči Zn^{2+} iontům. Na základě analýzy připravených monokrystalů některých komplexů byla zhodnocena dobrá shoda koordinačního chování v roztoku a v pevné fázi. DPA vytváří dva typy koordinačních izomerů – *fac*, které byly pozorovány u systémů s Ni^{2+} ionty a *mer* pozorované u systémů s Cu^{2+} ionty.

Nalezením nové syntetické „one pot“ cesty byl připraven bifunkční ligand kombinující tetraazamakrocyclus a DPA strukturní motiv, který je potenciálně schopen koordinačně vázat dva různé nezávislé ionty kovu. Tento ligand bude v budoucnu studován jako kontrastní látka určená k detekci Zn^{2+} iontů ve vybraných tkáních a orgánech metodami molekulárního zobrazování.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Romary, J. K.; Bunds, J. E.; Barger, J. D. *J. Chem. Eng. Data* **1967**, *12*, 224.
- (2) Biniecki, S.; Kabzinska, S. *Ann. Pharm. Fr.* **1964**, *22*, 685.
- (3) Huchital, D. H.; Debesis, E. *Inorg. Chim. Acta* **1987**, *126*, 167.
- (4) Palaniandavar, M.; Butcher, R. J.; Addison, A. W. *Inorganic Chemistry* **1996**, *35*, 467.
- (5) Junk, P. C.; Kim, Y.; Skelton, B. W.; White, A. H. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2006**, *632*, 1340.
- (6) Palaniandavar, M.; Mahadevan, S.; Kockerling, M.; Henkel, G. *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.* **2000**, 1151.
- (7) Huang, G. S.; Lai, J. K.; Ueng, C. H.; Su, C. C. *Transit. Met. Chem.* **2000**, *25*, 84.
- (8) Huang, G. S.; Su, C. C.; Wang, S. L.; Liao, F. L.; Lin, K. J. *J. Coord. Chem.* **2000**, *49*, 211.
- (9) Kim, Y. I.; Lee, Y. S.; Seo, H. J.; Lee, J. Y.; Kang, S. K. *Acta Crystallographica Section E-Structure Reports Online* **2007**, *63*, M2810.
- (10) Mikata, Y.; Fujimoto, T.; Sugai, Y.; Yano, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 1143.
- (11) Mikata, Y.; Fujii, S.; Naemura, M.; Takahashi, K.; Noguchi, Y. *Dalton Trans.* **2009**, 10305.
- (12) Antonioli, B.; Buchner, B.; Clegg, J. K.; Gloe, K.; Gotzke, L.; Heine, A.; Jager, A.; Jolliffe, K. A.; Kataeva, O.; Kataev, V.; Klingeler, R.; Krause, T.; Lindoy, L. F.; Popa, A.; Seichter, W.; Wenzel, M. *Dalton Trans.* **2009**, 4795.
- (13) Soliman, A. A.; Khattab, M. M.; Ramadan, R. M. *Transit. Met. Chem.* **2007**, *32*, 325.
- (14) Wikstrom, J. P.; Nazarenko, A. Y.; Reiff, W. M.; Rybak-Akimova, E. V. *Inorg. Chim. Acta* **2007**, *360*, 3733.
- (15) Wikstrom, J. P.; Filatov, A. S.; Staples, R. J.; Guifarro, C. R.; Rybak-Akimova, E. V. *Inorg. Chim. Acta* **2010**, *363*, 884.
- (16) Mullice, L. A.; Laye, R. H.; Harding, L. P.; Buurma, N. J.; Pope, S. J. A. *New Journal of Chemistry* **2008**, *32*, 2140.
- (17) Tovee, C. A.; Kilner, C. A.; Barrett, S. A.; Thomas, J. A.; Halcrow, M. A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 1007.
- (18) Lamour, E.; Routier, S.; Bernier, J. L.; Catteau, J. P.; Bailly, C.; Vezin, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1862.
- (19) Ramakrishnan, S.; Palaniandavar, M. *J. Chem. Sci.* **2005**, *117*, 179.
- (20) Porath, J.; Hansen, P. *Journal of Chromatography* **1991**, *550*, 751.
- (21) Winzerling, J. J.; Nez, P.; Porath, J.; Law, J. H. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *25*, 217.
- (22) Winzerling, J. J.; Pham, D. Q. D.; Kunz, S.; Samaraweera, P.; Law, J. H.; Porath, J. *Protein Expr. Purif.* **1996**, *7*, 137.

- (23) Sun, L. C.; Burkitt, M.; Tamm, M.; Raymond, M. K.; Abrahamsson, M.; LeGourrierec, D.; Frapart, Y.; Magnuson, A.; Kenez, P. H.; Brandt, P.; Tran, A.; Hammarstrom, L.; Styring, S.; Akermark, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6834.
- (24) Berg, K. E.; Tran, A.; Raymond, M. K.; Abrahamsson, M.; Wolny, J.; Redon, S.; Andersson, M.; Sun, L. C.; Styring, S.; Hammarstrom, L.; Toftlund, H.; Akermark, B. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 1019.
- (25) Pan, J. X.; Xu, Y. H.; Benko, G.; Feyziyev, Y.; Styring, S.; Sun, L. C.; Akermark, B.; Polivka, T.; Sundstrom, V. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 12904.
- (26) Hashemi, P.; Boroumand, J.; Fat'hi, M. R. *Talanta* **2004**, *64*, 578.
- (27) Ding, Y.; Zhu, W. P.; Xu, Y. F.; Qian, X. H. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2015**, *220*, 762.
- (28) O'Neil, E. J.; Smith, B. D. *Coordination Chemistry Reviews* **2006**, *250*, 3068.
- (29) Mito-Oka, Y.; Tsukiji, S.; Hiraoka, T.; Kasagi, N.; Shinkai, S.; Hamachi, I. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7059.
- (30) Ojida, A.; Hamachi, I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*, 35.
- (31) Ojida, A.; Mito-oka, Y.; Sada, K.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2454.
- (32) Anai, T.; Nakata, E.; Koshi, Y.; Ojida, A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6232.
- (33) Ojida, A.; Sakamoto, T.; Inoue, M.; Fujishima, S.; Lippens, G.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6543.
- (34) Hanshaw, R. G.; Lakshmi, C.; Lambert, T. N.; Johnson, J. R.; Smith, B. D. *ChemBiochem* **2005**, *6*, 2214.
- (35) Hanshaw, R. G.; Smith, B. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5035.
- (36) DiVittorio, K. M.; Johnson, J. R.; Johansson, E.; Reynolds, A. J.; Jolliffe, K. A.; Smith, B. D. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1966.
- (37) Koulov, A. V.; Hanshaw, R. G.; Stucker, K. A.; Lakshmi, C.; Smith, B. D. *Israel Journal of Chemistry* **2005**, *45*, 373.
- (38) Plaunt, A. J.; Harmatys, K. M.; Wolter, W. R.; Suckow, M. A.; Smith, B. D. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 724.
- (39) Hu, Q. L.; Gao, M.; Feng, G. X.; Chen, X. D.; Liu, B. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7*, 4875.
- (40) Ngo, H. T.; Liu, X. J.; Jolliffe, K. A. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 4928.
- (41) Ojida, A.; Park, S.; Mito-oka, Y.; Hamachi, I. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6193.
- (42) Ojida, A.; Takashima, I.; Kohira, T.; Nonaka, H.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12095.
- (43) Moro, A. J.; Cywinski, P. J.; Korsten, S.; Mohr, G. J. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1085.
- (44) Hanshaw, R. G.; Hilker, S. M.; Hua, J.; Smith, B. D. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8721.
- (45) Drewry, J. A.; Fletcher, S.; Hassan, H.; Gunning, P. T. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 5074.

- (46) Nonaka, A.; Horie, S.; James, T. D.; Kubo, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3621.
- (47) Roy, B.; Rao, A. S.; Ahn, K. H. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7774.
- (48) Yuen, K. K. Y.; Jolliffe, K. A. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4824.
- (49) Shin, I. S.; Bae, S. W.; Kim, H.; Hong, J. I. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 8259.
- (50) Gan, H. Y.; Oliver, A. G.; Smith, B. D. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5070.
- (51) Rhee, H. W.; Choi, H. Y.; Han, K.; Hong, J. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4524.
- (52) Kim, Y. S.; Park, H. H.; Rhee, H. W.; Hong, J. I.; Han, K. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **2009**, *39*, 114.
- (53) Rhee, H. W.; Choi, S. J.; Yoo, S. H.; Jang, Y. O.; Park, H. H.; Pinto, R. M.; Cameselle, J. C.; Sandova, F. J.; Roje, S.; Han, K.; Chung, D. S.; Suh, J.; Hong, J. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10107.
- (54) Liu, G.; Choi, K. Y.; Bhirde, A.; Swierczewska, M.; Yin, J.; Lee, S. W.; Park, J. H.; Hong, J. I.; Xie, J.; Niu, G.; Kiesewetter, D. O.; Lee, S.; Chen, X. Y. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51*, 445.
- (55) Leevy, W. M.; Johnson, J. R.; Lakshmi, C.; Morris, J.; Marquez, M.; Smith, B. D. *Chem. Commun.* **2006**, 1595.
- (56) Rice, D. R.; Gan, H. Y.; Smith, B. D. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2015**, *14*, 1271.
- (57) Leevy, W. M.; Lambert, T. N.; Johnson, J. R.; Morris, J.; Smith, B. D. *Chem. Commun.* **2008**, 2331.
- (58) Zhang, S. H.; Wang, J.; Han, L. A.; Li, C. G.; Wang, W.; Yuan, Z. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2010**, *147*, 687.
- (59) Lee, J. J.; White, A. G.; Baumes, J. M.; Smith, B. D. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1068.
- (60) Smith, B. A.; Harmatys, K. M.; Xiao, S. Z.; Cole, E. L.; Plaunt, A. J.; Wolter, W.; Suckow, M. A.; Smith, B. D. *Molecular Pharmaceutics* **2013**, *10*, 3296.
- (61) White, A. G.; Gray, B. D.; Pak, K. Y.; Smith, B. D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 2833.
- (62) DiVittorio, K. M.; Leevy, W. M.; O'Neil, E. J.; Johnson, J. R.; Vakulenko, S.; Morris, J. D.; Rosek, K. D.; Serazin, N.; Hilker, S.; Hurley, S.; Marquez, M.; Smith, B. D. *Chembiochem* **2008**, *9*, 286.
- (63) Smith, B. A.; Xiao, S. Z.; Wolter, W.; Wheeler, J.; Suckow, M. A.; Smith, B. D. *Apoptosis* **2011**, *16*, 722.
- (64) Smith, B. A.; Akers, W. J.; Leevy, W. M.; Lampkins, A. J.; Xiao, S. Z.; Wolter, W.; Suckow, M. A.; Achilefu, S.; Smith, B. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 67.
- (65) Muller-Graff, P. K.; Szelke, H.; Severin, K.; Kramer, R. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2327.
- (66) de Silva, A. P.; Moody, T. S.; Wright, G. D. *Analyst* **2009**, *134*, 2385.
- (67) Kwon, T. H.; Kim, H. J.; Hong, J. I. *Chemistry-a European Journal* **2008**, *14*, 9613.
- (68) Grande, F.; Garofalo, A.; Neamati, N. *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14*, 385.

- (69) Narumi, T.; Aikawa, H.; Tanaka, T.; Hashimoto, C.; Ohashi, N.; Nomura, W.; Kobayakawa, T.; Takano, H.; Hirota, Y.; Murakami, T.; Yamamoto, N.; Tamamura, H. *Chemmedchem* **2013**, *8*, 118.
- (70) Tamamura, H.; Ojida, A.; Ogawa, T.; Tsutsumi, H.; Masuno, H.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Hamachi, I.; Fujii, N. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 3412.
- (71) Wong, B. A.; Friedle, S.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7142.
- (72) Vallee, B. L.; Falchuk, K. H. *Physiol. Rev.* **1993**, *73*, 79.
- (73) Guan, Z. X.; Kukoyi, B.; Feng, P.; Kennedy, M. C.; Franklin, R. B.; Costello, L. C. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *97*, 199.
- (74) Kristiansen, L. H.; Rungby, J.; Sondergaard, L. G.; Stoltenberg, M.; Danscher, G. *Histochem. Cell Biol.* **2001**, *115*, 125.
- (75) Frederickson, C. J.; Perezclausell, J.; Danscher, G. *J. Histochem. Cytochem.* **1987**, *35*, 579.
- (76) Bush, A. I. *Trends in Neurosciences* **2003**, *26*, 207.
- (77) Komatsu, K.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13447.
- (78) Chang, C. J.; Nolan, E. M.; Jaworski, J.; Burdette, S. C.; Sheng, M.; Lippard, S. J. *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 203.
- (79) Louie, M. W.; Liu, H. W.; Lam, M. H. C.; Lau, T. C.; Lo, K. K. W. *Organometallics* **2009**, *28*, 4297.
- (80) Zhang, X. A.; Lovejoy, K. S.; Jasanoff, A.; Lippard, S. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 10780.
- (81) Surman, A. J.; Bonnet, C. S.; Lowe, M. P.; Kenny, G. D.; Bell, J. D.; Toth, E.; Vilar, R. *Chemistry-a European Journal* **2011**, *17*, 223.
- (82) Yu, J.; Martins, A. F.; Preihs, C.; Jordan, V. C.; Chirayil, S.; Zhao, P. Y.; Wu, Y. K.; Nasr, K.; Kiefer, G. E.; Sherry, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14173.
- (83) Zhang, J. F.; Kim, S.; Han, J. H.; Lee, S. J.; Pradhan, T.; Cao, Q. Y.; Kang, C.; Kim, J. S. *Organic Letters* **2011**, *13*, 5294.
- (84) Banerjee, S. R.; Levalada, M. K.; Lazarova, N.; Wei, L. H.; Valliant, J. F.; Stephenson, K. A.; Babich, J. W.; Maresca, K. P.; Zubieta, J. *Inorganic Chemistry* **2002**, *41*, 6417.
- (85) Storr, T.; Fisher, C. L.; Mikata, Y.; Yano, S.; Adam, M. J.; Orvig, C. *Dalton Trans.* **2005**, 654.
- (86) Ferreira, C. L.; Marques, F. L. N.; Okamoto, M. R. Y.; Otake, A. H.; Sugai, Y.; Mikata, Y.; Storr, T.; Bowen, M.; Yano, S.; Adam, M. J.; Chammas, R.; Orvig, C. *Applied Radiation and Isotopes* **2010**, *68*, 1087.
- (87) Liu, G. Z.; Dou, S. P.; He, J.; Vanderheyden, J. L.; Rusckowski, M.; Hnatowich, D. J. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1441.
- (88) Mallia, M. B.; Mittal, S.; Sarma, H. D.; Banerjee, S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *26*, 46.
- (89) Gasser, G.; Jager, K.; Zenker, M.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Stephan, H.; Metzler-Nolte, N. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 1133.

- (90) de Rosales, R. T. M.; Finucane, C.; Foster, J.; Mather, S. J.; Blower, P. J. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 811.
- (91) Benyettou, F.; Lalatonne, Y.; Sainte-Catherine, O.; Monteil, M.; Motte, L. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *379*, 324.
- (92) de Rosales, R. T. M.; Tavare, R.; Glaria, A.; Varma, G.; Protti, A.; Blower, P. J. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 455.
- (93) Rice, D. R.; Plaunt, A. J.; Turkyilmaz, S.; Smith, M.; Wang, Y. Z.; Rusckowski, M.; Smith, B. D. *Molecular Imaging and Biology* **2015**, *17*, 204.
- (94) Wyffels, L.; Gray, B. D.; Barber, C.; Woolfenden, J. M.; Pak, K. Y.; Liu, Z. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3425.
- (95) Moore, D. A. *Organic Syntheses* **2008**, *85*, 10.
- (96) Kývala, M., Lukeš, I. *Chemometrics '95*, 1995.
- (97) Baes, C. F. J., Mesmer, R. E. *The Hydrolysis of Cations*; Wiley: New York, 1976.
- (98) Queffelec, C.; Ribiere, P.; Montchamp, J. L. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8987.
- (99) Popov, K.; Niskanen, E.; Ronkkomaki, H.; Lajunen, L. H. J. *New Journal of Chemistry* **1999**, *23*, 1209.
- (100) Kotek, J.; Vojtisek, P.; Cisarova, I.; Hermann, P.; Jurecka, P.; Rohovec, J.; Lukes, I. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2000**, *65*, 1289.
- (101) Jaroš, A. *Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UK* **2016**.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych moc poděkovat Vojtovi Kubíčkoví za odborný dohled nad mou prací, cenné rady, přátelský a optimistický přístup, kterým mě celé studium provázel a ochotu při řešení všech problémů.

Obrovský dík patří Sandrovi, on ví za co a stránka by mi nestačila.

Děkuji Zuzce za potenciometrii, Ondrovi za měření MS spekter a udržování chodu laboratoře po technické stránce, Dr. Císařové za provedení rentgenostrukturních analýz a doc. Kotkovi za vyřešení struktur.

Děkuji celému kolektivu výzkumné skupiny a našim klukům „ajt'ákům“ za příjemné a podnětné debaty při společně stráveném čase v laborce, za spousty zážitků a legrace zejména pak Elišce, Martinovi a Davidovi.

Největší dík patří mé úžasné rodině, která mi byla oporou za každé situace a poskytovala mi po dobu studia jistotu a stabilní zázemí.