

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

KATEDRA ANORGANICKÉ CHEMIE

Studijní obor: Anorganická chemie



## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Koordinčně nenasycené komplexy s potenciální nukleázovou aktivitou

Coordinatively unsaturated complexes with potential nucleasic activity

**Bc. Robert Willimetz**

Vedoucí práce/Školitel:  
Prof. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2022

## **Prohlášení:**

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

V Praze, dne 11. 5. 2022

Robert Willimetz

## **Abstrakt**

Biofilmy jsou kolonie bakterií adherované na povrchy prostřednictvím matrice z biopolymerních látek, které produkují. Tyto biofilmy se mohou tvořit i na medicínských implantátech, kde jsou zodpovědné za obtížně léčitelné chronické infekce. Jedním z přístupů, jak předcházet vzniku biofilmů, může být využití koordinačních sloučenin s nukleázovou aktivitou. Tyto sloučeniny obsahují hydrolyticky aktivní ion kovu, který je schopen aktivně štěpit extracelulární DNA a předcházet tak tvorbě matrix a biofilmu. Cílem této diplomové práce bylo připravit sérii Cu(II) komplexů derivátů 1,4,7-triazacyklononanu a pozorovat jejich případnou nukleázovou aktivitu. Jedním z komplexů byl derivát 1,4,7-triazacyklononanu s postranní thiazolovou kotvou. Pomocí této kotvy lze zabudovat připravený komplex do polymerních nosičů a vytvořit tak povrch s potenciální schopností předcházet vzniku biofilmu.

## **Klíčová slova**

Bakteriální biofilmy, 1,4,7-Triazacyklononan, Umělé nukleázy, Koordinační sloučeniny.

## **Abstract**

Biofilms are bacterial colonies attached to the surfaces through matrix of the biopolymer substances they produce. These biofilms can also form on medical implants, where they are responsible for difficult-to-treat chronic infections. One approach to prevent biofilm formation may be using of coordination compounds with nuclease activity. These compounds contain a hydrolytically active metal ion that is able to actively cleave extracellular DNA to prevent matrix and biofilm formation. The aim of this diploma thesis was to prepare a series of Cu(II) complexes of 1,4,7-triazacyclononane derivatives and to observe their potential nuclease activity. One of the complexes was a 1,4,7-triazacyclononane derivative with a thiazole anchor. Prepared complex can be incorporated through this anchor into polymers to a surface with potential ability to prevent biofilm formation.

## **Keywords**

Bacterial biofilms, 1,4,7-Triazacyclononane, Artificial nucleases, Coordination compounds.

## **Poděkování**

Tímto bych rád poděkoval všem lidem, bez jejichž podpory by tato práce jen těžko vznikala. Největší dík patří mé rodině, která mě vždy nejvíce podporovala a vždy tu pro mě byla. Dále bych chtěl poděkovat svému školiteli za jeho rady, přístup a za to, že se mě ujal, a mohl jsem tak strávit téměř pět let ve skvělém kolektivu naší laboratoře. Bylo to období, na které nezapomenu. Tímto bych tedy chtěl poděkovat všem z laboratoře, kteří se na tomto zážitku podíleli, a kteří mi vždy neváhali pomoci. Jste skvělí a byla radost s vámi pracovat.

# Obsah

1. Teoretický úvod.....	1
1.1 Antibiotická léčba a rezistence bakterií .....	1
1.1.2 Bakteriální biofilmy .....	1
1.1.2 Biofilmy a medicínské implantáty .....	2
1.1.3 Úpravy povrchů medicínských implantátů.....	2
1.1.4 Alternativní cesty v boji s bakteriemi – koordinační sloučeniny .....	3
1.2 Umělé nukleázy .....	4
1.2.1 Využití iontů přechodných kovů v umělých nukleázách .....	5
1.2.2 Komplexy využívané k hydrolyze DNA .....	5
1.2.3 Mechanismus štěpení DNA pomocí komplexů derivátů TACN s ionty Cu(II).....	6
1.3 Metody sledování hydrolyzy modelového substrátu BNPP.....	12
2. Cíle práce.....	14
3. Experimentální část .....	16
3.1 Seznam použitých chemikálií.....	16
3.2 Metody charakterizace a čištění připravených látek .....	16
3.2.1 NMR spektroskopie.....	16
3.2.2 Metoda HPLC-UV/VIS a HPLC-MS.....	16
3.2.3 UV/VIS spektroskopie .....	17
3.2.4 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) .....	17
3.2.5 Semi-preparativní HPLC .....	18
3.3 Syntetická část.....	18
3.3.1 Příprava 1,4,7-trimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L1) .....	20
3.3.2 Příprava 1,4,7-tris(isopropyl)-1,4,7-triazacyklononanu (L2).....	21
3.3.3 Příprava 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononanu (L4) .....	22
3.3.4 Příprava 1-benzyl-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L3) .....	23
3.3.5 Příprava 1,4-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L5) .....	24
3.3.6 Příprava 1-(5-ftalimidopentyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (3).....	25
3.3.7 Příprava 1-(5-aminopentyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (4) .....	26
3.3.8 Příprava 1-[5-(thiazol-4-karboxamido)pentyl]-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L7) .....	27
3.3.9 Příprava 1-methyl-1,4,7-triazacyklononanu (L6).....	28
3.3.10 Příprava <i>N</i> -(5-brompentyl)ftalimidu .....	29
3.4 Pozorování hydrolyzy substrátu BNPP pomocí UV/VIS spektroskopie .....	30

3.4.1 Příprava zásobních roztoků .....	31
3.4.2 Příprava experimentu .....	31
3.5 Pozorování hydrolyzy pomocí HPLC-UV/VIS a HPLC-MS .....	32
3.5.1 Příprava zásobních roztoků a mobilní fáze .....	32
3.5.2 Příprava experimentu .....	33
4. Výsledky a diskuze.....	34
4.1 Příprava 1,4,7-trimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L1).....	34
4.2 Příprava 1,4,7-tris(isopropyl)-1,4,7-triazacyklononanu (L2).....	34
4.3 Příprava 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononanu (L4).....	34
4.4 Příprava 1-benzyl-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L3).....	35
4.5 Příprava 1,4-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L5) .....	35
4.6 Příprava 1-(5-ftalimidopentyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (3).....	36
4.7 Příprava 1-(5-aminopentyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (4) .....	36
4.8 Příprava 1-[5-(thiazol-4-karboxamido)pentyl]-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L7).....	37
4.9 Příprava 1-methyl-1,4,7-triazacyklononanu (L6).....	38
4.10 Příprava <i>N</i> -(5-brompentyl)ftalimidu .....	39
4.11 Příprava komplexů ligandů TACN a L1–L7.....	39
4.11.1 Charakterizace připravených komplexů.....	40
4.12 Vyhodnocení pozorování hydrolyzy BNPP pomocí UV/VIS spektroskopie.....	42
4.13 Vyhodnocení pozorování hydrolyzy BNPP pomocí HPLC-UV/VIS a HPLC-MS .....	47
5. Závěr.....	51
6. Seznam použitých zkratk.....	52
7. Seznam použité literatury .....	53
Přílohy .....	i
A. Absorpční spektra připravených Cu(II) komplexů.....	i
B. Závislosti absorpance <i>A</i> na vlnové délce $\lambda$ při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexů.....	iv
C. Závislosti molární koncentrace 4-nitrofenolátových iontů $c_{NP}$ na čase <i>t</i> při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu .....	vii
D. Závislost absorpance při 400 nm na čase <i>t</i> při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L7 .....	x

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Antibiotická léčba a rezistence bakterií

Je tomu více než 100 let od doby, kdy byl roku 1910 představen první antibiotický přípravek s názvem Salvarsan. Objev antibiotik výrazně změnil fungování moderní medicíny a prodloužil lidem průměrný věk dožití.<sup>[1]</sup> Příkladem může být významné snížení úmrtnosti na zápal plic o 30 % ve 30. letech 20. století.<sup>[2]</sup> Antibiotika umožnila provádět řadu složitých operativních zákroků, jako jsou transplantace orgánu či srdeční operace, bez vážných následků spojených s následnou infekcí. Zlaté období antibiotik začíná objevením penicilinu roku 1928 a pokračuje až do 50. let 20. století. Od této doby však nastává pokles ve vývoji nových účinných antibiotik a zároveň se zvyšuje bakteriální rezistence na již objevené přípravky.<sup>[1]</sup> V předchozích 30 letech klesl počet nově schválených systemických antibiotik agenturou U.S. Food and Drug Administration (FDA) o 90 %.<sup>[3]</sup> Tento pokles je způsobený odklonem farmaceutických společností od vývoje nových preparátů kvůli vědeckým, ekonomickým a regulačním překážkám, které mají za následek, že vývoj antibiotik je méně atraktivní ve srovnání s jinými lukrativnějšími terapeutickými oblastmi.<sup>[4]</sup>

Rostoucí antibakteriální rezistence a zmenšující se množství účinných antibiotik vede k tzv. postantibiotické éře, ve které začínají umírat pacienti na bakteriální infekce, které byly kdysi léčitelné.<sup>[4]</sup> Jelikož existuje vysoká korelace mezi užíváním antibiotik a bakteriální rezistencí, je nutné objevit nové alternativní metody léčby s novými mechanismy působení, které by předcházely nadužívání antibiotik.<sup>[5]</sup>

### 1.1.2 Bakteriální biofilmy

Jedním z důležitých mechanismů rezistence bakterií na antibakteriální prostředky je tvorba tzv. biofilmů.<sup>[6]</sup>

Biofilmy jsou v přírodě všudypřítomné útvary, které bakterie tvoří jako prostředek ke svému přežití. Ačkoli byly pozorovány již v 17. století Antonim van Leeuwenhoekem, tak větší pozornosti se jim dostalo až v 70. letech 20. století, kdy Niels Høiby pozoroval souvislosti mezi přetrvávající infekcí a agregáty bakterií v tělech pacientů s cystickou fibrózou.<sup>[7]</sup> Později bylo zjištěno, že na rozdíl od volně se pohybujících bakterií způsobují

bakteriální biofilmy chronické infekce, které jsou velmi obtížně léčitelné.<sup>[8]</sup>

Bakterie adherované v biofilmech jsou zapuštěny do matrice, kterou samy vyrábějí. Matrice obsahuje množství látek, jako jsou například proteiny, polysacharidy a extracelulární DNA. Matrice nabízí, mimo jiné, ochranu bakterií před antibiotickými přípravky. Tato ochrana je důsledkem existence gradientu kyslíku a živin od vrcholu ke spodní části biofilmu. Tento gradient je spojen se sníženou metabolickou aktivitou bakterií, prodloužením doby množení buněk a s omezenou difúzí antibiotik.<sup>[9,10]</sup>

### **1.1.2 Biofilmy a medicínské implantáty**

Je odhadováno, že bakteriální biofilmy jsou zodpovědny za 65 až 80 % lidských infekcí.<sup>[11]</sup> Vysoký výskyt biofilmů a s nimi spojených infekcí je také u medicínských implantátů, jako jsou například katetry, ortopedické implantáty, kontaktní čočky nebo implantovaná elektronická zařízení.<sup>[12]</sup> Například v USA je ročně aplikováno více než 5 miliónů centrálních žilních katetrů, s jejichž používáním je spojeno na 200 tisíc případů infekcí krevního oběhu.<sup>[13]</sup> Tyto zdravotní komplikace jsou spojeny s delším pobytem pacientů v nemocnicích a zvyšujícími se náklady na zdravotní péči.

Léčba infekcí spojených s bakteriálními biofilmy zahrnuje podání vysokých dávek antibiotik a/nebo nahrazení implantátu. Tento postup je drahý, invazivní a je spojen s vysokým rizikem opětovné infekce.<sup>[6]</sup>

### **1.1.3 Úpravy povrchů medicínských implantátů**

Existuje několik způsobů, jak předcházet vzniku biofilmů na medicínských implantátech. Jednou z metod je využití tzv. bioakustického efektu, který využívá ultrazvuk za účelem lepší prostupnosti antibiotik skrze biofilm. Dalším způsobem může být například využití elektrických a elektromagnetických metod, které využívají citlivosti bakterií na elektrická a elektromagnetická pole.<sup>[6]</sup> Zajímavým způsobem se jeví úprava povrchů medicínských implantátů. Povrchy je možné upravit tak, aby bylo zamezeno samotnému přichycení bakterií, nebo aby byly schopny biofilm aktivně rozrušovat.<sup>[14]</sup> Příkladem je úprava povrchů za účelem adsorbování antibiotik, využití fotoaktivních potahových materiálů nebo nanomateriálů obsahujících nanočástice stříbra.<sup>[6]</sup> Dalším způsobem se může



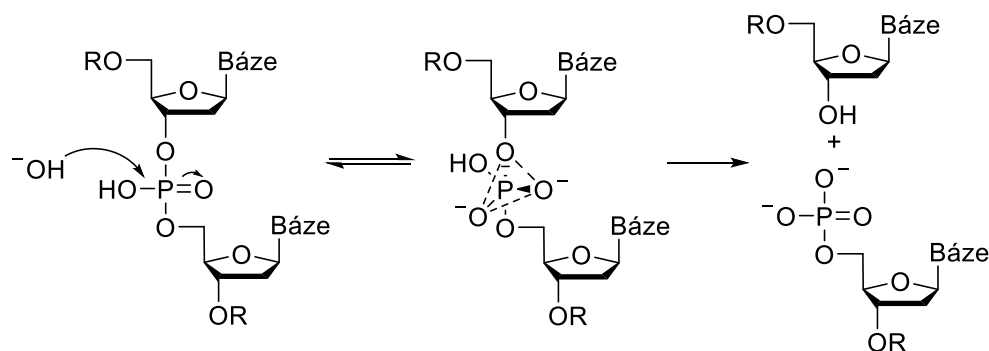
jevit využití vodivých polymerů typu PEDOT, které jsou netoxické, levné a všestranné.<sup>[15]</sup> Výhodou je možnost jejich funkcionalizace a kopolymerizace s bioaktivními látkami.<sup>[16]</sup>

### 1.1.4 Alternativní cesty v boji s bakteriemi – koordinační sloučeniny

Jednou z nadějných skupin látek využitelných jakožto nového zdroje antibiotických látek jsou díky své strukturní rozmanitosti a vlastnostem koordinační sloučeniny, které, ačkoli mají široké použití v jiných odvětvích medicíny, nejsou pro tyto účely využívány.<sup>[17]</sup>

Koordinační sloučeniny mají na rozdíl od čistě organických molekul několik mechanismů účinku, které mohou být potenciálně využity v medicíně.<sup>[18]</sup> Příkladem mohou být jejich redoxní a hydrolytické vlastnosti, které mohou být využity k přípravě sloučenin napodobujících tělu vlastní enzymy ze třídy nukleáz, tj. sloučenin schopných štěpit nukleové kyseliny. Díky těmto vlastnostem jeví některé koordinační sloučeniny antimikrobiální a antifungicidní účinky,<sup>[19]</sup> které mohou být použity například v boji proti rezistentním bakteriím.

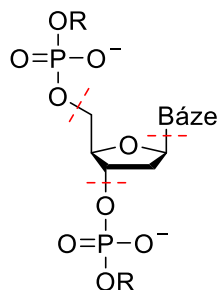
Hydrolytické štěpení nukleových kyselin je usnadněno přítomností kovových iontů působících jako Lewisovy kyseliny. Tyto Lewisovy kyseliny mohou aktivovat fosfát nukleových kyselin vůči nukleofilnímu ataku, mohou aktivovat vodu nebo hydroxidový ion jako nukleofil, nebo mohou zvýšit schopnost odstoupení alkoholu vzniklého štěpením.<sup>[20]</sup> Obecně přijímaný mechanismus hydrolytického štěpení DNA je zobrazen na *Schématu 1*.



*Schéma 1:* Mechanismus hydrolytického štěpení DNA zahrnující nukleofilní atak hydroxidů na fosfátovou kostru DNA za vytvoření penta-koordinovaného intermediátu.

Intermediát je v dalším kroku rozštěpen na alkohol a fosfát.

Dalším způsobem štěpení DNA je oxidační štěpení, které běžně probíhá za přítomnosti aditiv a fotogenerovaných činidel štěpících DNA, tzn. k iniciaci štěpení jsou zapotřebí externí činidla, jako  $H_2O_2$  nebo světlo. Oxidační štěpení se může odehrát jak na úrovni sacharidů, tak na úrovni bází, a může je ve výsledku poškodit.<sup>[20]</sup> Obvyklá místa oxidačního štěpení DNA jsou znázorněna na *Obr. 1*.<sup>[21]</sup>



*Obr. 1:* Obvyklá místa štěpení ve struktuře DNA (znázorněna přerušovanou červenou čarou).

## 1.2 Umělé nukleázy

Enzymy katalyzují biologické reakce s vysokou rychlostí a selektivitou, aniž by permanentně měnily svoji strukturu. Metaloenzymy jsou významnou skupinou enzymů, které mají ve svém aktivním centru ionty kovů. Těmito aktivními centry jsou díky svým vlastnostem kromě  $Mg(II)$  a  $Ca(II)$  především ionty přechodných kovů.

Specifickou skupinou jsou metalonukleázy. Výhodou umělých metalonukleáz oproti přírodním enzymům je jejich vyrovnání se s drsnějšími reakčními podmínkami.<sup>[22]</sup> Této výhody dosahují volbou vhodného ligandu. Ligandy v umělých metalonukleázách mohou být upravovány tak, aby měl výsledný komplex požadovanou rychlost štěpení nukleových kyselin, selektivitu a stabilitu v různých rozpouštědlech při různých hodnotách pH, teplot a polarit.<sup>[22]</sup>

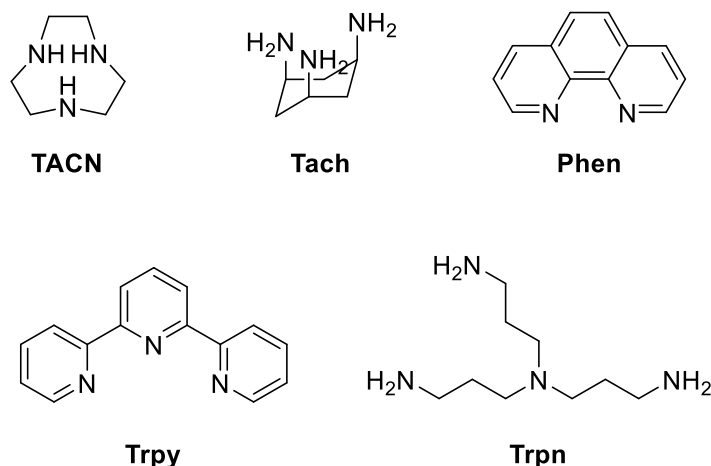
### 1.2.1 Využití iontů přechodných kovů v umělých nukleázách

Aktivní místa většiny přírodních nukleáz obsahují dvojmocné kationty, jako jsou Mg(II), Ca(II), Mn(II) nebo Zn(II), které jsou nezbytné pro jejich katalytickou aktivitu.<sup>[23]</sup> Aby mohly komplexní sloučeniny jevit nukleázovou aktivitu, potřebují koordinovat vhodný ion kovu. Ačkoli existuje řada potenciálně použitelných iontů kovů, mezi velmi oblíbené patří ionty Cu(II), Zn(II), Ni(II), Fe(II), Mn(II) a Co(II) z první přechodné řady.<sup>[24,25]</sup> Tyto ionty jsou tvrdými Lewisovými kyselinami, a proto jsou schopny aktivovat fosfodiesterovou vazbu vůči nukleofilnímu ataku tím, že neutralizují její náboj.<sup>[26,27]</sup>

Pro přípravu umělých nukleáz jsou atraktivní především ionty Cu(II).<sup>[24]</sup> Tyto ionty jsou biogenní,<sup>[28]</sup> jsou schopny štěpit DNA hydrolytickou i oxidační cestou<sup>[24]</sup> a z postavení v Irvingově–Williamsově řadě plyne jejich schopnost tvořit stabilní komplexy. Další výhodou iontů Cu(II) je snižování  $pK_a$  koordinované vody, což má za následek poskytnutí koordinovaných hydroxidových iontů v oblasti neutrálního pH.<sup>[29]</sup> Tím se komplexy Cu(II) jeví jako potenciálně vhodné pro použití v blízkosti fyziologického pH.

### 1.2.2 Komplexy využívané k hydrolýze DNA

Rozmanitost komplexů využívaných jako umělé nukleázy je do značné míry důsledkem širokého rozsahu možných ligandů. Mezi některé z nejznámějších ligandů používaných za tímto účelem patří makrocyclické ligandy (azamakrocycly, azacrownethery), polyaminové ligandy, deriváty pyridinu a deriváty 1,10-fenanthrolinu.<sup>[24]</sup> Příklady těchto ligandů jsou zobrazeny na *Obr. 2*.



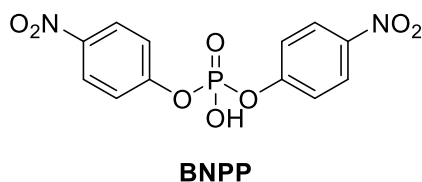
*Obr. 2:* Příklady ligandů využívaných pro výzkum umělých nukleáz.

Mezi široce využívané ligandy pro výzkum umělých nukleáz patří makrocyclické ligandy<sup>[30–33]</sup> obsahující ve své struktuře aminové skupiny jako donorové skupiny vhodné ke koordinaci k centrálnímu iontu kovu. Z hlediska studia hydrolytické aktivity komplexů přechodných kovů bývají s oblibou využívány deriváty 1,4,7-triazacyklononanu (TACN)<sup>[30–33]</sup> zobrazeného na *Obr. 2*. Bylo popsáno,<sup>[29]</sup> že k hydrolytické aktivitě komplexů přechodných kovů musí ligand ponechávat dvě a více *cis* uspořádaných vazebných míst na iontu kovu tak, aby mohlo dojít ke koordinaci nukleofilu i substrátu ve vhodné vzdálenosti. Tuto klíčovou podmínku dokáže TACN a jeho deriváty splnit. Mimo této vlastnosti dokáží tyto sloučeniny tvořit termodynamicky stálé a kineticky inertní komplexy. Z hlediska hydrolytické aktivity navíc mohou být vlastnosti komplexů upravovány substitucí na aminových skupinách, což může vést k významnému zrychlení štěpení nukleových kyselin.<sup>[31–33]</sup>

### 1.2.3 Mechanismus štěpení DNA pomocí komplexů derivátů TACN s ionty Cu(II)

K objasnění mechanismu štěpení DNA pomocí komplexů přechodných kovů bývá využíván modelový substrát bis(4-nitrofenyl)fosfát (BNPP), jehož struktura je ukázána na *Obr. 3*. Tento substrát obsahuje fosfodiesterovou skupinu stejně, jako je tomu u DNA. Jeho výhodou je snadná analýza produktů hydrolytického štěpení pomocí několika analytických

metod, jako je například UV/VIS spektroskopie, kde bývá pozorován produkt hydrolyzy 4-nitrofenolát, který absorbuje při 400 nm.



Obr. 3: Modelový substrát BNPP.

Obecně přijímaný mechanismus štěpení substrátu BNPP pomocí komplexu TACN s Cu(II) ionty je zobrazen na *Schématu 2*.<sup>[34]</sup>

Komplex ligandu TACN s Cu(II) ionty existuje v rovnováze mezi monomerní diaqua/monoaqua-monohydroxido formou a dimerní bis( $\mu$ -hydroxido) formou. Dimerní forma neumožňuje koordinaci substrátu BNPP a je tedy hydrolyticky neaktivní. V mM koncentraci komplexu dimerní forma silně převažuje při pH 7,3, tedy při hodnotě blízké fyziologické.<sup>[29]</sup>

V případě hydrolyticky aktivního monomeru dochází v prvním kroku ke koordinaci atomu kyslíku ze substrátu a k nukleofilnímu ataku hydroxidové skupiny na fosforový atom za vzniku penta-koordinovaného přechodového stavu na atomu fosforu. Následně dochází k odstoupení 4-nitrofenolátu za vzniku dalšího přechodového stavu, který dále disociuje a uvolňuje 4-nitrofenylfosfát (NPP).

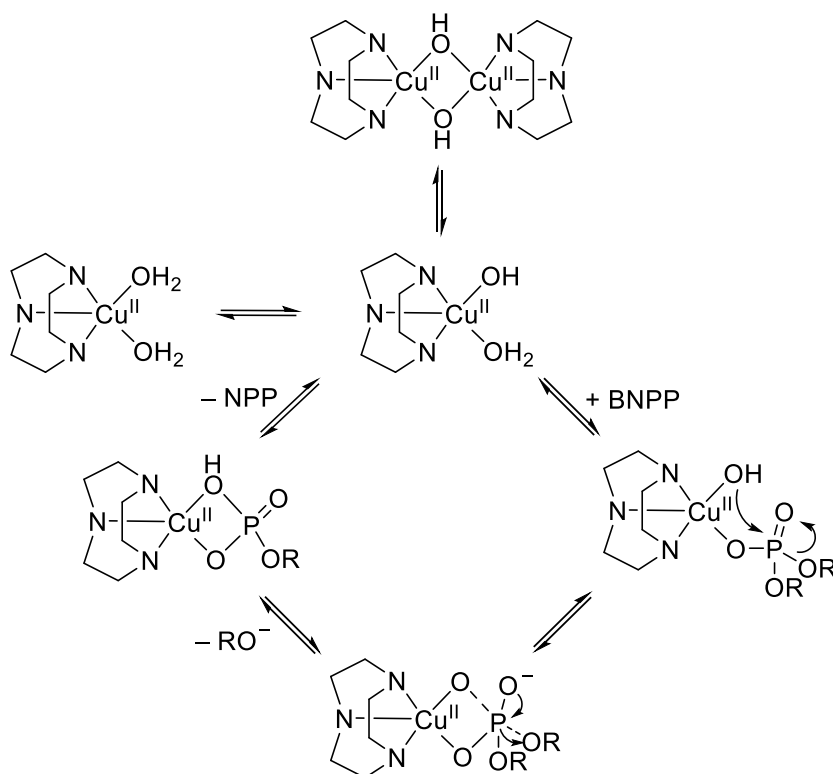


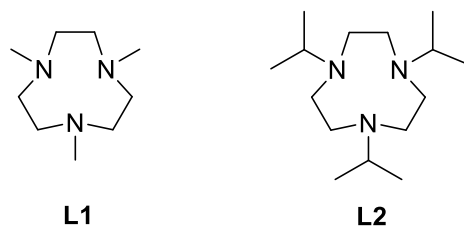
Schéma 2: Obecně přijímaný mechanismus štěpení substrátu BNPP pomocí komplexu TACN s ionty Cu(II).<sup>[34]</sup>

Posunout rovnováhu směrem k aktivní monomerní formě lze zavedením stéricky objemnějších substituentů na výchozí ligand TACN. Míru tvoření hydrolyticky neaktivní dimerní formy popisuje dimerizační konstanta  $K_{\text{dim}}$ , kterou lze pro komplex TACN s Cu(II) vyjádřit rovnicí (1)<sup>[31]</sup>.

$$K_{\text{dim}} = \frac{[\text{Dimer}]}{[\text{Cu-OH}^+]^2} \quad (1)$$

kde  $[\text{Cu-OH}^+]$  je rovnovážná koncentrace monomerní monoaqua-monohydroxido formy a  $[\text{Dimer}]$  je rovnovážná koncentrace hydrolyticky neaktivní dimerní formy.

Pro Cu(II) komplexy TACN a ligandů L1 a L2 zobrazených na Obr. 4 jsou konstanty dimerizace  $\log K_{\text{dim}}$ <sup>[31,35]</sup> uvedeny v Tab. 1.



*Obr. 4:* Ligandy L1 a L2, jejichž komplexům s Cu(II) byly v literatuře<sup>[31,35]</sup> publikovány hodnoty dimerizačních konstant  $\log K_{\text{dim}}$ .

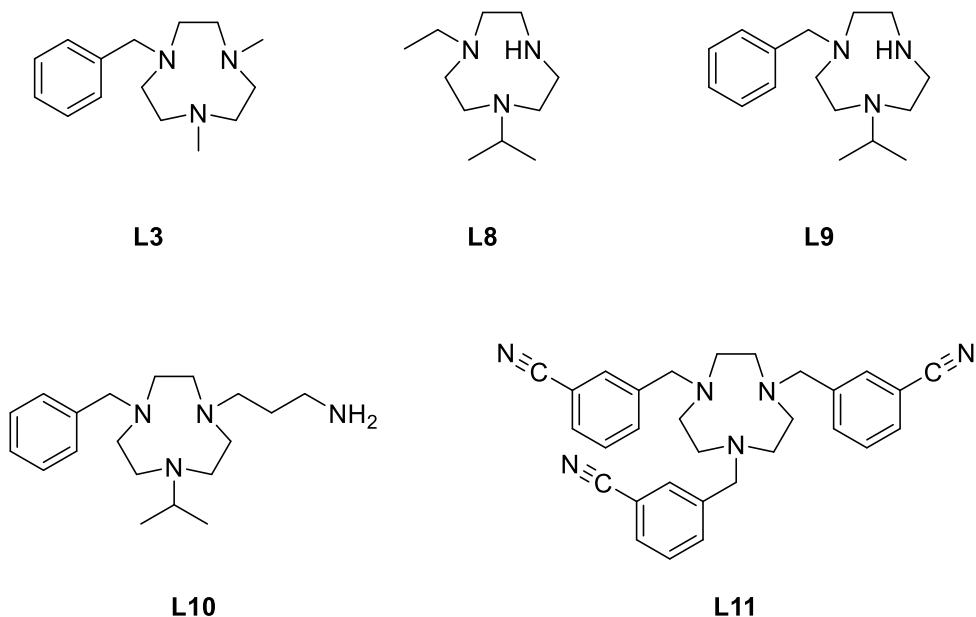
*Tab. 1:* Hodnoty dimerizačních konstant  $\log K_{\text{dim}}$  pro komplexy ligandů TACN a L1–L2 při 50 °C.

Komplex Cu(II) ligandu	$\log K_{\text{dim}}$
TACN	4,1 <sup>[35]</sup>
L1	3,48 <sup>[31]</sup>
L2	3,1 <sup>[35]</sup>

Z údajů uvedených v *Tab. 1* vyplývá, že zavádění objemnějších skupin na výchozí ligand TACN je spojeno se snižováním hodnoty dimerizační konstanty  $\log K_{\text{dim}}$  a s posunutím rovnováhy dimer–monomer směrem k hydrolyticky aktivnímu monomeru.

Konzistentně s těmito údaji bylo publikováno,<sup>[31–33]</sup> že komplex TACN s Cu(II) v porovnání s jeho *N*-alkyl deriváty jeví ve všech případech významně nižší rychlost hydrolýzy substrátu BNPP. Další ze studovaných derivátů jsou zobrazeny na *Obr. 4* a *5*.

Rychlostní konstanty  $k_{\text{obs}}$  komplexů Cu(II) s ligandem TACN a s ligandy zobrazenými na *Obr. 4* a *5* jsou uvedeny v *Tab. 2*.



Obr. 5: Publikované deriváty<sup>[32,33]</sup> ligandu TACN využívané pro studium umělých nukleáz.

Tab. 2: Rychlostní konstanty  $k_{\text{obs}}$  štěpení substrátu BNPP pomocí Cu(II) komplexů ligandů TACN, L1–L3 a L8–L11. Struktury ligandů viz Obr. 2, 4 a 5.

Komplex Cu(II) ligandu	pH	$T$ [°C]	$k_{\text{obs}}$ [ $\cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ]	Ref.
TACN	$7,24 \pm 0,2$	50	$0,13^{\text{a}}$	[34]
L1	7,4	50	$3,67^{\text{b}}$	[31]
L2	7,2	50	$4,28 \pm 0,09^{\text{c}}$	[35]
L3	7,4	50	$7,01 \pm 0,02^{\text{d}}$	[33]
L8	7,4	50	$1,43 \pm 0,01^{\text{b}}$	[32]
L9	7,4	50	$1,53 \pm 0,01^{\text{b}}$	[32]
L10	7,4	50	$0,0480 \pm 0,0001^{\text{b}}$	[32]
L11	7,4	50	$30,2 \pm 0,2^{\text{d}}$	[33]

<sup>a</sup>[BNPP] = 5,00 mM, [Komplex] = 1,00 mM,  $I$  = 0,50 M (5M NaClO<sub>4</sub>), 50 mM HEPES pufr, měřeno v H<sub>2</sub>O, <sup>b</sup>[BNPP] = 15 μM, [Komplex] = 1 mM,  $I$  = 0,15 M (NaClO<sub>4</sub>), 50 mM MOPS pufr, měřeno v H<sub>2</sub>O, <sup>c</sup>[BNPP] = 1,0 mM, [Komplex] = 0,20 mM,  $I$  = 0,10 M (NaNO<sub>3</sub>), 50 mM HEPES pufr, měřeno v H<sub>2</sub>O, <sup>d</sup>[BNPP] = 15 μM, [Komplex] = 1 mM,  $I$  = 0,15 M (NaClO<sub>4</sub>), MOPS pufr, měřeno v 1:3 MeCN/H<sub>2</sub>O.

Již pouhou substitucí atomů vodíku aminových skupin ligandu TACN za tři methylové skupiny (L1) dochází u komplexu Cu(II) za podobných podmínek k téměř 30-ti násobnému



zrychlení hydrolyzy substrátu BNPP. Obdobně velkému zrychlení hydrolyzy dochází i v případě komplexu s ligandem L2. Substitucí jedné methylové skupiny ligandu L1 za objemnější benzylovou skupinu (L3) lze docílit téměř dvojnásobného zrychlení hydrolyzy substrátu BNPP. Oproti tomu Cu(II) komplex s ligandem L11 dosahuje více než osminásobné rychlosti hydrolyzy oproti Cu(II) komplexu s ligandem L1. Tato vlastnost je vysvětlována velkou stericou náročností benzylové, resp. 3-kyanobenzylových skupin ligandů L3 a L11. Ke zvýšení rychlosti hydrolyzy BNPP oproti výchozímu Cu(II) komplexu TACN mohou kromě sterickej náročnosti substituentů přispívat i interakce hydrofobních substituentů, které interagují s benzylovými skupinami substrátu BNPP.<sup>[35]</sup> Tato teorie by byla v souladu s pozorovaným vzrůstem rychlosti hydrolytického štěpení komplexu Cu(II) v řadě ligandů  $L1 < L2 < L3 \ll L11$ .

V případě Cu(II) komplexů di-substituovaných derivátů TACN (ligandy L8 a L9) je zrychlení vůči výchozímu Cu(II) komplexu TACN v porovnání s tri-substituovanými deriváty ve všech popsáných případech méně výrazné. Konkrétně komplex s ligandy L8 a L9 štěpí substrát BNPP přibližně 2,5krát pomaleji než komplex tri-substituovaného ligandu L1, přičemž oba komplexy s ligandy L8 a L9 štěpí substrát téměř stejnou rychlostí. Nicméně ukazuje se, že zavedení pouze dvou substituentů je dostatečné pro významné zrychlení hydrolyzy substrátu BNPP oproti TACN.

Rozdílně je tomu u komplexu s ligandem L10, který obsahuje alkylaminové pendantní rameno. V tomto případě dochází ke koordinaci tohoto ramena k centrálnímu iontu kovu. Pro komplexy dvojmocné mědi s těmito typy ligandů bývá běžnou geometrií čtvercově pyramidální či trigonálně bipyramidální uspořádání. Z tohoto důvodu pro Cu(II) komplex s ligandem L10 zbývá pouze jedno koordinační místo, tudíž je současná koordinace  $H_2O/OH^-$  iontů a BNPP nemožná. To má za následek velmi nízkou rychlost štěpení substrátu BNPP oproti ostatním diskutovaným Cu(II) komplexům.

Pro obdobné porovnání hydrolytické aktivity pro mono-substituované deriváty ligandu TACN nejsou žádná publikovaná data.

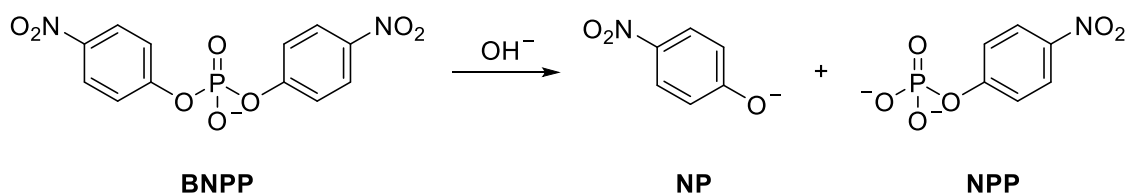
Výše uvedené poznatky z literatury lze shrnout do několika bodů:

- 1) Cu(II) komplexy více *N*-alkyl-substituovaných derivátů ligandu TACN hydrolyzují substrát BNPP rychleji než méně substituovaná analoga.
- 2) V případě komplexu třikrát substituovaného ligandu TACN hydrolyzuje více komplex ligandu, který obsahuje více sterickej náročné substituenty.

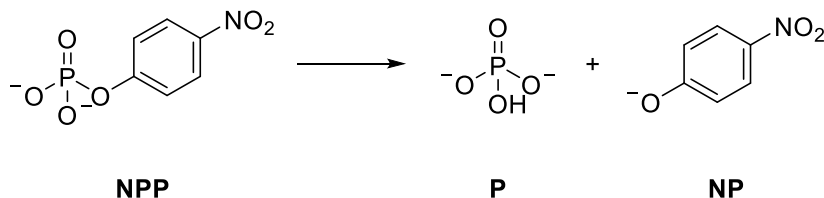
- 3) V případě komplexu di-substituovaného ligandu TACN má změna právě jednoho substituentu jen malý vliv na rychlost hydrolýzy.
- 4) V případě přítomnosti pendantního ramena schopného koordinace k centrálnímu atomu je rychlost hydrolytického štěpení substrátu BNPP velmi pomalá.

### 1.3 Metody sledování hydrolýzy modelového substrátu BNPP

Metody sledování hydrolýzy modelového substrátu bis(4-nitrofenyl)fosfátu (BNPP) jsou většinou založeny na absorpčních vlastnostech 4-nitrofenolátu (produktu hydrolýzy, NP), který absorbuje při 400 nm. Reakce je znázorněna na *Schématu 3*. Tuto sloučeninu lze sledovat především pomocí spektrometrických metod, jako je spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/VIS) či vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV/VIS nebo hmotnostní detekcí (HPLC-UV/VIS, HPLC-MS). Hodnota molárního absorpčního koeficientu ( $\epsilon_\lambda$ ) vzniklého 4-nitrofenolátu (NP) je  $18\,700\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .<sup>[35]</sup> Dalším produktem hydrolýzy je (4-nitrofenyl)fosfát (NPP), který je v druhém stupni hydrolyzován za vzniku fosfátu (P) a NP (*Schéma 4*). Hydrolytické štěpení NPP je podle literatury<sup>[31]</sup> 50–100krát pomalejší, než je tomu u prvního hydrolytického štěpení BNPP.



*Schéma 3.*: Hydrolytické štěpení modelového substrátu BNPP do prvního stupně.



*Schéma 4*: Hydrolytické štěpení modelového substrátu BNPP do druhého stupně.

Produkty hydrolytického štěpení substrátu BNPP (viz *Schémata 3 a 4*) lze pomocí vhodné mobilní fáze separovat na HPLC. Z chromatogramu lze následně analyzovat jednotlivé píky na základě vlnové délky, při které jednotlivé složky absorbují, a na základě dat z hmotnostního spektrometru.

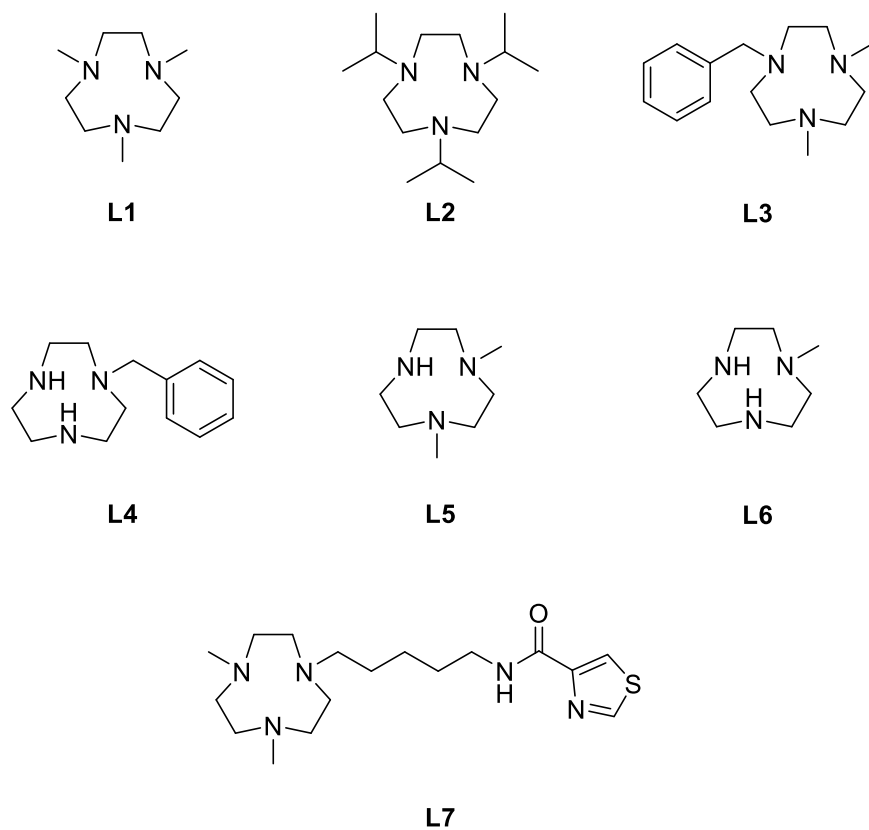
V literatuře<sup>[34]</sup> byl popsán experiment, ve kterém byla jako mobilní fáze použita směs 1:1 MeOH:fosfátový pufr (pH = 7,0). Za těchto podmínek byly z kolony C-18 (150 mm, 5  $\mu$ m) eluovány produkty hydrolýzy v pořadí 4-nitrofenylfosfát ( $t_R$  = 1,4 min), 4-nitrofenolát ( $t_R$  = 3,5 min) a výchozí bis(4-nitrofenyl)fosfát ( $t_R$  = 4,3 min). V průběhu hydrolýzy docházelo k růstu intenzity píků odpovídajícím produktů štěpení a ke klesání intenzity píku odpovídajícímu výchozímu substrátu.

## 2. Cíle práce

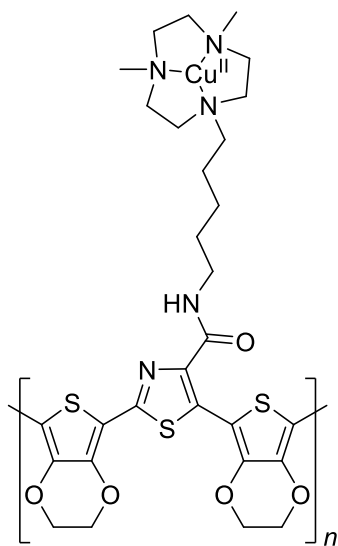
Deriváty makrocyclického ligandu TACN jsou využívány pro studium nukleázové aktivity jejich Cu(II) komplexů.<sup>[30–33]</sup> Tyto komplexy se díky své nukleázové aktivitě jeví jako potenciálně použitelné pro boj s rezistentními bakteriálními biofilmy. Tato diplomová práce si klade za cíl připravit deriváty L1–L7 ligandu TACN (*Obr. 6*), vyhodnotit nukleázovou aktivitu jejich Cu(II) komplexů a porovnat ji s Cu(II) komplexem výchozího ligandu TACN. Ligand L7 byl navržen pro budoucí zabudování jeho Cu(II) komplexu do polymerních nosičů skrze thiazolovou postranní skupinu (*Obr. 7*). V případě prokázání nukleázové aktivity Cu(II) komplexu ligandu L7 by tedy byl tento komplex vhodný pro přípravu antimikrobiálních polymerních povrchů. Dalším cílem bylo nastavit optimální experimentální podmínky pro sledování nukleázové aktivity připravených Cu(II) komplexů pomocí metod UV/VIS spektroskopie a HPLC-UV/VIS a HPLC-MS.

Ačkoli Cu(II) komplexy ligandů TACN, L1, L2, L3 studované v této diplomové práci již byly za stejným účelem publikovány,<sup>[31,33–35]</sup> tak experimentální podmínky ani metody vyhodnocování experimentů v těchto publikacích nebyly jednotné a často byly velmi vzdálené od fyziologických podmínek (ať už hodnotou pH, teplotou nebo použitím základních elektrolytů pro udržení konstantní iontové síly). Tato diplomová práce si proto klade za cíl vyhodnotit nukleázovou aktivitu všech připravených Cu(II) komplexů za shodných podmínek blízkým fyziologickým.

Posledním cílem diplomové práce byla optimalizace reakčních podmínek a čištění připravovaných ligandů L3–L5, které již byly dříve syntetizovány v rámci bakalářské práce.<sup>[36]</sup>



Obr. 6: Ligandy L1–L7 syntetizované v rámci diplomové práce.



Obr. 7: Návrh na možné zabudování Cu(II) komplexu připraveného ligandu L7 do PEDOT polymerního nosiče.

## 3. Experimentální část

### 3.1 Seznam použitých chemikálií

Chemikálie potřebné k přípravě cílových ligandů a komplexů byly zakoupeny od komerčních prodejců VWR, Merck, Lachema, Fluka, Acros a CheMaTech. Není-li uvedeno jinak, rozpouštědla byla použita bez předchozího sušení nebo čištění. Látka bis(4-nitrofenyl)fosfát (BNPP) a 4-thiazolkarboxylová kyselina byly připraveny v rámci bakalářské práce.<sup>[36]</sup>

### 3.2 Metody charakterizace a čištění připravených látek

#### 3.2.1 NMR spektroskopie

Spektra jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  byla naměřena na spektrometrech Varian VNMRS300 a Bruker Avance III HD 400. Jako vnitřní standard pro měření  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR byl v případě měření v  $\text{CDCl}_3$  použit TMS ( $\delta = 0,00$  ppm). Rezonanční frekvence měřených jader jsou uvedena v *Tab. 3*. Naměřená data byla zpracována v programu MestReNova.<sup>[37]</sup>

*Tab. 3:* Rezonanční frekvence měřených jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ .

Měřené jádro	Rezonanční frekvence [MHz]	
	VNMRS300	Avance III HD 400
$^1\text{H}$	299,9	400,1
$^{13}\text{C}$	75,4	100,6

#### 3.2.2 Metoda HPLC-UV/VIS a HPLC-MS

HPLC chromatogramy byly naměřeny na přístroji Waters Arc HPLC System s UV/VIS detektorem na koloně Cortecs C18 2,7  $\mu\text{m}$  (4,6x50 mm) s průtokem mobilní fáze 1,200 ml/min. Hmotnostní spektra byla naměřena pomocí hmotnostního detektoru Waters

ACQUITY QDa s ionizací duálním ortogonálním elektrosprejem za atmosférického tlaku s kvadrupólovým analyzátozem. Data byla zpracována v softwaru Empower 3.<sup>[38]</sup>

Za účelem charakterizace připravených komplexů byl použit gradient mobilních fází uvedený v *Tab. 4*. U charakterizací připravených látek byly uvedeny pouze intenzivní interpretované signály.

*Tab. 4:* Gradient mobilních fází použitý při metodě HPLC-UV/VIS a HPLC-MS.

<i>t</i> [min]	%H <sub>2</sub> O (0,1 % TFA)	%MeCN (0,1 % TFA)
0,00	95,0	5,0
3,50	0,0	100,0
4,00	0,0	100,0
5,00	95,0	5,0

### 3.2.3 UV/VIS spektroskopie

Za účelem pozorování hydrolyzy substrátu BNPP vlivem připravených komplexů byla změřena UV/VIS spektra na spektrometru Specord 50 PLUS s měřicím rozsahem 190–1100 nm. Experimenty byly měřeny v křemenných kyvetách s optickou drahou 1 cm a objemem 1 ml. K nastavení parametrů měření byl použit program WinASPECT PLUS.

Za účelem měření absorpčních spekter připravených komplexů byl použit přístroj WPA Lightwave II od společnosti Biochrom. Rozsah měření byl nastaven na 300–900 nm. Absorpční spektra byla měřena v křemenných kyvetách s optickou drahou 1 cm a objemem 1 ml.

### 3.2.4 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla prováděna na destičkách TLC Aluminium Plates Silica F254 od výrobce VWR. K vizualizaci bylo použito Dragendorffovo činidlo (roztok Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, KI a kyseliny octové) a UV lampa s vlnovými délkami 254 a 366 nm.

### 3.2.5 Semi-preparativní HPLC

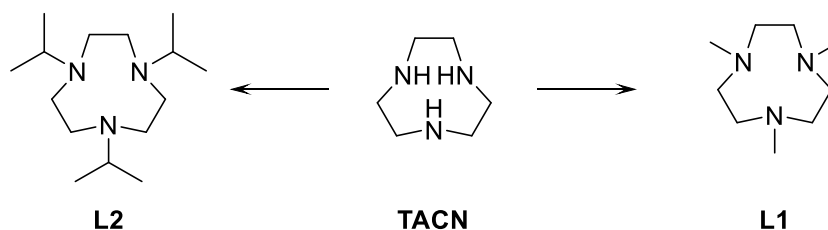
Pro dočištění připraveného ligandu L7 byl použit preparativní chromatografický systém od společnosti Waters sestávající z Waters 2535 Quarternary Gradient module, Waters 2489 UV/Visible Detector a z Waters Fraction Collector III. Byla použita chromatografická kolona Luna 5 $\mu$ m C18(2) 250 x 21,2 mm. K eluci látek byly použity mobilní fáze H<sub>2</sub>O (0,1 % TFA) a MeCN (0,1 % TFA) s gradientem uvedeným v *Tab. 5*. Průtok byl nastaven na 10,00 ml/min.

*Tab. 5:* Gradient mobilních fází použitý při semi-preparativní HPLC.

<i>t</i> [min]	%H <sub>2</sub> O (0,1 % TFA)	%MeCN (0,1 % TFA)
0,00	100,0	0,0
2,00	100,0	0,0
30,00	0,0	100,0
33,00	100,0	0,0

### 3.3 Syntetická část

Syntetická část se skládá z přípravy třikrát substituovaných derivátů ligandu TACN (*Schéma 6*), přípravy vedoucí k cílovému ligandu L7, během které byly připraveny i ligandy L3–L5 (*Schéma 7*), přípravy monomethyl-derivátu (L6) ligandu TACN (*Schéma 8*), a z přípravy alkylačního činidla *N*-(5-brompenty)ftalimidu (*Schéma 9*).



*Schéma 6:* Příprava třikrát substituovaných derivátů L1 a L2 výchozího ligandu TACN.



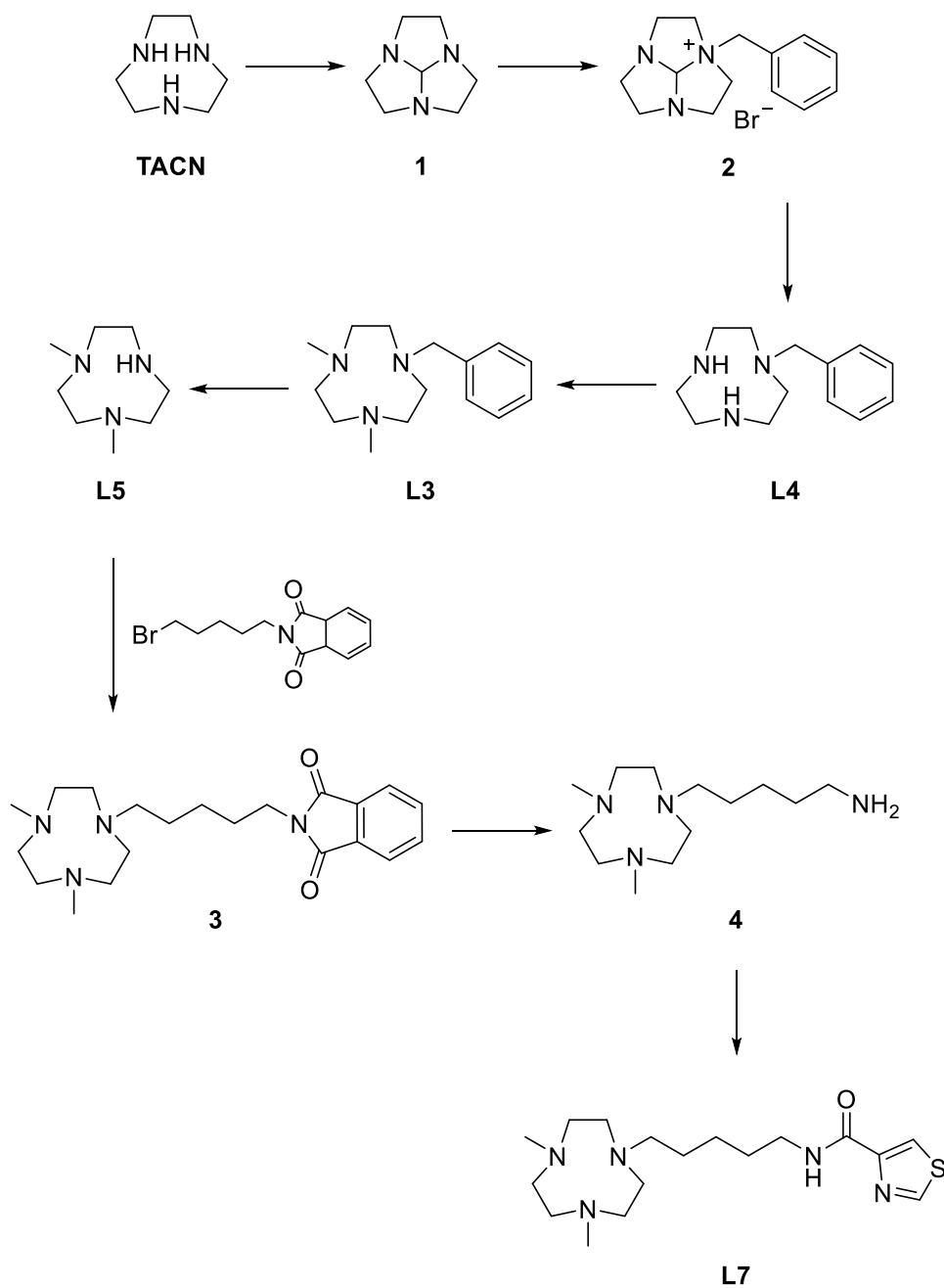


Schéma 7: Příprava ligandů L3–L5 a příprava cílového ligandu s thiazolovou kotvou (L7).

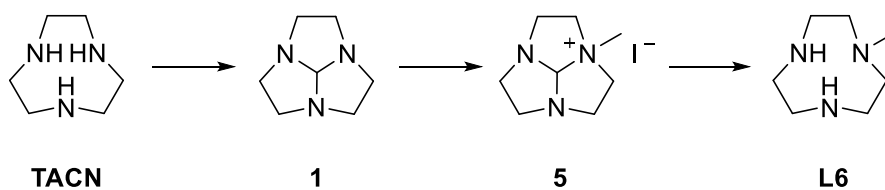


Schéma 8: Příprava monomethyl-derivátu L6 výchozího ligandu TACN.

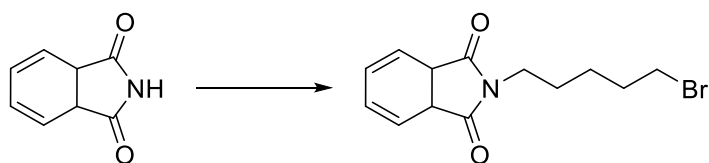
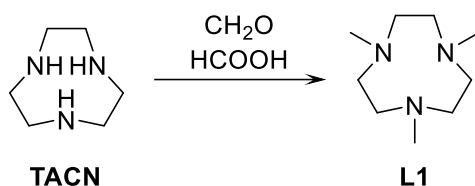


Schéma 9: Příprava alkylačního činidla *N*-(5-brompentyl)ftalimidu.

### 3.3.1 Příprava 1,4,7-trimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L1)



Do 25ml baňky bylo přidáno 202 mg (1,57 mmol) TACN, který byl rozpuštěn v 7,5 ml (101 mmol) 37% roztoku formaldehydu. Za stálého míchání bylo injekční stříkačkou postupně přidáno 2,0 ml (53,0 mmol) 99-100% kyseliny mravenčí. Výsledná směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na 110 °C po dobu 24 hod. Po skončení zahřívání byla směs ponechána chladnout na laboratorní teplotu. Následně bylo upraveno pH směsi přidávkem 10% roztoku NaOH na hodnotu přibližně 12 (ověřeno pH papírkem). Směs byla poté extrahována 3x20 ml CHCl<sub>3</sub>. Organické fáze byly spojeny a vysušeny přidávkem sušidla Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odfiltrování sušidla přes fritu S3 byl filtrát odpařen na RVO za vzniku 232 mg čisté látky L1 ve formě bezbarvého oleje.

Výtěžek: 232 mg (86 %).

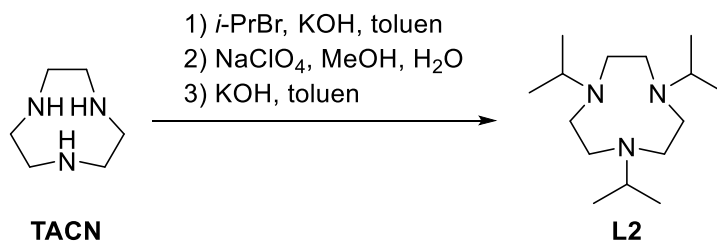
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 299,9 MHz): δ 2,36 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,65 (s, 12H, CH<sub>2</sub> cykl.).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75,4 MHz): δ 46,76 (CH<sub>3</sub>), 57,06 (CH<sub>2</sub>).

TLC: EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq.) = 5:1, *R<sub>f</sub>* = 0,50 (detekce Dragendorffovým činidlem).

MS–ESI (+): 172,25 ([M+H]<sup>+</sup>).

### 3.3.2 Příprava 1,4,7-tris(isopropyl)-1,4,7-triazacyklononanu (L2)



Do 5,5 ml toluenu bylo přidáno 0,69 g (5,34 mmol) TACN a 2,67 g (21,7 mmol) isopropylbromidu. Vzniklá směs byla zahřívána na 85 °C po dobu 2 hodin. Následně bylo přidáno 1,04 g pevného KOH a směs byla zahřívána dále po dobu 5 h na 85 °C. Po vychladnutí směsi byla pevná složka odfiltrována přes fritu S3 a filtrát byl odpařen na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 11 ml MeOH a za stálého míchání bylo přidáno 0,69 g (5,66 mmol) pevného NaClO<sub>4</sub>. Následně byla postupně přikapávána destilovaná H<sub>2</sub>O do doby, než vznikl bílý zákal. Poté byla směs skladována přes noc při -18 °C. Monohydroperchlorát látky L2 se z roztoku vysrážel ve formě bílého prášku, který byl odfiltrován přes fritu S3 a vysušen mezi listy filtračního papíru. Po vysušení bylo 1,06 g této látky rozpuštěno v 15 ml toluenu. Poté bylo přidáno 1,20 g pevného KOH a směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 hodin. Po odfiltrování vysráženého KClO<sub>4</sub> přes fritu S4 byl filtrát odpařen na RVO za vzniku 0,71 g čisté látky L2 ve formě bezbarvého oleje.

Výtěžek: 0,71 g (52 %).

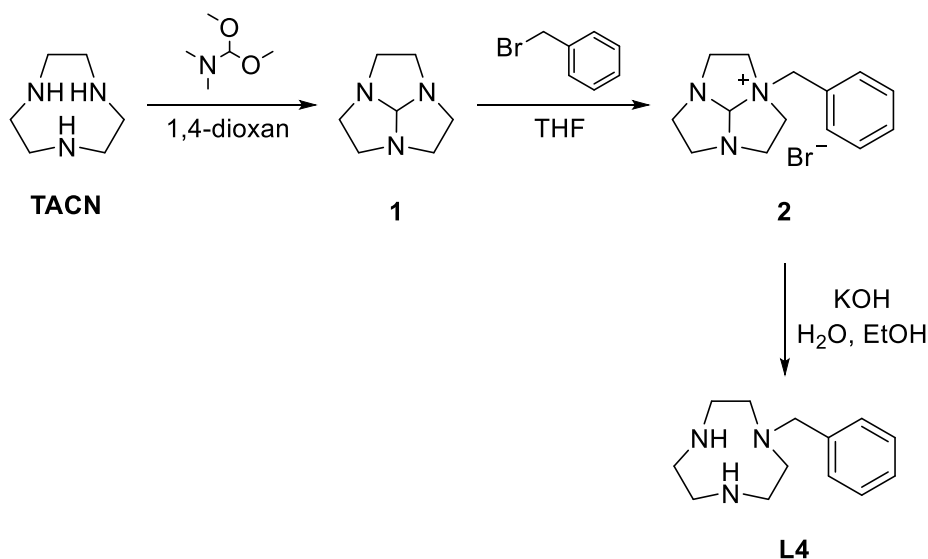
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 299,9 MHz): δ = 0,96 (d, 18H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,53 Hz, CH<sub>3</sub>), 2,63 (s, 12H, CH<sub>2</sub>), 2,86 (septet, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,37 Hz, CH).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75,4 MHz): δ = 18,33 (CH<sub>3</sub>), 52,73 (CH<sub>2</sub> cykl.), 54,30 (CH<sub>2</sub> cykl.).

TLC: EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq.) = 5:1, R<sub>f</sub> = 0,35 (detekce Dragendorffovým činidlem).

MS-ESI (+): 255,44 ([M+H]<sup>+</sup>).

### 3.3.3 Příprava 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononanu (L4)



Postup přípravy vychází z upraveného postupu popsáno v bakalářské práci.<sup>[38]</sup>

Ve 25ml baňce bylo rozpuštěno 741 mg (5,74 mmol) TACN v 10 ml 1,4-dioxanu. Následně bylo přidáno 1,0 ml (7,48 mmol) 97% dimethylacetal-*N,N*-dimethylformamidu. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na 110 °C po dobu 3 hodin. Po vychladnutí byla směs odpařena na RVO za vzniku světle žluté olejovité látky **1**. Látka **1** byla rozpuštěna v 10 ml THF. Za intenzivního míchání bylo přikapáno 0,75 ml (6,32 mmol) benzylbromidu. Téměř okamžitě se začala srážet látka **2** ve formě světle žlutého prášku, který byl z roztoku izolován filtrací přes fritu S3 a propláchnutím 50 ml THF. Látka **2** byla kvantitativně převedena do 100ml baňky promytím frity 10 ml EtOH a 6 ml H<sub>2</sub>O. Do roztoku bylo přidáno 2,40 g pevného KOH. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na 100 °C po dobu 3 dní. Po vychladnutí bylo ke směsi přidáno 20 ml 10% vodného roztoku NaOH a vodná fáze byla extrahována 3x30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organické fáze byly spojeny, vysušeny pomocí bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrovány přes fritu S3 a odpařeny na RVO. Vzniklý produkt **L4** byl přečištěn chromatograficky na sloupci silikagelu s mobilní fází EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq.) = 5:1.

Výtěžek: 1,10 g (88 %).

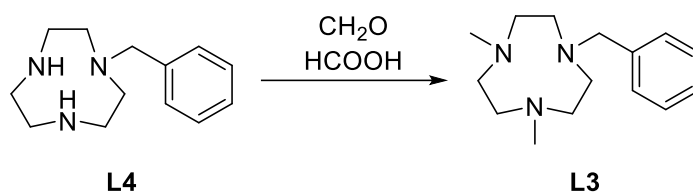
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 299,9 MHz): δ 2,68 (m, 8H, CH<sub>2</sub> cykl.), 2,82 (s, 4H, CH<sub>2</sub> cykl.), 3,28 (2H, bs, NH cykl.), 3,73 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7,31 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> arom.).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75,4 MHz):  $\delta$  46,66 ( $\text{CH}_2$ ), 52,81 ( $\text{CH}_2$ ), 61,62 ( $\text{CH}_2$ ), 126,94 ( $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.), 128,21 ( $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.), 128,93 ( $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.), 139,70 ( $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.).

TLC:  $\text{EtOH}:\text{NH}_3(\text{konc.aq.}) = 5:1$ ,  $R_f = 0,40$  (detekce Dragendorffovým činidlem a UV).

MS–ESI (+): 220,29 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

### 3.3.4 Příprava 1-benzyl-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L3)



Látka L3 byla připravena podle upraveného postupu uvedeného v bakalářské práci.<sup>[38]</sup> K 0,66 g (3,01 mmol) látky L4 bylo přidáno 6 ml (80,8 mmol) 37% vodného roztoku formaldehydu a 3,5 ml (92,8 mmol) 99–100%  $\text{HCOOH}$ . Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 1 den při 110 °C. Po vychladnutí směsi bylo upraveno pH 10% vodným roztokem  $\text{NaOH}$  na přibližně 12 (ověřeno pH papírkem). Následovala extrakce 3x40 ml  $\text{CHCl}_3$ . Spojené organické fáze byly vysušeny přidávkem bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Sušidlo bylo odfiltrováno přes fritu S3 a filtrát byl odpařen na RVO za vzniku žlutého oleje. Podle TLC ( $\text{EtOH}:\text{NH}_3(\text{konc.aq.}) = 5:1$ , detekce Dragendorffovým činidlem a UV) obsahoval odparek kromě produktu ( $R_f = 0,50$ ) i nečistotu ( $R_f = 0,85$ ), která nebyla identifikována. Produkt byl přečištěn chromatograficky na sloupci silikagelu s mobilní fází  $\text{EtOH}:\text{NH}_3(\text{konc.aq.}) = 5:1$  a vybrané frakce byly odpařeny na RVO. Vzniklo 0,59 g čisté látky L3 ve formě světle žlutého oleje.

Výtěžek: 0,59 g (80 %).

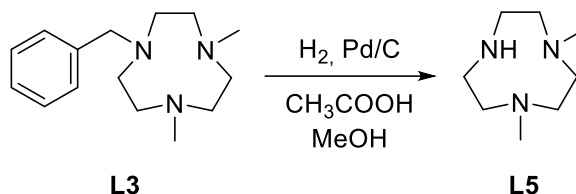
$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 299,9 MHz):  $\delta$  2,37 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 2,72 (m, 8H,  $\text{CH}_2$  cykl.), 2,85 (s, 4H,  $\text{CH}_2$  cykl.), 3,68 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,31 (m, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75,4 MHz):  $\delta$  46,56 ( $\text{CH}_3$ ), 55,99 ( $\text{CH}_2$  cykl.), 56,75 ( $\text{CH}_2$  cykl.), 57,04 ( $\text{CH}_2$  cykl.), 63,42 ( $\text{CH}_2$ ), 126,77 ( $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.), 128,13 ( $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.), 129,09 ( $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.).

TLC:  $\text{EtOH}:\text{NH}_3(\text{konc.aq.}) = 5:1$ ,  $R_f = 0,50$  (detekce Dragendorffovým činidlem a UV).

MS–ESI (+): 248,30 ([M+H]<sup>+</sup>).

### 3.3.5 Příprava 1,4-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L5)



Látka L5 byla připravena podle upraveného postupu uvedeného v bakalářské práci.<sup>[38]</sup> V 50ml baňce bylo rozpuštěno 250 mg (1,01 mmol) látky L3 v 20 ml MeOH. Následně bylo přidáno 50 mg Pd/C a 0,5 ml (8,74 mmol) konc. CH<sub>3</sub>COOH. Baňka byla evakuována přes redukci s kohoutem do doby, dokud ze směsi odcházel plyn. Poté byl k baňce připojen balónek naplněný H<sub>2</sub>. Hydrogenace probíhala při 50 °C po dobu 3 dnů. Po vychladnutí směsi byl odfiltrován katalyzátor a filtrát byl odpařen na RVO. Odparek byl naředěn cca 20 ml H<sub>2</sub>O a směs byla opět odpařena. Odparek byl rozpuštěn v 10 % vodném roztoku NaOH a extrahován 3x40 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organické fáze byly spojeny a vysušeny přidávkem bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odfiltrování sušidla byl filtrát odpařen na RVO. Podle TLC (EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq.) = 5:1) obsahoval odparek kromě produktu (*R<sub>f</sub>* = 0,50) i nečistotu (*R<sub>f</sub>* = 0,85), která nebyla dále analyzována. Produkt byl vyčištěn chromatograficky na sloupci silikagelu s mobilní fází EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq.) = 5:1 a vybrané frakce byly odpařeny na RVO. Vzniklo 80,1 mg látky L5 ve formě nažloutlého oleje.

Výtěžek: 80,1 mg (50 %).

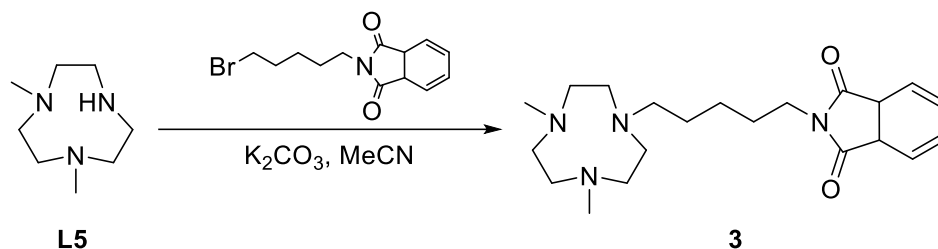
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400,1 MHz): δ 2,43 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2,50 (s, 4H, CH<sub>2</sub> cykl.), 2,67 (t, 4H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,01 Hz, CH<sub>2</sub> cykl.), 2,96 (t, 4H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,01 Hz, CH<sub>2</sub> cykl.).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100,6 MHz): δ 43,11 (CH<sub>3</sub>), 44,04 (CH<sub>2</sub> cykl.), 49,27 (CH<sub>2</sub> cykl.), 52,48 (CH<sub>2</sub> cykl.).

TLC: EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq.) = 5:1, *R<sub>f</sub>* = 0,50 (detekce Dragendorffovým činidlem a UV).

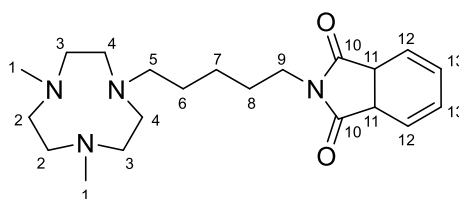
MS–ESI (+): 158,22 ([M+H]<sup>+</sup>).

### 3.3.6 Příprava 1-(5-ftalimidopentyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (3)



Do 100ml baňky bylo rozpuštěno 0,33 g (2,10 mmol) látky L5 v 25 ml MeCN. Následně byl přidán 1 g  $K_2CO_3$  a bylo přisypáno 0,74 g (2,48 mmol) *N*-(5-bromopentyl)ftalimidu. Výsledná směs byla míchána 3 dny pod zpětným chladičem při 85 °C. Po vychladnutí byl pevný podíl odfiltrován přes fritu S4 a filtrát odpařen na RVO za vzniku žlutého oleje, který podle TLC (EtOAc:Hexan = 1:1) obsahoval vedle produktu ( $R_f = 0$ ) i nečistotu ( $R_f = 0,85$ ), která nebyla dále analyzována. Produkt byl vyčištěn od nečistot pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze EtOAc:Hexan = 1:1) a následně byl eluován změnou mobilní fáze (EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq.) = 1:1). Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny na RVO za vzniku látky 3.

Výtěžek: 0,68 g (87 %).



Obr. 8: Označení atomů látky 3 pro přiřazení signálů z  $^1H$  a  $^{13}C$  NMR spekter.

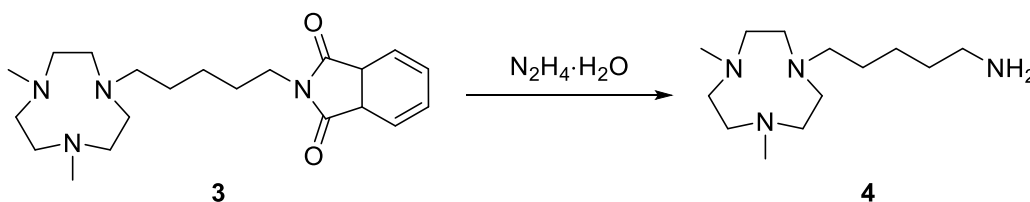
$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400,1 MHz):  $\delta = 1,44$  (m, 4H,  $H^{6/7}$ ),  $1,50$  (m, 4H,  $H^{6/7}$ ),  $1,71$  (m, 2H,  $H^8$ ),  $2,36$  (s, 6H,  $H^1$ ),  $2,46$  (s, 2H,  $H^5$ ),  $2,66$  (s, 8H,  $H^3$ ,  $H^4$ ),  $2,72$  (s, 4H,  $H^2$ ),  $3,70$  (m, 2H,  $H^9$ ),  $7,73$  (m, 2H,  $H^{13}$ ),  $7,85$  (m, 2H,  $H^{12}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100,6 MHz):  $\delta = 23,30$  ( $\text{C}^{6/7}$ ), 27,58 ( $\text{C}^{6/7}$ ), 28,50 ( $\text{C}^8$ ), 37,76 ( $\text{C}^9$ ), 46,68 ( $\text{C}^1$ ), 56,27 ( $\text{C}^{3/4}$ ), 56,86 ( $\text{C}^{3/4}$ ), 57,48 ( $\text{C}^2$ ), 59,08 ( $\text{C}^5$ ), 123,19 ( $\text{C}^{12}$ ), 132,18 ( $\text{C}^{11}$ ), 133,89 ( $\text{C}^{13}$ ), 168,46 ( $\text{C}^{10}$ ).

TLC: EtOH: $\text{NH}_3$ (konc.aq.) = 1:1,  $R_f = 0,90$  (detekce Dragendorffovým činidlem a UV).

MS–ESI (+): 373,41 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

### 3.3.7 Příprava 1-(5-aminopentyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (4)



K 0,68 g (1,81 mmol) látky 3 bylo přidáno 25 ml  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (64% hydrazin, 100% hydrát). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na 130 °C po dobu 4 dnů. Po ukončení zahřívání byla směs odpařena na RVO za vzniku žlutého oleje s bílou pevnou látkou, která byla odfiltrována přes fritu S4 a promyta  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Filtrát byl extrahován z 10% roztoku NaOH do  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x30 ml). Organické fáze byly spojeny, vysušeny přidavkem bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , přefiltrovány přes fritu S2 a odpařeny na RVO za vzniku žlutého oleje. Pomocí HPLC-MS byla potvrzena přítomnost produktu 4, který v tomto kroku nebyl dále čištěn.

Výtěžek: 0,29 g (66 %).

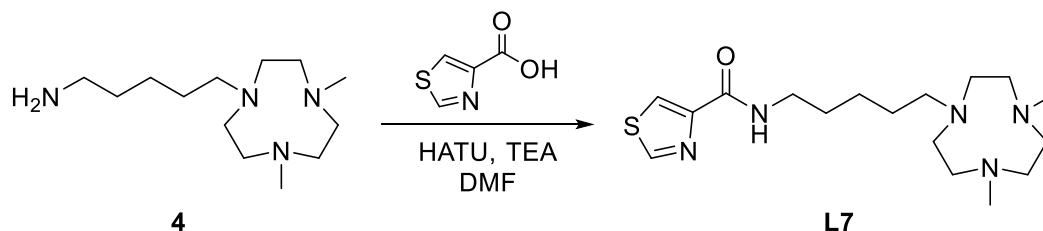
$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400,1 MHz):  $\delta = 1,26$ – $1,64$  (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 2,36 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 2,46 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,69 (m, 4H,  $\text{CH}_2$  cykl.), 2,71 (m, 8H,  $\text{CH}_2$  cykl.).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100,6 MHz):  $\delta = 23,03$  ( $\text{CH}_2$ ), 32,49 ( $\text{CH}_2$ ), 33,12 ( $\text{CH}_2$ ), 41,95 ( $\text{CH}_2$ ), 47,01 ( $\text{CH}_3$ ), 56,53 ( $\text{CH}_2$  cykl.), 56,61 ( $\text{CH}_2$  cykl.), 56,80 ( $\text{CH}_2$  cykl.).

MS–ESI (+): 243,36 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

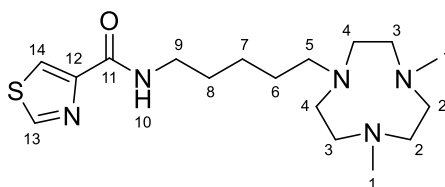


### 3.3.8 Příprava 1-[5-(thiazol-4-karboxamido)pentyl]-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L7)



V 100ml baňce bylo v 10 ml DMF rozpuštěno 300 mg (2,33 mmol) 4-thiazolkarboxylové kyseliny. K rozpuštěné látce bylo přidáno 242 mg (2,40 mmol) triethylaminu. Po přidavku triethylaminu se směs zbarvila do žluta. Poté bylo přidáno 895 mg (2,36 mmol) HATU. Následně byla směs intenzivně míchána po dobu 50 minut. Po uplynutí 50 minut byla ke směsi přidána směs 340 mg (1,40 mmol) látky 4 a 183 mg (3,17 mmol) triethylaminu v 10 ml DMF. Výsledná reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 2 dny. Následně byla směs odpařena na RVO za vzniku tmavě hnědé olejovité látky. Odparek byl rozpuštěn v 30 ml 0,4% vodného roztoku HCl a převeden do dělicí nálevky, kde byl extrahován 3x30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Hodnota pH vodné fáze byla upravena přidavkem 10% vodné roztoku NaOH na přibližně 12 (ověřeno pH papírkem). Následovala extrakce 3x30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organické fáze z bazické extrakce byly vysušeny přidavkem bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odfiltrování sušidla přes fritu S3 byl filtrát odpařen na RVO. Přítomnost produktu byla ověřena na HPLC-MS. Podle TLC (EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq) = 4:1) odparek obsahoval tři látky. Směs byla nanesena na sloupec silikagelu s mobilní fází EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq) = 4:1. Eluent s *R<sub>f</sub>* = 0,05 byl jímán do zkumavek. Frakce byly spojeny a odpařeny na RVO. Přítomnost produktu ve směsi byla potvrzena pomocí HPLC-MS. Produkt byl dočištěn na semi-preparativním HPLC (specifikace viz 3.2.5).

Výtěžek: 21,6 mg (4 %)



Obr. 9: Označení atomů ligandu L7 pro přiřazení signálů z  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter.

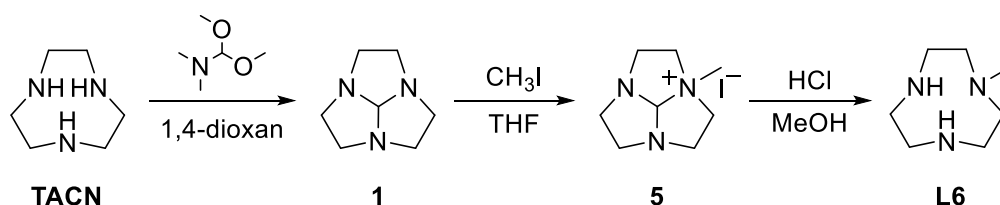
$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400,1 MHz):  $\delta = 1,44$  (m, 2H,  $\text{H}^7$ ), 1,67 (m, 2H,  $\text{H}^8$ ), 1,85 (m, 2H,  $\text{H}^6$ ) 2,77 (s, 6H,  $\text{H}^1$ ), 2,92 (m, 4H,  $\text{H}^2$ ), 2,99 (m, 4H,  $\text{H}^{3/4}$ ), 3,01 (m, 4H,  $\text{H}^{3/4}$ ), 3,12 (m, 2H,  $\text{H}^5$ ), 3,47 (m, 2H,  $\text{H}^9$ ), 7,52 (m, 1H,  $\text{H}^{10}$ ), 8,17 (m, 1H,  $\text{H}^{14}$ ), 8,77 (m, 1H,  $\text{H}^{13}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100,6 MHz):  $\delta = 23,48$  ( $\text{C}^{6/7}$ ), 23,72 ( $\text{C}^{6/7}$ ), 28,93 ( $\text{C}^8$ ), 38,51 ( $\text{C}^9$ ), 44,76 ( $\text{C}^1$ ), 48,31 ( $\text{C}^2$ ), 49,90 ( $\text{C}^{3/4}$ ), 51,75 ( $\text{C}^{3/4}$ ), 58,40 ( $\text{C}^5$ ), 123,26 ( $\text{C}^{14}$ ), 150,91 ( $\text{C}^{12}$ ), 152,83 ( $\text{C}^{13}$ ), 161,24 ( $\text{C}^{11}$ ).

TLC: EtOH: $\text{NH}_3$ (konc.aq) = 4:1,  $R_f = 0,05$  (detekce Dragendorffovým činidlem a UV).

MS-ESI (+): 354,31 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

### 3.3.9 Příprava 1-methyl-1,4,7-triazacyklononanu (L6)



Ve 20ml baňce bylo rozpuštěno 507 mg (3,93 mmol) TACN v 10 ml 1,4-dioxanu. Dále bylo přidáno 0,68 ml (5,09 mmol) 97% dimethylacetal-*N,N*-dimethylformamidu a směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po vychladnutí byla směs odpařena na RVO za vzniku světle žluté olejovité látky 1, která byla rozpuštěna v 10 ml THF a přesunuta do 20ml vialky. Za intenzivního míchání bylo injekční stříkačkou pomalu přidáno 0,62 ml (9,95 mmol)  $\text{CH}_3\text{I}$ . Z roztoku se okamžitě začal srážet světle hnědý prášek. Směs byla míchána při laboratorní teplotě 1 den. Vysrážená látka 5 byla odfiltrována na fritě S4, promyta THF a prosáta vzduchem. Světle hnědý prášek byl sušen mezi listy

filtračního papíru. Po vysušení byla látka 5 přesunuta do 100ml baňky, ve které byla rozpuštěna ve směsi 1:1 HCl(konc.aq.):MeOH. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na 80 °C po dobu 1 dne. Po vychladnutí směsi byl postupně přidáván pevný NaOH do pH přibližně 12 (ověřeno pH papírkem). Změna pH se projevila odbarvením hnědo-rudého roztoku do téměř bezbarvého. Následovala extrakce 3x30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organické fáze byly spojeny a vysušeny přídatkem bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sušidlo bylo odfiltrováno přes fritu S3 a filtrát byl odpařen na RVO za vzniku čisté látky L6 ve formě nažloutlého oleje.

Výtěžek: 383 mg (68 %).

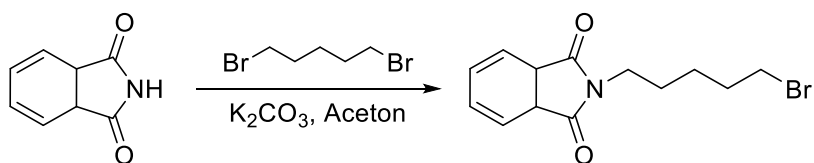
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400,1 MHz): δ 2,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,54 (m, 4H, CH<sub>2</sub> cykl.), 2,75 (m, 8H, CH<sub>2</sub> cykl.), 2,93 (bs, 2H, NH cykl.).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100,6 MHz): δ 44,92 (CH<sub>3</sub>), 45,81 (CH<sub>2</sub> cykl.), 45,98 (CH<sub>2</sub> cykl.), 54,14 (CH<sub>2</sub> cykl.).

TLC: EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq.) = 5:1, R<sub>f</sub> = 0,20 (detekce Dragendorffovým činidlem).

MS–ESI (+): 144,21 ([M+H]<sup>+</sup>).

### 3.3.10 Příprava *N*-(5-brompentyl)ftalimidu



V 250ml baňce bylo ve 150 ml acetonu rozpuštěno 10,0 g (7,12 mmol) 97% 1,5-dibrompentanu. Dále bylo přidáno 10,2 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Za stálého míchání bylo po částech přidáváno 2,08 g (14,0 mmol) ftalimidu. Směs byla zahřívána pod zpětných chladičem na 80 °C po dobu 24 hodin. Po vychladnutí byla směs přefiltrována přes fritu S3 a filtrát odpařen na RVO. Produkt byl přečištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (mobilní fáze EtOAc:Hexan 1:3). Vybrané frakce byly spojeny a odpařeny na RVO za vzniku bezbarvého oleje, který po vychladnutí krystalizoval v bílou krystalickou látku.

Výtěžek: 3,25 g (78 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 299,9 MHz):  $\delta$  1,51 (m, 2H), 1,71 (p, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,52 \text{ Hz}$ , 7,55 Hz), 1,91 (p, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,71 \text{ Hz}$ , 6,79 Hz), 3,40 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6,71 \text{ Hz}$ ), 3,70 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,19 \text{ Hz}$ ), 7,71 (dd, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 5,46 \text{ Hz}$ , 3,05 Hz,  $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.), 7,84 (dd, 2H,  $J = 5,47 \text{ Hz}$ , 3,06 Hz,  $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.).

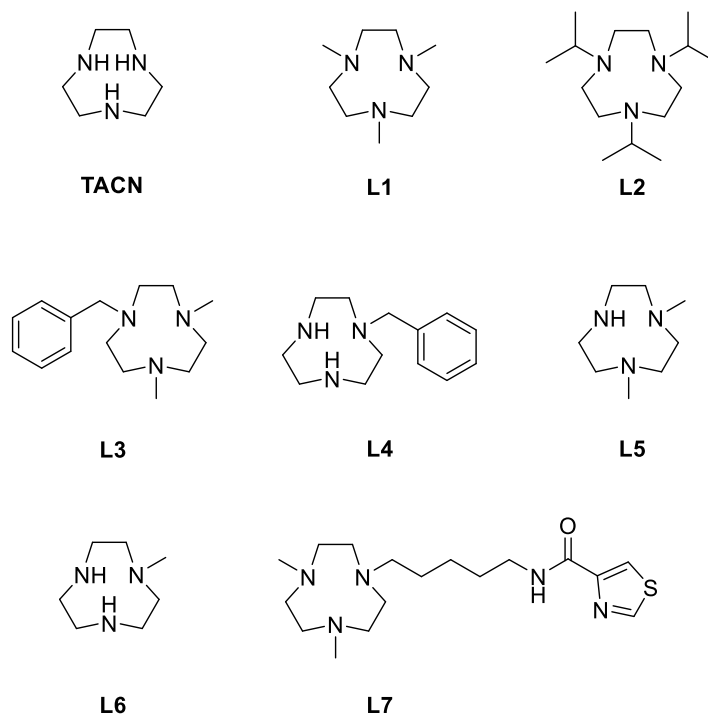
$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75,4 MHz):  $\delta$  25,39 ( $\text{CH}_2$ ), 27,73 ( $\text{CH}_2$ ), 32,19 ( $\text{CH}_2$ ), 33,37 ( $\text{CH}_2$ ), 37,65 ( $\text{CH}_2$ ), 123,23 ( $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.), 133,94 ( $\text{C}_6\text{H}_5$  arom.).

TLC:  $R_f = 0,55$  (detekce UV).

MS–ESI (+): 297,07 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

### 3.4 Pozorování hydrolýzy substrátu BNPP pomocí UV/VIS spektroskopie

Za účelem pozorování hydrolýzy modelového substrátu BNPP pomocí UV/VIS spektroskopie byly *in situ* připraveny Cu(II) komplexy komerčního ligandu TACN a syntetizovaných ligandů L1–L7 uvedených na Obr. 10.



Obr. 10: Ligandy studované v rámci diplomové práce.

### 3.4.1 Příprava zásobních roztoků

Byly připraveny zásobní roztoky substrátu BNPP, pufru HEPES s NaCl pro úpravu iontové síly a roztoky komplexů Cu(II) s ligandy uvedenými na *Obr. 10*. Zásobní roztoky komplexů Cu(II) s jednotlivými ligandy byly připraveny smícháním vodného roztoku  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  s 6% molárním nadbytkem ligandu. Molární koncentrace jednotlivých zásobních roztoků jsou uvedeny v *Tab. 6*.

*Tab. 6:* Molární koncentrace připravených zásobních roztoků.

Zásobní roztok	Molární koncentrace $c$ [mM]
BNPP	0,150
HEPES ( $I = 0,45\text{M NaCl}$ )	150
Cu(II) komplex	15

### 3.4.2 Příprava experimentu

Zásobní roztok komplexu Cu(II) příslušného ligandu byl smíchán se zásobním roztokem pufru HEPES ( $I = 0,45\text{M NaCl}$ ) v objemovém poměru 1:1. Výslednému roztoku bylo upraveno pH na hodnotu 7,4 přidávkem 1M roztoku NaOH.

Před započítím experimentu byla nejprve změřena reference (tzv. *blank*) o složení uvedeném v *Tab. 7*. Po změření reference byla do cely ve spektrometru umístěna kyveta se směsí pufru HEPES a Cu(II) komplexu příslušného ligandu. Směs byla ponechána temperovat na 37 °C po dobu 10 minut. Po dokončení temperování bylo ke vzorku přidán roztok BNPP. Výsledné složení vzorku je uvedeno v *Tab. 7*. Kyveta se vzorkem byla krátce promíchána a umístěna do temperované cely. Roztok byl temperován dále po dobu 2 minut, po jejichž uplynutí bylo spuštěno měření s parametry uvedenými v *Tab. 8*.

Tab. 7: Pipetovaný objem zásobního roztoku  $V$  a výsledné koncentrace  $c$  jednotlivých složek v kvetě.

Zásobní roztok	Reference		Vzorek	
	$V$ [ $\mu\text{l}$ ]	$c$ [mM]	$V$ [ $\mu\text{l}$ ]	$c$ [mM]
H <sub>2</sub> O	333	–	–	–
BNPP	–	–	333	0,050
HEPES ( $I = 0,45\text{M NaCl}$ )	333	50 150 (NaCl)	333	50 150 (NaCl)
Komplex Cu(II)	333	5	333	5

Tab. 8: Parametry experimentu na UV/VIS spektrometru.

Parametr	Hodnota
pH	7,4
$T$	37 °C
Rozsah měření	300 – 900 nm
$\Delta\lambda$	1 nm
Rychlost měření	10,0 nm/s
Čas měření	24 h (86 400 s)*
Interval mezi měřeními	10 min (600 s)

\* Platí pro Cu(II) komplexy ligandů L1 a L3–L7, experiment s Cu(II) komplexem TACN byl měřen 60 h. (216 000 s).

### 3.5 Pozorování hydrolyzy pomocí HPLC-UV/VIS a HPLC-MS

#### 3.5.1 Příprava zásobních roztoků a mobilní fáze

Byly připraveny zásobní roztoky Cu(II) komplexu ligandu L1, substrátu BNPP a pufru NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> o koncentracích uvedených v Tab. 9. Komplex Cu(II) ligandu L1 byl připraven *in situ* smícháním vodného roztoku CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O s 6% molárním nadbytkem ligandu L1. Dále byl připraven zásobní roztok mobilní fáze 10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>:MeOH v objemovém poměru 1:1. Hodnota pH byla upravena přidávkem kyseliny mravenčí na 7,4.

Tab. 9: Složení zásobních roztoků.

Složka	Molární koncentrace $c$ [mM]
Cu(II) komplex	24
BNPP	9
Pufr $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	30

### 3.5.2 Příprava experimentu

Do olejové lázně temperované na 37 °C byla umístěna 25ml baňka. Do baňky bylo přidáno 3,0 ml 24mM zásobního roztoku komplexu Cu(II) ligandu L1 a 3,0 ml 30mM zásobního roztoku pufru  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Směs byla temperována 10 minut. Následně bylo přidáno 3,0 ml 9mM zásobního roztoku BNPP a směs byla temperována dalších 5 minut. Molární koncentrace jednotlivých složek ve výsledné směsi jsou uvedeny v Tab. 10. Vzorok o objemu 1 ml byl odebrán v čase 0 h (tj. po přidání 3,0 ml 9mM zásobního roztoku BNPP a temperování po dobu 5 min.), 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7 h a 31 h.

HPLC experiment byl nastaven na dobu 5 minut s izokratickou mobilní fází 20mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3(\text{aq.})$ :MeOH (1:1) (specifikace kolony a průtok mobilní fáze viz 3.2.2). Po změření chromatogramu a hmotnostních spekter byl vzorek nanesen na přibližně 1 ml silného kationtového iontoměničce DOWEX50 v  $\text{Na}^+$  cyklu, ze kterého bylo eluováno destilovanou  $\text{H}_2\text{O}$  zhruba 3,5 ml eluátu do 4ml vialky, ze které bylo odebráno 1,0 ml vzorku pro opětovné měření HPLC-MS za shodných podmínek.

Tab. 10: Výsledné složení směsi a molární koncentrace jednotlivých složek.

Složka	Molární koncentrace $c$ [mM]
Cu(II) komplex	8
BNPP	3
Pufr $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	10

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Příprava 1,4,7-trimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L1)

Příprava ligandu L1 Eschweiler–Clarkovou reakcí v nadbytku kyseliny mravenčí a formaldehydu vždy vedla k plně methylovanému produktu (L1) během 1 dne. Postup uvedený v syntetické části vedl k čisté látce L1, která byla stálá, a během skladování při teplotě  $-18\text{ °C}$  nebyl v hmotnostních spektrech pozorován její rozklad.

Během přípravy je nutné ke směsi výchozí látky TACN a formaldehydu přidávat kyselinu mravenčí po částech a za stálého míchání, jelikož během jejího přidávání dochází k výraznému zahřátí reakční směsi.

Syntéza byla několikrát reprodukována s podobnými výtěžky.

### 4.2 Příprava 1,4,7-tris(isopropyl)-1,4,7-triazacyklononanu (L2)

Ligand L2 byl připraven alkylací TACN isopropylbromidem. Vzniklý produkt byl od dalších potenciálně vzniklých mono- a di-substituovaných vedlejších produktů vyčištěn jeho vysrážením v podobě monohydroperchlorátu. V této formě byl ligand L2 stabilní a skladovatelný bez pozorovaného rozkladu. Tato čistící operace nejspíše byla příčinou nižších výtěžků příprav ligandu L7, které se vždy pohybovaly kolem 50 %. Nicméně tento postup vedl vždy k velmi čistému produktu, který nebylo nutné dále čistit.

### 4.3 Příprava 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononanu (L4)

Během přípravy ligandu L4 bylo pozorováno, že důležitým krokem bylo promytí kvartérní amoniové soli (látky 2) na fritě dostatečným množstvím THF, aby došlo k vypláchnutí nadbytku alkylačního činidla. Nebyla-li látka 2 dostatečně promyta THF, ve finále byl kromě mono-benzylovaného produktu (ligand L4) připraven i produkt di-benzylovaný a v malé míře i tri-benzylovaný (identifikováno z hmotnostních spekter). Ligand L4 musel být poté čištěn chromatograficky.

Ligand L4 mohl být vyčištěn také krystalizací ve formě hydrochloridu. Tento způsob



čištění spočíval v přidání nadbytku 3M HCl k ligandu L4. Směs byla následně odpařena na RVO. K odparce ve formě hnědého prášku byl přidán EtOH. Směs byla zahřáta k varu. Během zahřívání se hnědý prášek rozpustil. Baňka s roztokem byla poté umístěna do lednice. Po ochlazení začal hydrochlorid ligandu L4 krystalizovat ze směsi. Krystaly byly odfiltrovány přes fritu S3 a vysušeny. V této formě mohl být produkt skladován, aniž by byl pozorován rozklad. Čistota byla kontrolována pomocí HPLC-MS.

#### **4.4 Příprava 1-benzyl-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L3)**

Postup přípravy ligandu L3 se od postupu uvedeném v bakalářské práci<sup>[36]</sup> lišil především způsobem zpracování reakční směsi a jejím čištěním. Optimalizace postupu spočívala v úpravě pH reakční směsi před extrakcí CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. V původním postupu byla reakční směs nejprve odpařena na RVO a až poté extrahována. Bylo vyzkoušeno, že tento krok lze vynechat. Výsledná směs po extrakci a odpaření na RVO obsahovala podle TLC kromě ligandu L3 ( $R_f = 0,50$ ) i nečistotu ( $R_f = 0,85$ ), která nebyla izolována ani dále analyzována. Nicméně tato nečistota nebyla výchozí látka L4 ( $R_f = 0,40$ ).

Příprava ligandu L3 postupem uvedeným v syntetické části vždy vedla ke chtěnému di-methylovanému produktu. V hmotnostním spektru nebyl pozorován mono-methylovaný produkt, ani výchozí látka L4.

#### **4.5 Příprava 1,4-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L5)**

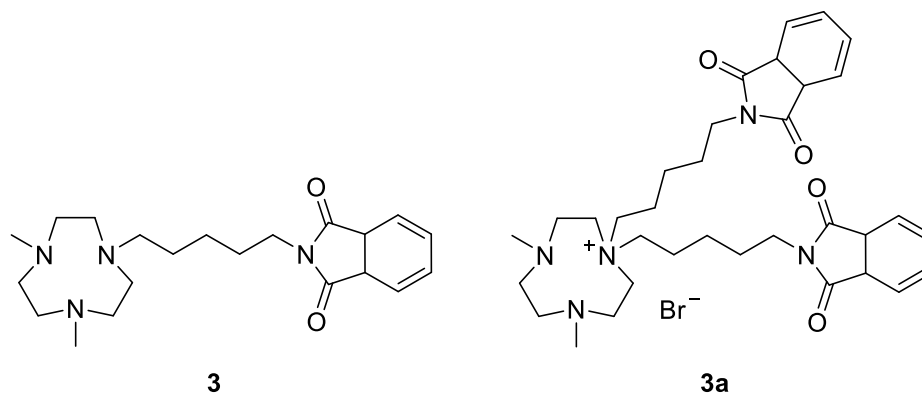
Optimalizovaný postup přípravy ligandu L5 vycházel opět z bakalářské práce.<sup>[36]</sup> Bylo opakovaně pozorováno, že se zvyšujícím se množstvím výchozí látky L3 se reakční doba významně prodlužovala. Reakce v menším měřítku (cca do 0,5 g látky L3) probíhala v rámci několika dnů, kdežto ve větším měřítku až týden. Průběh reakce byl kontrolován pomocí HPLC-UV/VIS a HPLC-MS.

Optimalizace postupu spočívala ve zpracování reakční směsi. Po odfiltrování katalyzátoru přes fritu S4 s filtračním papírem byl filtrát odpařen na RVO. Odparek byl opakovaně rozpouštěn v H<sub>2</sub>O a znovu odpařován na RVO pro snažší odpařování CH<sub>3</sub>COOH. Látka L5 byla po extrakci čištěna chromatograficky. Produkt lze skladovat při teplotě -18 °C bez pozorovaného rozkladu.

#### 4.6 Příprava 1-(5-ftalimidopentyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (3)

Po chromatografii, spojení a odpaření vybraných frakcí byl výsledný produkt změřen na HPLC-MS. V hmotnostním spektru byly nalezeny signály jak pro chtěný produkt (3), tak pro dvakrát alkylovaný produkt (možný izomer 3a) zobrazený na *Obr. 10*. Další z možných izomerů vedlejšího produktu může mít druhý alkylový substituent na methylem substituované aminové skupině. Jelikož je vedlejší produkt 3a kladně nabitý, v hmotnostním spektru v pozitivním módu je jeho signál významně nadhodnocen, a vzhledem k reakčním podmínkám je ve směsi nejspíše ve stopových množstvích. Malé zastoupení látky 3a podporuje i skutečnost, že na TLC byla přítomna pouze jedna skvrna odpovídající chtěnému produktu 3.

Ačkoli hydrolyza ftalimidové skupiny na primární amin probíhá za bazických podmínek, tak při chromatografii v mobilní fázi EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq.) = 1:1 nebyla v hmotnostních spektrech pozorována.

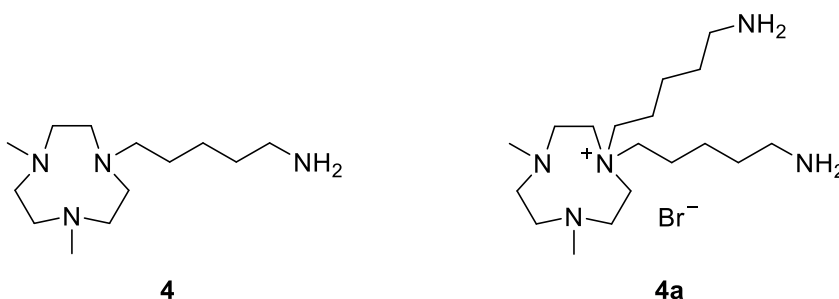


*Obr. 10:* Produkt (3) a možný izomer vedlejšího produktu (3a) reakce identifikované na základě HPLC-MS.

#### 4.7 Příprava 1-(5-aminopentyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (4)

Reakce vedoucí k přípravě látky 4 vždy proběhla do 3 dnů. Průběh reakce lze kontrolovat i vizuálně, kdy v jejím průběhu dochází k vylučování nerozpustného bílého

ftalhydrazidu z roztoku. Nižší výtěžek reakce (66 %) může být dán tím, že produkt mohl zůstat adsorbovaný na nerozpustném ftalhydrazidu. Výsledná izolovaná směs neobsahovala pouze chtěný produkt (4), ale také dvakrát substituovaný produkt (možný izomer 4a) zobrazený na *Obr. 11*. Přítomnost dvakrát substituovaného produktu byla očekávána vzhledem ke složení výchozí látky, se kterou byla reakce prováděna. Chromatograficky od sebe rozdělit látky 4 a 4a nebylo možné ani ve velmi polárních mobilních fázích jako je EtOH:NH<sub>3</sub>(konc.aq.) = 1:1, IPA V (7:3:3) nebo NH<sub>3</sub>(konc.aq.). Ve všech případech zůstávaly obě látky na TLC na startu ( $R_f = 0$ ). Kromě dvou zmíněných látek směs neobsahovala další nečistoty (vyhodnoceno z hmotnostního spektra).



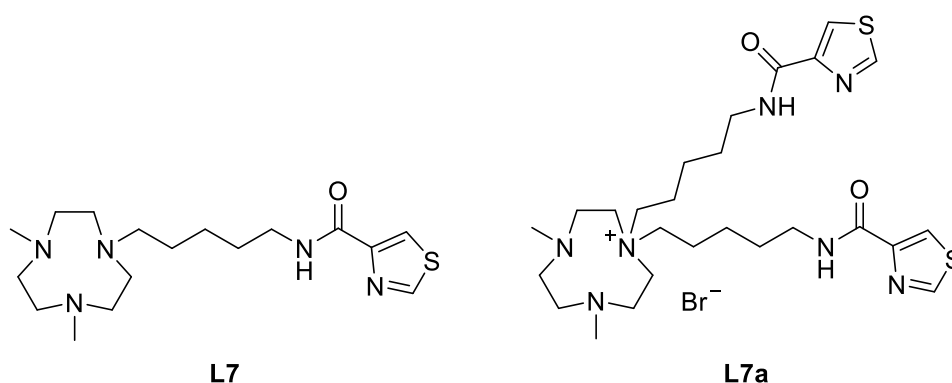
*Obr. 8:* Produkt (4) a možný izomer vedlejšího produktu (4a) reakce identifikované na základě HPLC-MS.

#### 4.8 Příprava 1-[5-(thiazol-4-karboxamido)pentyl]-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (L7)

Reakce vedoucí k přípravě amidu 4-thiazolkarboxylové kyseliny byla provedena odlišným postupem, než tomu bylo v bakalářské práci.<sup>[36]</sup> V bakalářské práci byl ponechán reagovat primární amin s chloridem 4-thiazolkarboxylové kyseliny. Tato reakce musela být prováděna za striktně bezvodých podmínek a probíhala s nízkým stupněm konverze. Z tohoto důvodu byla v této diplomové práci zvolena odlišná reakční cesta přes amidický coupling. Tato reakce primárního aminu (látky 4) s 4-thiazolkarboxylovou kyselinou probíhala s velmi vysokým stupněm konverze, jelikož na chromatogramu z HPLC a v hmotnostním spektru nebyl pozorován pík, resp. signál pro výchozí látku 4.

Po obou extrakcích popsaných v syntetické části bylo získané směsi změřeno HPLC-UV/VIS a HPLC-MS. V hmotnostním spektru v pozitivním módu nebyly

pozorovány signály odpovídající výchozí látce (4), TEA, HATU, ani HOBt (vedlejší produkt vznikající z HATU). Nejintenzivnější interpretované signály odpovídaly chtěnému produktu (L7) a vedlejšímu produktu (možný izomer L7a) zobrazeným na *Obr. 12*. Chromatograficky byl od nečistot oddělen produkt L7 společně s vedleším produktem L7a. Všechny frakce obsahující látku L7 a L7a byly spojeny a odpařeny na RVO. Vzniklo cca 40 mg směsi, která byla čištěna na semi-preparativním HPLC (specifikace viz 3.2.5). Byť měly obě látky podobné retenční časy  $t_R$  (v chromatogramu byly spojeny v široký pás s  $t_R$  od přibližně 13–19 min), podařilo se je od sebe oddělit a izolovat frakce s čistou látkou L7.



*Obr. 12:* Produkty reakce identifikované na základě HPLC-MS.

Nízký výtěžek přípravy ligandu L7 je dán především chromatografií na silikagelu, kdy na startu i přes zvýšení tlaku (docíleného zmáčknutím připojeného balónku) a změnu mobilní fázi na silně polární ( $\text{NH}_3(\text{konc. aq.})$ ) zůstal na koloně nasorbován světle hnědý pruh, ve kterém byl pravděpodobně stále přítomný produkt.

#### 4.9 Příprava 1-methyl-1,4,7-triazacyklononanu (L6)

Příprava ligandu L6 probíhala obdobně jako příprava ligandu L4, kdy byla alkylována látka 1 za vzniku kvartérní amoniové soli. Vysrážení kvartérní amoniové soli (látka 5) z roztoku THF bylo v tomto případě pomalejší než v případě kvartérní amoniové soli (látka 2) při přípravě ligandu L4, nicméně po 1 dni už k dalšímu vysrážení nedocházelo. I při této přípravě byla vzniklá kvartérní amoniová sůl (látka 5) promyta dostatečným množstvím THF, aby došlo k vypláchnutí nadbytku alkylačního činidla. V posledním kroku syntézy byl ligand L6 extrahován a následně izolován v dobré čistotě, která byla ověřena na HPLC-MS.

V hmotnostních spektrech nebyly nalezeny mono- nebo di-substituované vedlejší produkty. Ligand L7 byl skladován při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  několik dní bez pozorovaného rozkladu. Dlouhodobě byla látka skladována ve formě jejího hydrochloridu.

#### 4.10 Příprava *N*-(5-brompentyl)ftalimidu

Příprava *N*-(5-brompentyl)ftalimidu byla nejdříve prováděna za jiných podmínek než byly uvedené v syntetické části. Rozdílné podmínky spočívaly v použití DMF jako rozpouštědla a v přidání TBAI (tetrabutylammonium jodidu) do reakční směsi. Byť tyto podmínky vedly k přípravě produktu, byly vyzkoušeny i reakční podmínky uvedené v syntetické části. Bylo dokázáno, že reakce probíhá s dobrými výtěžky v acetonu a bez přidání TBAI. Výhodou acetonu coby rozpouštědla bylo jeho rychlé odpaření na RVO. Po chromatografii a odpaření jímaných frakcí obsahující produkt byl odparek přesunut do lednice, kde začal po ochlazení krystalizovat v bílou krystalickou látku.

#### 4.11 Příprava komplexů ligandů TACN a L1–L7

Za účelem pozorování hydrolyzy substrátu BNPP byly *in situ* připraveny Cu(II) komplexy ligandů TACN a L1–L7. Tyto komplexy byly připraveny smícháním vodného roztoku přesně naváženého množství  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  s 6% molárním nadbytkem příslušného ligandu. U všech příprav komplexů bylo smíchání těchto dvou složek doprovázeno změnou barvy ze světle modré (dáno vodným roztokem  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) na tmavě modrou (v případě komplexu ligandu L7 nebyla barevná změna natolik intenzivní). Vzniklé roztoky komplexů byly charakterizovány (viz 4.11.1) na základě absorpčních a hmotnostních spekter. Ačkoli byly připravené a izolované Cu(II) komplexy ligandů TACN a L1–L5 ve formě prášků (resp. ve formě mikrokrystalické látky v případě komplexu ligandu L1), pro účely pozorování hydrolytické aktivity byla zvolena příprava výše popsaná. Příprava komplexů *in situ* má totiž několik výhod. Jelikož má ligand TACN a jeho deriváty vysokou afinitu k Cu(II) iontům, lze předpokládat, že veškeré Cu(II) ionty v roztoku budou po přidavku 6% molárním nadbytku ligandu zakomplexovány. Nezakomplexovaný nadbytek ligandu pro pozorování hydrolyzy substrátu BNPP není překážkou, jelikož samotný ligand není hydrolyticky aktivní. Další výhodou je rychlost přípravy těchto komplexů a její snadná

reprodukovatelnost. Komplexy připravené a izolované v pevné formě je zapotřebí před experimentem charakterizovat například pomocí elementární analýzy a/nebo rentgenostrukturní analýzy s cílem získat přesné složení (resp. molární hmotnost komplexů pro přípravu zásobních roztoků). Pro účely této diplomové práce je příprava komplexů *in situ* výhodná a postačuje k porovnání jejich hydrolytických aktivit.

#### 4.11.1 Charakterizace připravených komplexů

Připravené komplexy byly charakterizovány pomocí UV/VIS a hmotnostní spektroskopie. Absorpční spektra byla měřena vzorkům Cu(II) komplexů TACN a L1–L7 o složení uvedeném v *Tab. 11* při pH 7,4. Absorpční spektra jsou v příloze diplomové práce. Vlnové délky absorpčních maxim ( $\lambda_{\max.}$ ) a vypočítané molární absorpční koeficienty ( $\epsilon_{\lambda}$ ) jsou uvedeny v *Tab. 12*.

Pro charakterizaci připravených Cu(II) komplexů připravených ligandů z hmotnostních spekter byly připraveny jejich 5mM vodné roztoky, jejichž pH bylo upraveno na 7,4. Vzorky byly změřeny na HPLC-UV/VIS a HPLC-MS (specifikace viz 3.2.2). Nalezené signály z naměřených hmotnostních spekter jsou uvedeny v *Tab. 13*.

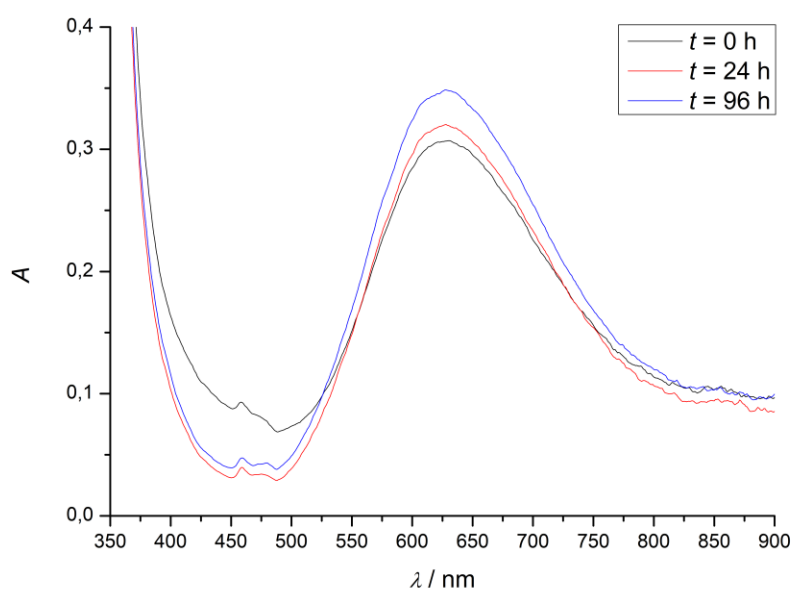
Stálost vodných roztoků připravených komplexů při pH 7,4 byla ověřena porovnáním absorpčních spekter naměřených bezprostředně po jejich přípravě a po 24 h, během kterých byly temperovány na 37 °C. Složení měřených vzorků o objemu 999  $\mu$ l je uvedeno v *Tab. 11*. U většiny studovaných komplexů během 24 h nedošlo k významné změně v absorpčních spektrech. Nicméně v případě Cu(II) komplexu ligandu L7 byla pozorována změna, která je patrná z absorpčních spekter (*Obr. 13*). Tento vzorek byl dále temperován až po dobu 96 h (4 dny). Po 96 h bylo vzorku změřeno hmotnostní spektrum, ve kterém byly identifikovány signály náležící 4-thiazolkarboxylové kyselině ( $[M+H]^+$ : 130,04) a látce 4 ( $[M+H]^+$ : 243,29). Tyto signály nebyly přítomny v hmotnostním spektru samotného ligandu L7, ze kterého byl Cu(II) komplex připravován. Na základě těchto údajů lze tedy vyvodit závěr, že amidická vazba ligandu L7 podléhá hydrolytickému štěpení.

Tab. 11: Složení vzorku pro měření absorpčních spekter připravených Cu(II) komplexů.

Složka	$c$ [mM]
Cu(II) komplex	5
HEPES (0,45M NaCl)	50
H <sub>2</sub> O	150 (NaCl)
	–

Tab. 12: Vlnová délka absorpčního maxima ( $\lambda_{\max}$ ) a vypočítané molární absorpční koeficienty ( $\epsilon_{\lambda}$ ) pro 5mM vodné roztoky Cu(II) komplexů ligandů TACN, L1 a L3–L7.

Cu(II) komplex ligandu	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon_{\lambda}$ [dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ]
TACN	637	67,3
L1	640	67,6
L3	634	56,3
L4	629	61,5
L5	627	42,1
L6	636	60,3
L7	631	61,4



Obr. 13: Absorpční spektra Cu(II) komplexu ligandu L7 naměřená v čase 0 h, 24 h a 96 h.

Tab. 13: Nalezené signály z naměřených hmotnostních spekter Cu(II) komplexů TACN a L1–L7.

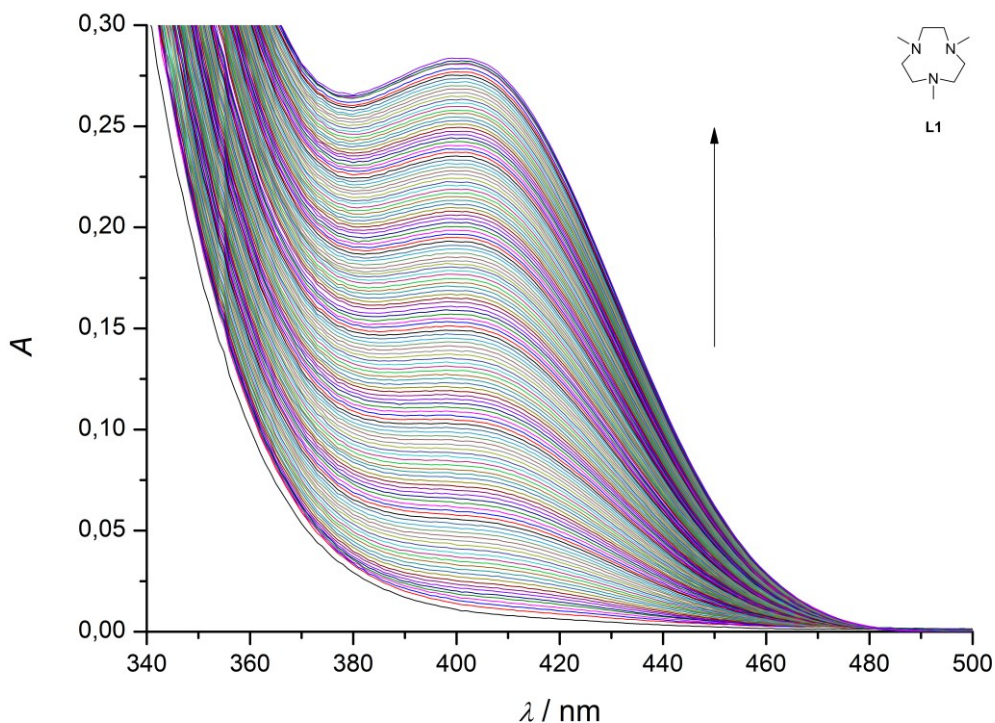
Cu(II) komplex ligandu	<i>m/z</i>
TACN	[CuTACN+TFA] <sup>+</sup> : 305,12 [2CuTACN+2TFA+Cl] <sup>+</sup> : 645,27 [2CuTACN+3TFA] <sup>+</sup> : 725,25
L1	[CuL1+TFA] <sup>+</sup> : 347,19 [2CuL1+2TFA+Cl] <sup>+</sup> : 729,42 [2CuL1+3TFA] <sup>+</sup> : 807,41
L2	[CuL2+TFA] <sup>+</sup> : 431,38 [2CuL2+3TFA] <sup>+</sup> : 975,68
L3	[CuL3+Cl] <sup>+</sup> : 345,22 [2CuL3+3Cl] <sup>+</sup> : 725,50 [2CuL3+TFA+2Cl] <sup>+</sup> : 803,44
L4	[CuL4+TFA] <sup>+</sup> : 395,27 [2CuL4+2TFA+Cl] <sup>+</sup> : 825,41 [2CuL4+3TFA] <sup>+</sup> : 903,47
L5	[CuL5+TFA] <sup>+</sup> : 333,14 [2CuL5+2TFA+Cl] <sup>+</sup> : 701,31 [2CuL5+3TFA] <sup>+</sup> : 779,35
L6	[CuL6+Cl] <sup>+</sup> : 241,18 [CuL6+TFA] <sup>+</sup> : 319,13 [2CuL6+3Cl] <sup>+</sup> : 519,19 [2CuL6+TFA+2Cl] <sup>+</sup> : 595,26
L7	[CuL7+TFA] <sup>+</sup> : 529,30 [2CuL7+3TFA] <sup>+</sup> : 1171,59

#### 4.12 Vyhodnocení pozorování hydrolýzy BNPP pomocí UV/VIS spektroskopie

Z naměřených experimentální dat byly sestrojeny grafy závislosti absorpance *A* na vlnových délkách  $\lambda$  v rozsahu 340–500 nm. Grafy jsou v příloze diplomové práce. Níže je

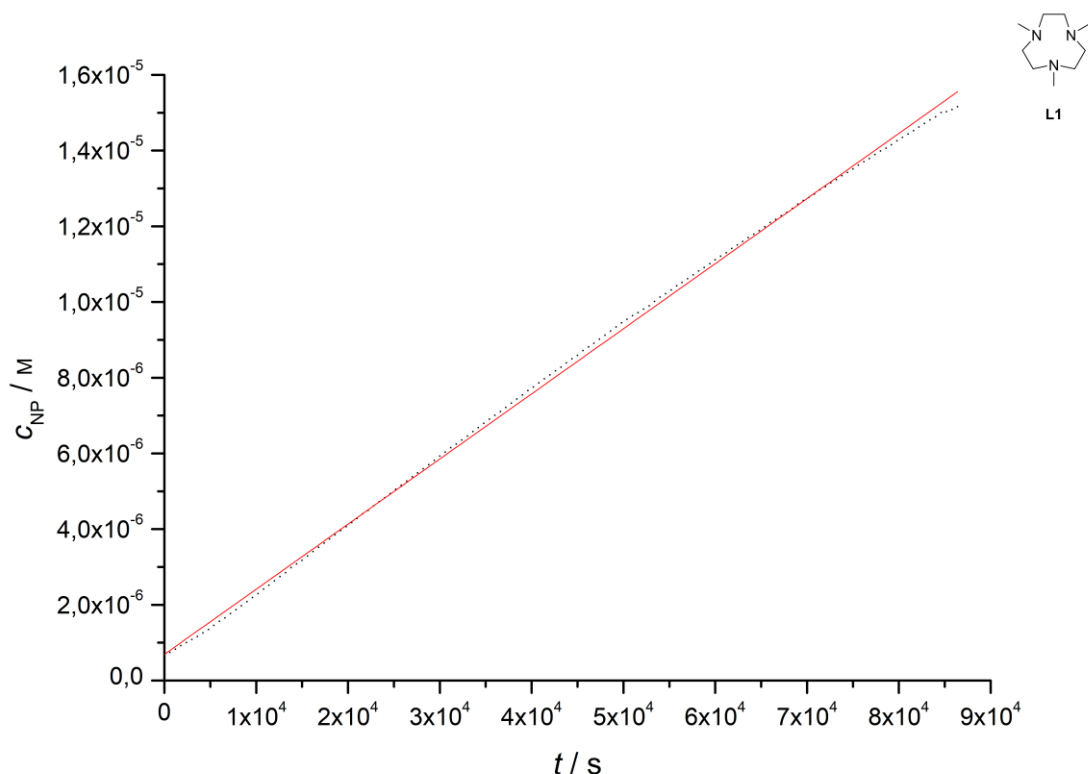


ukázán graf závislosti absorpance  $A$  na vlnové délce  $\lambda$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L1 (Obr. 14).



Obr. 14: Závislost absorpance  $A$  na vlnové délce  $\lambda$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L1.

Dále byly pro každý experiment vybrány hodnoty absorpance  $A$  při vlnové délce 400 nm. Z Lambertova-Beerova zákona byla vypočítána molární koncentrace 4-nitrofenolátových iontů  $c_{\text{NP}}$ . Byly sestrojeny grafy závislosti molárních koncentrací 4-nitrofenolátových iontů ( $c_{\text{NP}}$ ) na čase  $t$ . Grafy byly proloženy regresní přímkou ( $y = a + bx$ ), jejíž směrnice odpovídá rychlostní konstantě vzniku 4-nitrofenolátových iontů  $k_{\text{NP}}$  v jednotkách  $\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ . Grafy jsou v příloze diplomové práce. Příkladem je graf závislosti molární koncentrace 4-nitrofenolátových iontů ( $c_{\text{NP}}$ ) na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L1 (Obr. 15). Výsledky pozorování hydrolyzy substrátu BNPP Cu(II) komplexu ligandů TACN, L1 a L3–L6 jsou shrnuty v Tab. 14.



Obr. 15: Závislost molární koncentrace 4-nitrofenolátových iontů ( $c_{\text{NP}}$ ) na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L1.

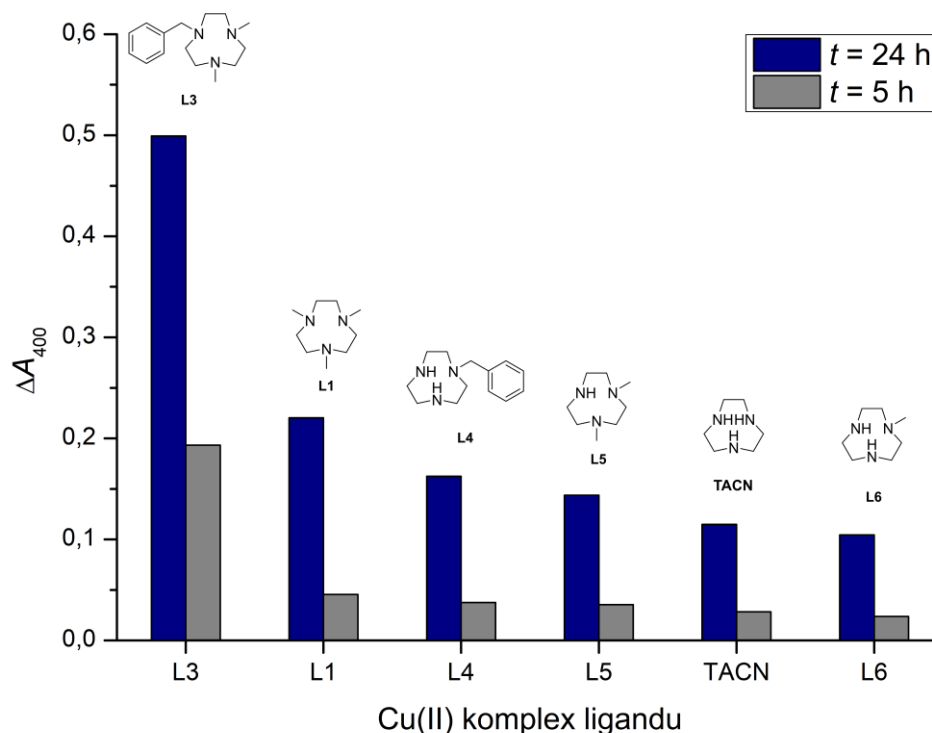
Grafy závislostí molárních koncentrací 4-nitrofenolátových iontů ( $c_{\text{NP}}$ ) na čase  $t$  měly pro většinu Cu(II) komplexů lineární průběh. Výjimkou je Cu(II) komplex ligandu L3, který z měřených komplexů hydrolyzoval substrát BNPP nejrychleji. Závislost pro tento komplex měla saturační průběh. Při vyhodnocování naměřených dat byla proložena lineární část křivky (viz Obr. 34). Hydrolyza substrátu BNPP tímto komplexem byla měřena 86 400 s (24 h). Lineární průběh byl pozorován do přibližně 24 600 s (přibližně 6,8 h). Experiment nebylo možné provést pro komplex Cu(II) ligandu L2 z důvodu jeho nerozpustnosti v  $\text{H}_2\text{O}$ . Tento komplex byl připraven obdobně jako komplexy ostatních ligandů, a sice *in situ* smícháním vodného roztoku  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a ligandu v 6% molárním nadbytku. Okamžitě po jejich smíchání se z roztoku vysrážel komplex ve formě světle modrého prášku. Směs byla heterogenní i po přidavku roztoku BNPP. Z tohoto důvodu bylo vyzkoušeno připravit komplex v směsi rozpouštědel MeCN:H<sub>2</sub>O (1:3) a také v MeOH:H<sub>2</sub>O (1:3). Obě přípravy skončily podobným výsledkem, a sice zakalením roztoku komplexu, přičemž v roztoku MeOH:H<sub>2</sub>O (1:3) byl zákal větší.

Vyhodnotit hydrolytickou aktivitu Cu(II) komplexu ligandu L7 nebylo za nastavených experimentálních podmínek možné. Jedním z důvodů je složení referenčního roztoku. Reference (složení viz *Tab. 7*) obsahovala mimo jiné samotný Cu(II) komplex. V případě komplexu ligandu L7 však docházelo k hydrolyze amidové vazby (viz 4.11.1), a tudíž ke změně složení reference v čase. Dalším důvodem byla i skutečnost, že hydrolyza amidové vazby se nejvýrazněji projevovala v absorpčním spektru (viz *Obr. 13*) v rozsahu vlnových délek přibližně 350–550 nm, tedy i při vlnové délce 400 nm. Při této vlnové délce byl při experimentu pozorován produkt hydrolytického štěpení BNPP, a sice NP. Výsledek průběhu experimentu pro Cu(II) komplex ligandu L7 je zobrazen na *Obr. 32* a ukazuje výše popsaná pozorování. Z průběhu závislosti absorbance při 400 nm na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L7 (*Obr. 38*) lze vypočítat, že hydrolyza amidové skupiny, která se projevovala poklesem hodnoty absorbance, převládala přibližně do 25 000 s. Následně docházelo k nárůstu hodnoty absorbance při 400 nm, která mohla být způsobena velmi pomalou hydrolyzou substrátu BNPP.

*Tab. 14:* Rychlostní konstanty  $k_{NP}$  hydrolyzy BNPP komplexy Cu(II) připravených (nebo zakoupených) ligandů, standardní chyba experimentu a hodnota adjustovaného koeficientu determinace  $R^2$  lineární regrese.

Cu(II) komplex ligandu	$k_{NP}$ [ $\cdot 10^{-11} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	Standardní chyba	Hodnota $R^2$
TACN	6,67(6)	$6 \cdot 10^{-14}$	0,999
L1	17,2(0)	$4 \cdot 10^{-13}$	0,999
L3	56,1	$5 \cdot 10^{-12}$	0,996
L4	9,93	$2 \cdot 10^{-13}$	0,999
L5	8,29	$3 \cdot 10^{-13}$	0,998
L6	6,38(3)	$6 \cdot 10^{-14}$	0,999

Za účelem porovnání vlivu substituentů na rychlost hydrolyzy substrátu BNPP byl rovněž sestaven graf zobrazující změnu absorbancí při 400 nm ( $A_{400}$ ) vlivem hydrolytické aktivity Cu(II) komplexů s ligandy TACN, L1 a L3–L6 měřená po 5 a 24 h (*Obr. 16*).



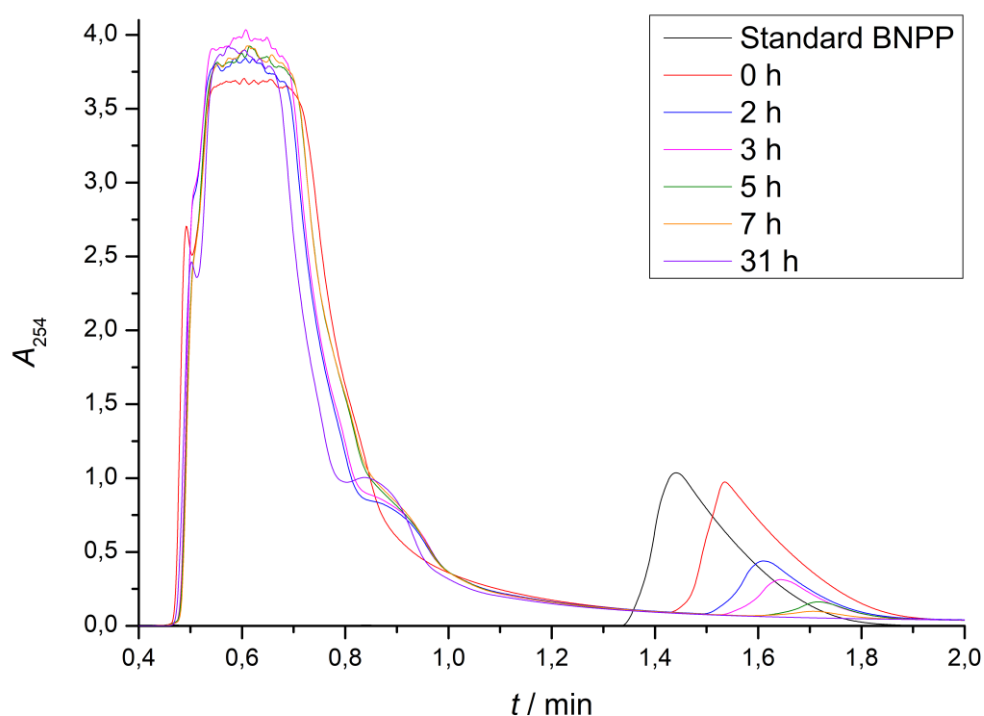
Obr. 16: Pozorované změny absorbancí při 400 nm ( $A_{400}$ ) vlivem hydrolytické aktivity Cu(II) komplexů s ligandy TACN, L1 a L3–L6. Měřeno po 5 h a 24 h.

Z naměřených experimentálních dat lze vyvodit několik závěrů:

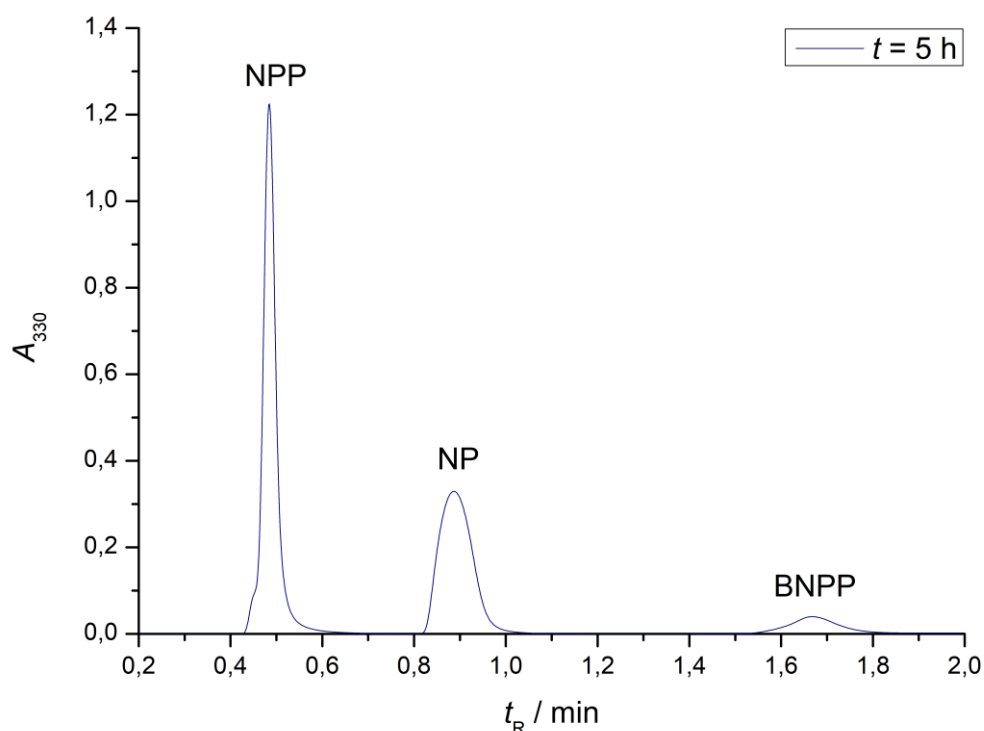
- 1) Cu(II) komplexy třikrát substituovaných derivátů TACN štěpí modelový substrát BNPP nejrychleji ze všech studovaných komplexů.
- 2) U Cu(II) komplexů třikrát substituovaných derivátů TACN (L1 a L3) bylo prokázáno, že změna právě jednoho substituentu za objemnější skupinu vede k výraznému zrychlení hydrolyzy BNPP.
- 3) Substituce aminové skupiny TACN jedním objemným substituentem (ligand L4) vede u Cu(II) komplexu k rychlejšímu hydrolytickému štěpení BNPP, než je tomu v případě Cu(II) komplexu dvakrát substituovaného TACN méně objemnými substituenty (L5).
- 4) Cu(II) komplex ligandu s jedním málo objemným substituentem (L6) štěpí substrát BNPP obdobnou rychlostí jako nesubstituovaný Cu(II) komplex TACN.

### 4.13 Vyhodnocení pozorování hydrolyzy BNPP pomocí HPLC-UV/VIS a HPLC-MS

Experiment byl proveden pouze pro komplex Cu(II) ligandu L1. Nejprve byly z reakční směsi odebrány vzorky obsahující komplex Cu(II), roztok pufru  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s NaCl a roztok BNPP. Z *Obr. 17* je patrný úbytek intenzit absorpčního pásu výchozího substrátu BNPP, který vytékal z chromatografické kolony s retenčním časem  $t_R$  v intervalu přibližně 1,3–1,9 min. Viditelná je i změna v absorbanci v intervalu retenčních časů přibližně 0,8–1,0 min, která by pravděpodobně měla odpovídat vzrůstající koncentraci produktů hydrolyzy v měřeném vzorku. Tento pík je nicméně překryt absorpčním pásem komplexu Cu(II). Z tohoto důvodu byl každý vzorek po změření nanesen na silný kationtový iontoměnič DOWEX50 v  $\text{Na}^+$  cyklu, na kterém byl komplex Cu(II) imobilizován na koloně. Experiment byl následně opakován se vzorky eluentů najímaných z kolon. Příklad je zobrazen na *Obr. 18*, kde jsou označeny identifikované píky.



*Obr. 17:* HPLC záznam při vlnové délce  $\lambda = 254 \text{ nm}$  pro pozorování hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L1.



BNPP – bis(4-nitrofenyl)fosfát, NP – 4-nitrofenolát, NPP – (4-nitrofenyl)fosfát

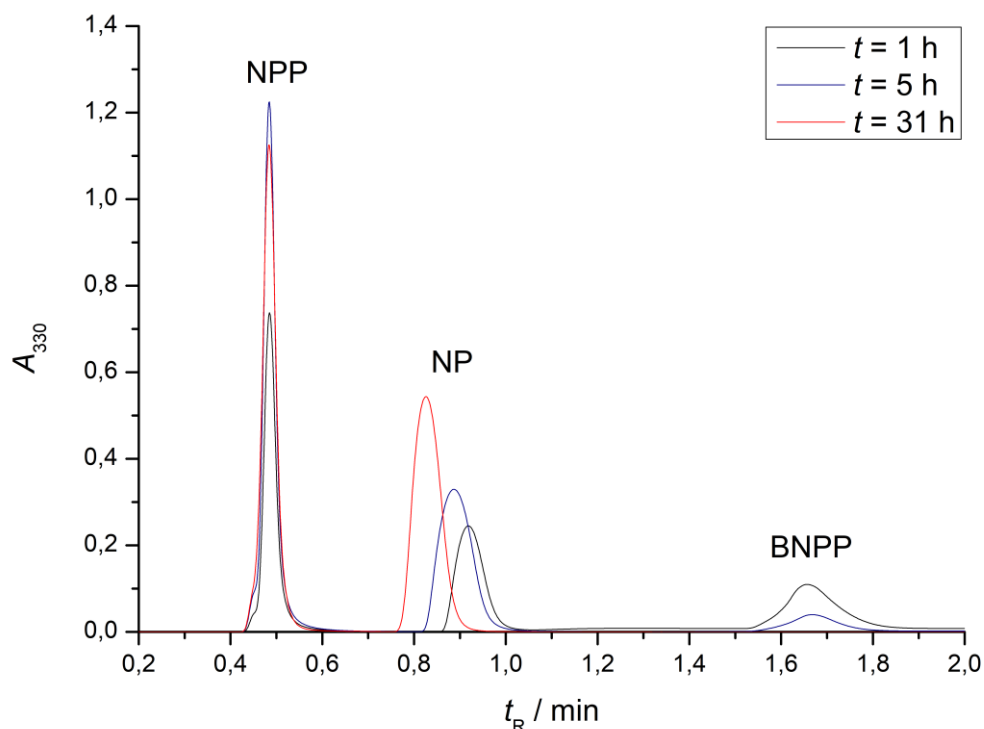
*Obr. 18:* HPLC záznam při vlnové délce  $\lambda = 330$  nm experimentu změřenému po 5 h s identifikovanými píky.

Jednotlivé píky z *Obr. 18* byly identifikovány na základě vlnových délek, při kterých nejsilněji absorbovaly ( $\lambda_{\max}$ ), a na základě hmotnostních spekter v negativním módu. Naměřená data pro experiment naměřený po 5 h jsou shrnuta v *Tab. 15*.

*Tab. 15:* Experimentální hodnoty retenčních časů  $t_R$ , vlnových délek maximálních absorpcí  $\lambda_{\max}$  a nejintenzivnější nalezené signály v negativním módu hmotnostních spekter ( $[M-H]^-$ ) naměřené po 5 h.

Složka	$t_R$ [min]	$\lambda_{\max}$ [nm]	$m/z$ ( $[M-H]^-$ )
BNPP	1,69	288,0	338,92
NP	0,869	402,9	137,91
NPP	0,483	311,9	217,91

Pro porovnání výsledků jednotlivých změřených vzorků byl vytvořen *Obr. 19*, na kterém jsou pro přehlednost zobrazeny pouze experimenty prováděné v čase 1 h, 5 h a 31 h. Z *Obr. 19* lze pozorovat, že po 31 h již vzorek neobsahoval výchozí substrát BNPP. Mírně odlišné retenční časy  $t_R$  píků náležících produktu hydrolyzy NP jsou vysvětlovány změnou formálního pH vzorku při měření experimentu.

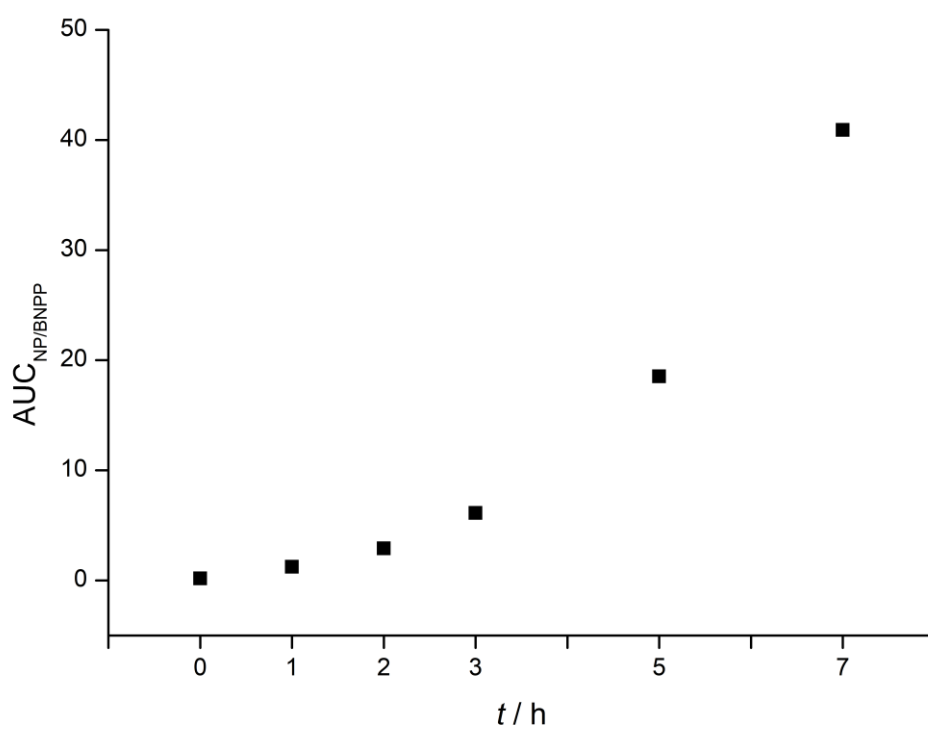


*Obr. 19:* Porovnání HPLC záznamů při vlnové délce  $\lambda = 330$  nm experimentů provedených v čase 1 h, 5 h a 31 h.

Pro vyhodnocení experimentu byly v chromatogramech vzorků měřených v časech 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7 h a 31 h softwarově integrovány plochy píků (AUC) substrátu BNPP a produktů hydrolyzy NP a NPP. Výsledky jsou uvedeny v *Tab. 16*. Následně byl z *Tab. 16* vypočítán poměr AUC (v %) produktu hydrolyzy NP vůči výchozímu substrátu BNPP. Byla sestavena závislost poměru AUC produktu hydrolyzy NP vůči výchozímu substrátu BNPP ( $AUC_{NP/BNPP}$ ) na čase měření experimentu  $t$  (*Obr. 20*). Pro přehlednost byl z *Obr. 20* vynechán bod odpovídající poměru  $AUC_{NP/BNPP}$  v čase 31 h. Chromatogramy vzorků měřených v čase 7 h a 31 h již neobsahovaly píky odpovídající výchozímu substrátu BNPP.

Tab. 16: Softwarově vypočítané plochy píků (AUC) jednotlivých složek vzorků z chromatogramů naměřených v čase 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7h a 31 h.

Složka:	Čas měření $t$ :						
	0 h	1 h	2 h	3 h	5 h	7 h	31 h
	AUC [%]						
BNPP	69,4	25,0	12,4	6,2	2,1	–	–
NP	12,3	31,0	36,0	38,0	38,9	40,9	48,1
NPP	18,3	44,0	51,6	55,8	59,0	59,1	51,9



Obr. 20: Závislost poměru AUC produktu hydrolyzy NP vůči výchozímu substrátu BNPP ( $AUC_{NP/BNPP}$ ) na čase měření experimentu  $t$ .



## 5. Závěr

V rámci diplomové práce byly úspěšně syntetizovány ligandy L1–L7 a společně s ligandem TACN také jejich Cu(II) komplexy, které byly připraveny *in situ*. Vodné roztoky připravených komplexů byly charakterizovány na základě absorpčních a hmotnostních spekter. Cu(II) komplexy byly připraveny s cílem vyhodnotit jejich nukleázovou aktivitu na základě sledování hydrolytického štěpení modelového substrátu BNPP pomocí metod UV/VIS spektroskopie a HPLC-UV/VIS a HPLC-MS. Vyhodnocení hydrolytické aktivity připravených komplexů pomocí UV/VIS spektroskopie bylo provedeno v jednotných a dříve nepublikovaných podmínkách blízkých fyziologickým (hodnotou pH, teplotou a základním elektrolytem pro úpravu iontové síly). Dále byla zavedena zcela nová metoda pozorování hydrolytické aktivity připravených komplexů pomocí HPLC-UV/VIS v kombinaci s HPLC-MS, která nabízí snadnou identifikaci produktů hydrolyzy substrátu BNPP jak z vlnových délek absorpčních maxim, tak z hmotnostních spekter.

U většiny z připravených komplexů byla pozorována nukleázová aktivita. Výjimkou jsou Cu(II) komplexy ligandů L2 a L7, u kterých experimenty pomocí výše uvedených metod nebylo možné vyhodnotit. Nicméně Cu(II) komplex ligandu L7 byl navržen s cílem jeho budoucího zabudování do polymerních nosičů, kde by následně mohla být jeho potenciální nukleázová aktivita vyhodnocena a potažmo i potvrzena pomocí jiných analytických metod.

Byly optimalizovány přípravy vedoucí k ligandům L3–L5, které byly dříve připravené v rámci bakalářské práce<sup>[36]</sup>. Optimalizace spočívala především v metodách jejich čištění, díky kterým bylo docíleno jejich velmi dobré čistoty.

## 6. Seznam použitých zkratek

BNPP	– Bis(4-nitrofenyl)fosfát
DMF	– Dimethylformamid
DNA	– Deoxyribonukleová kyselina
EtOAc	– Ethyl-acetát
EtOH	– Ethanol
ESI	– Ionizace elektrosprejem
HATU	– Hexafluorofosfát azabenzotriazol tetramethyl uronium
HEPES	– 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethan-1-sulfonová kyselina
HOBt	– Hydroxybenzotriazol
HPLC	– Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPAV	– Isopropanol, amoniak, voda
MeCN	– Acetonitril
MeOH	– Methanol
MOPS	– 3-( <i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina
MS	– Hmotnostní spektroskopie
NMR	– Nukleární magnetická rezonance
NP	– 4-Nitrofenolát
NPP	– 4-Nitrofenylfosfát
PEDOT	– Poly(3,4-ethylendioxythiofen)
Phen	– 1,10-Fenanthrolin
RVO	– Rotační vakuová odparka
TACN	– 1,4,7-Triazacyklononan
Tach	– 1,3,5-Triaminocyklohexan
TFA	– Kyselina trifluoroctová
THF	– Tetrahydrofuran
TLC	– Chromatografie na tenké vrstvě
TMS	– Tetramethylsilan
Trpn	– Tris(3-aminopropyl)amin
Trpy	– Terpyridin (2,6-Bis(2-pyridyl)pyridin)

## 7. Seznam použité literatury

- [1] Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson. Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, 51:72–80.
- [2] Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats. Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies: Workshop Summary. Washington (DC): *National Academies Press (US)*; **2010**.
- [3] Spellberg, B. The future of antibiotics. *Crit Care.* **2014**, 18(3):228.
- [4] Luepke, K. H., Suda, K. J., Boucher, H., Russo, R. L., Bonney, M. W., Hunt, T. D., & Mohr, J. F. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. *Pharmacotherapy.* **2016**, 37(1):71–84.
- [5] Turner, R. J. Metal-based antimicrobial strategies. *Microb. Biotechnol.* **2017**, 10(5):1062-1065.
- [6] Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., Alarcon, E. I. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon.* **2018**, 4(12):e01067.
- [7] Høiby, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS.* **2017**, 125:272–275.
- [8] Bjarnsholt, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl.* **2013**, (136):1-51.
- [9] Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2010**, 35(4):322-32.
- [10] Singh, S., Singh, SK., Chowdhury, I., Singh, R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol. J.* **2017**, 11:53-62.

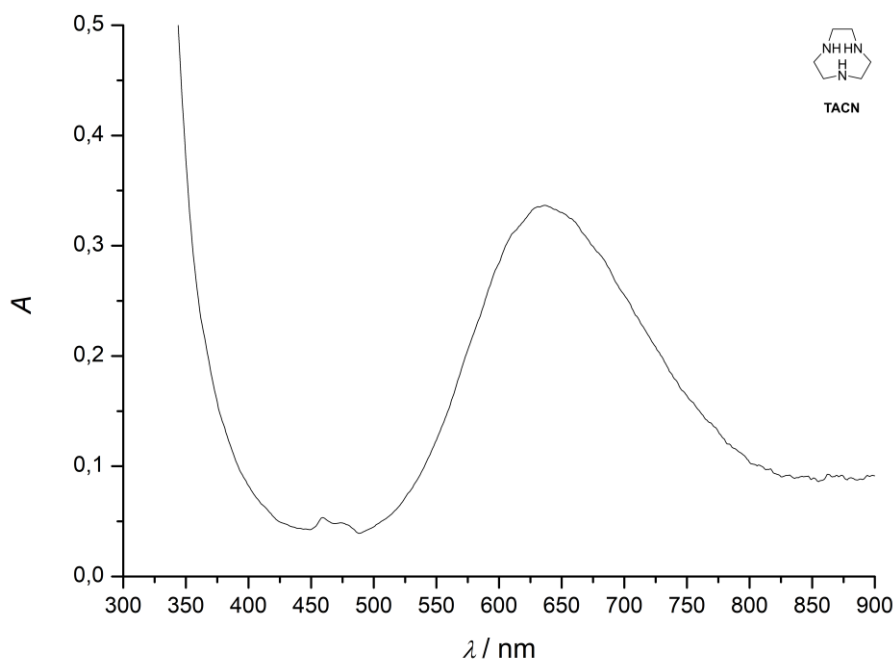
- [11] Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., El Jaziri, M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed. Res. Int.* **2015**, 1–17.
- [12] Römling, U., Balsalobre, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J. Intern. Med.* **2012**, 272:541–561.
- [13] Mermel, L. A., Farr, B. M., Sherertz, R. J., Raad, I. I., O’Grady, N., Harris, J. S., Craven, D. E. Guidelines for the management of intramascular catheter-related infections. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, 32:1249-1272.
- [14] Chen, M., Yu, Q., Sun, H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14(9):18488-18501.
- [15] Baldanzi, S., Vargas, I. T., Armijo, F., Fernández, M., Navarrete, S. A. Experimental Assessment of a Conducting Polymer (PEDOT) and Microbial Biofilms as Deterrents and Facilitators of Macro-Biofouling: Larval Settlement of the Barnacle *Notobalanus flosculus* (Darwin, 1854) from Central Chile. *J. Mar. Sci. Eng.* **2021**, 9(1):82.
- [16] Fenoy, G. E., Azzaroni, O., Knoll, W., & Marmisollé, W. A. Functionalization Strategies of PEDOT and PEDOT:PSS Films for Organic Bioelectronics Applications. *Chemosensors.* **2021**, 9(8):212.
- [17] Frei, A. Metal Complexes, an Untapped Source of Antibiotic Potential?. *Antibiotics (Basel).* **2020**, 9(2):90.
- [18] Gasser, G., & Metzler-Nolte, N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2012**, 16(1-2):84–91.
- [19] Raman, N., Sobha, S., & Mitu, L. Design, synthesis, DNA binding ability, chemical nuclease activity and antimicrobial evaluation of Cu(II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) metal complexes containing tridentate Schiff base. *J. Saudi Chem. Soc.*, **2013**, 17(2):151–159.
- [20] K.R., Sangeetha Gowda, et al. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *Biomed. Biotechnol.* **2014**, 2(1):1-9.

- [21] Wang, M., Zhang, H., Zhang, W., Zhao, Y., Yasmeeen, A., Zhou, L., Yu, X., Tang, Z. In vitroselection of DNA-cleaving deoxyribozyme with site-specific thymidine excision activity. *Nucleic Acids Res.*, **2014**, 42(14):9262–9269.
- [22] Silavi, R., Divsalar, A., & Saboury, A. A. A short review on the structure–function relationship of artificial catecholase/tyrosinase and nuclease activities of Cu-complexes. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2012**, 30(6):752–772.
- [23] Nishino, T., Morikawa, K. Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors. *Oncogene*, **2002**, 21:9022–9032.
- [24] Wende, C., Lüdtkke, C., & Kulak, N. Copper Complexes of N-Donor Ligands as Artificial Nucleases. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2014**, 16:2597–2612.
- [25] Das, R., Mukherjee, D. DNA Cleavage by Transition Metal Complexes and it's Applications – A Review. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **2019**, 9(2):1089-1106
- [26] Morris, D. L. DNA-bound metal ions: recent developments. *Biomol. Concepts*, **2014**, 5(5).
- [27] McGivern, T. J. P., Afsharpour, S., & Marmion, C. J. Copper complexes as artificial DNA metallonucleases: From Sigman's reagent to next generation anti-cancer agent? *Inorg. Chim. Acta*, **2018**, 472:12–39.
- [28] Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J.-F., & Margaritis, I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **2016**, 35:107–115.
- [29] Hegg, E. L., & Burstyn, J. N. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 173(1):133–165.
- [30] Joshi, T., Graham, B., & Spiccia, L. Macrocyclic Metal Complexes for Metalloenzyme Mimicry and Sensor Development. *Acc. Chem. Res.*, **2015**, 48(8):2366–2379.
- [31] Fry, F. H., Fischmann, A. J., Belousoff, M. J., Spiccia, L., & Brügger, J. Kinetics and Mechanism of Hydrolysis of a Model Phosphate Diester by  $[\text{Cu}(\text{Me}_3\text{tacn})(\text{OH}_2)_2]^{2+}$  ( $\text{Me}_3\text{tacn} = 1,4,7\text{-Trimethyl-1,4,7-triazacyclononane}$ ). *Inorg. Chem.*, **2005**, 44(4):941–950.

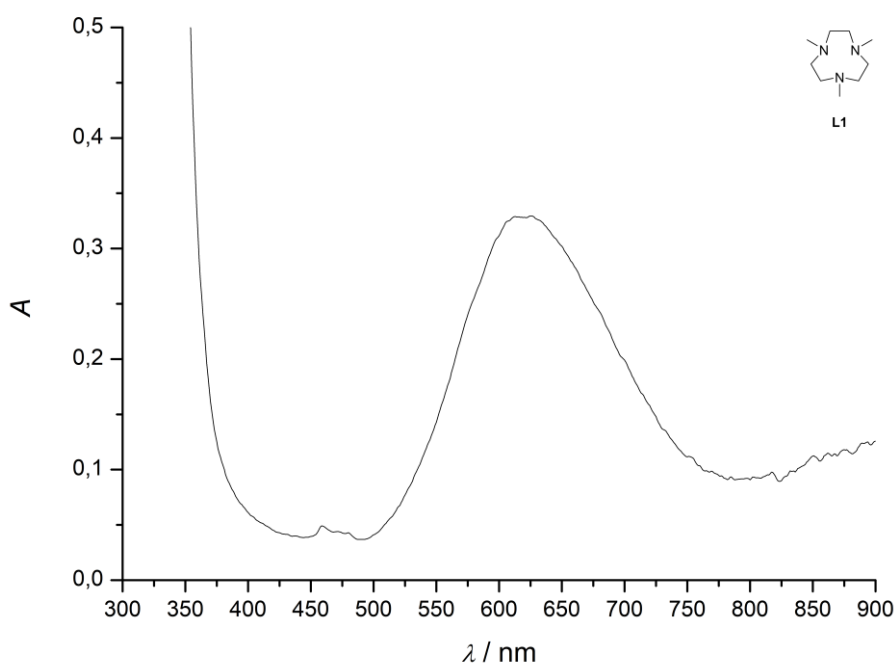
- [32] Belousoff, M. J., Battle, A. R., Graham, B., & Spiccia, L. Syntheses, structures and hydrolytic properties of copper(II) complexes of asymmetrically N-functionalised 1,4,7-triazacyclononane ligands. *Polyhedron*, **2007**, 26(2):344–355.
- [33] Belousoff, M. J., Duriska, M. B., Graham, B., Batten, S. R., Moubaraki, B., Murray, K. S., Spiccia, L. Synthesis, X-ray Crystal Structures, Magnetism, and Phosphate Ester Cleavage Properties of Copper(II) Complexes of N-Substituted Derivatives of 1,4,7-Triazacyclononane, *Inorg. Chem.*, **2006**, 45(9):3746-3755
- [34] Deal, K. A., & Burstyn, J. N. Mechanistic Studies of Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Phosphate Diester Hydrolysis. *Inorg. Chem.*, **1996**, 35(10):2792–2798.
- [35] Deck, K. M., Tseng, T. A., & Burstyn, J. N. Triisopropyltriazacyclononane Copper(II): An Efficient Phosphodiester Hydrolysis Catalyst and DNA Cleavage Agent. *Inorg. Chem.*, **2002**, 41(4):669–677.
- [36] WILLIMETZ, Robert. *Deriváty triazacyklononanu s thiazolovou postranní skupinou pro ukotvení do polymerních nosičů*. Praha, 2020. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie. Vedoucí práce Kotek, Jan.
- [37] <https://mestrelab.com/software/mnova/>, dostupné online, cit. 29.04.2022.
- [38] [https://www.waters.com/waters/en\\_US/Empower-Chromatography-Data-System/nav.htm?cid=513188&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/Empower-Chromatography-Data-System/nav.htm?cid=513188&locale=en_US), dostupné online, cit. 29.04.2022.

# Přílohy

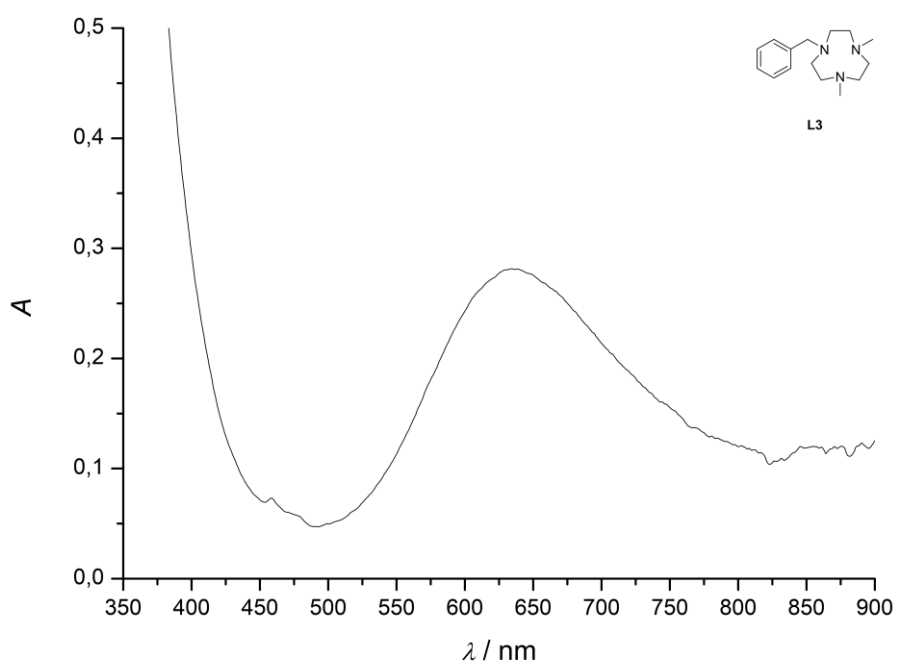
## A. Absorpční spektra připravených Cu(II) komplexů



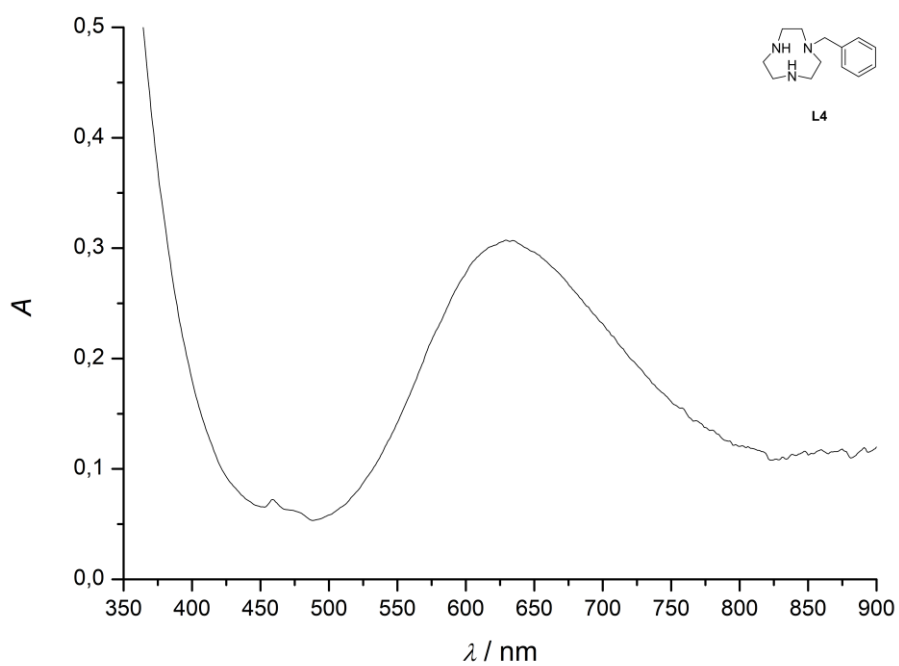
Obr. 21: Absorpční spektrum 5mM roztoku Cu(II) komplexu ligandu TACN.



Obr. 22: Absorpční spektrum 5mM roztoku Cu(II) komplexu ligandu L1.

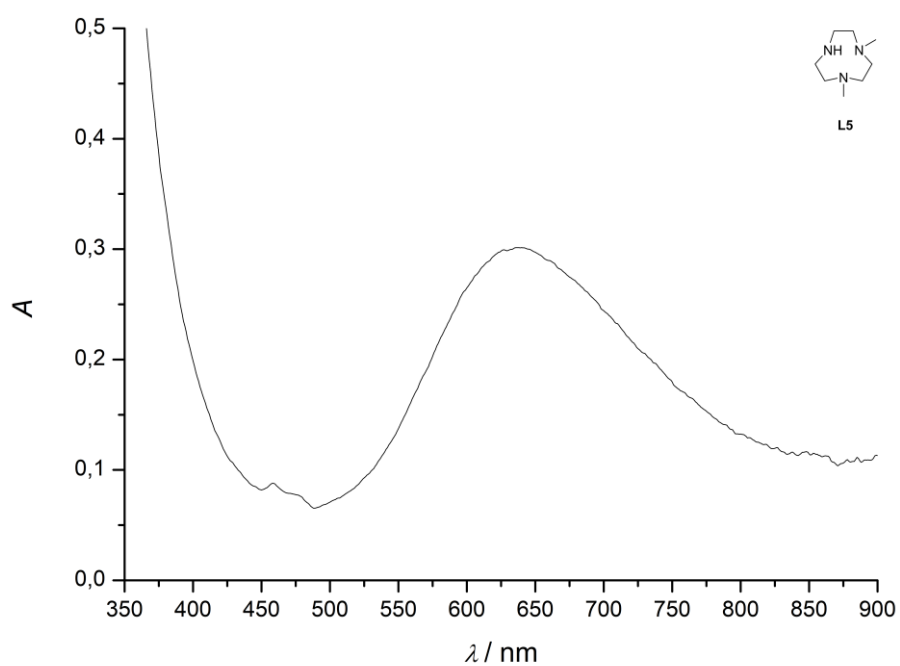


Obr. 23: Absorpční spektrum 5mM roztoku Cu(II) komplexu ligandu L3.

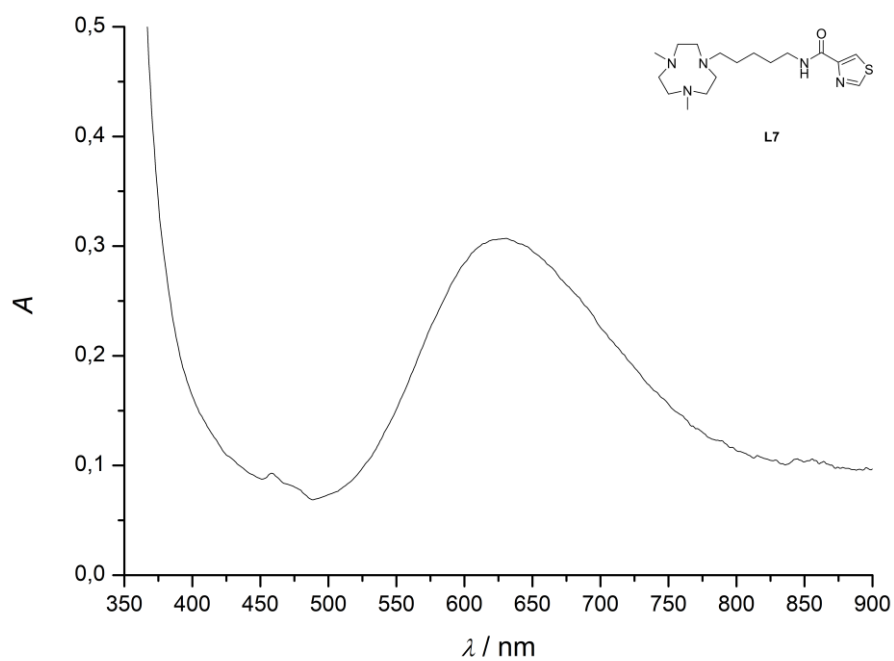


Obr. 24: Absorpční spektrum 5mM roztoku Cu(II) komplexu ligandu L4.



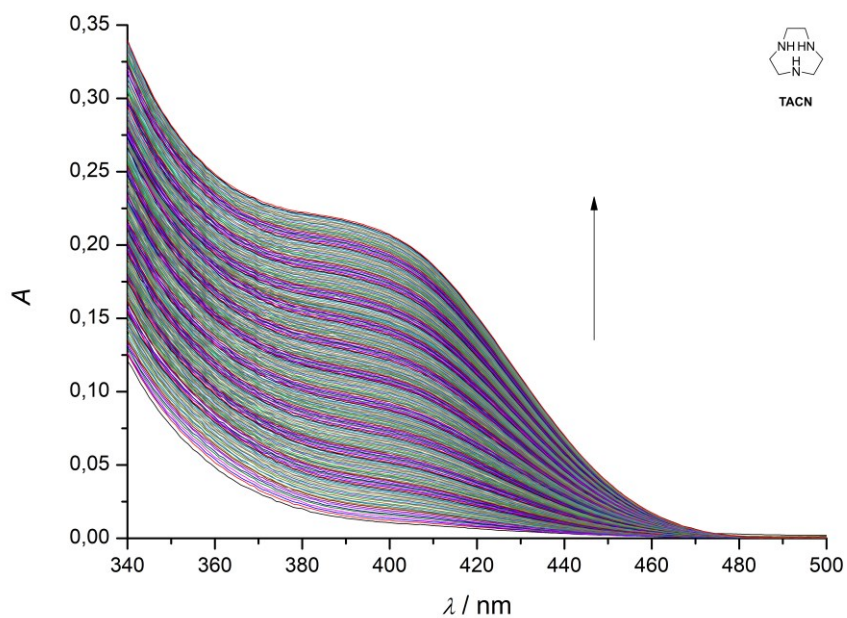


Obr. 25: Absorpční spektrum 5mM roztoku Cu(II) komplexu ligandu L5.

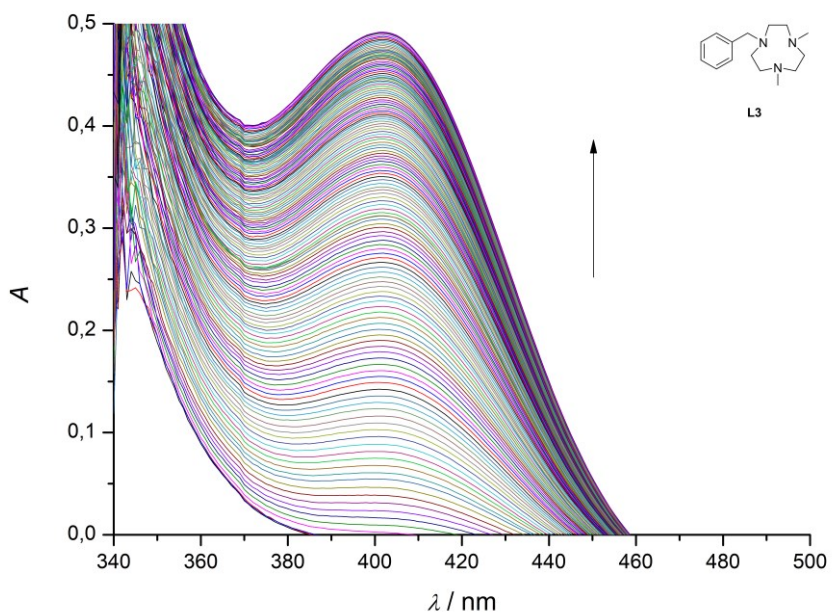


Obr. 26: Absorpční spektrum 5mM roztoku Cu(II) komplexu ligandu L7.

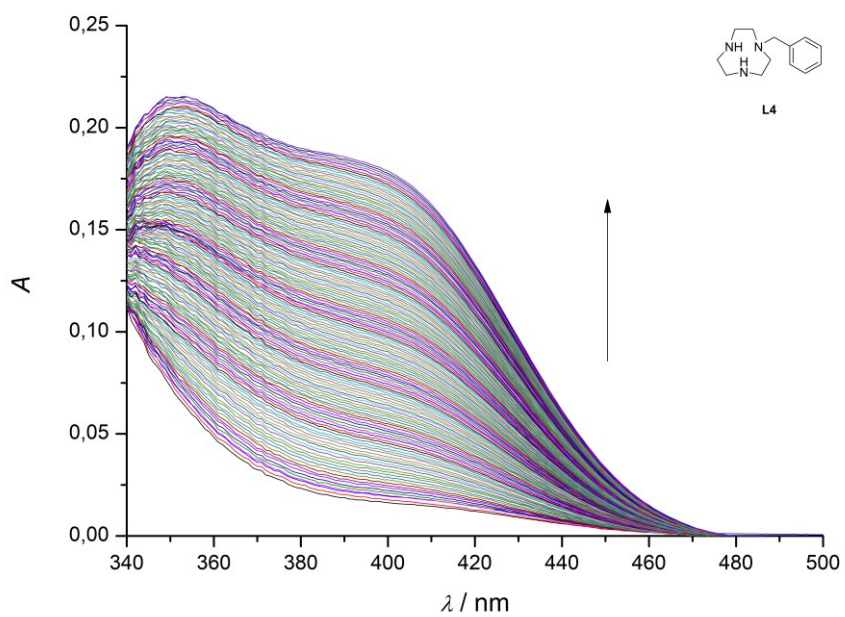
## B. Závislosti absorbance $A$ na vlnové délce $\lambda$ při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexů



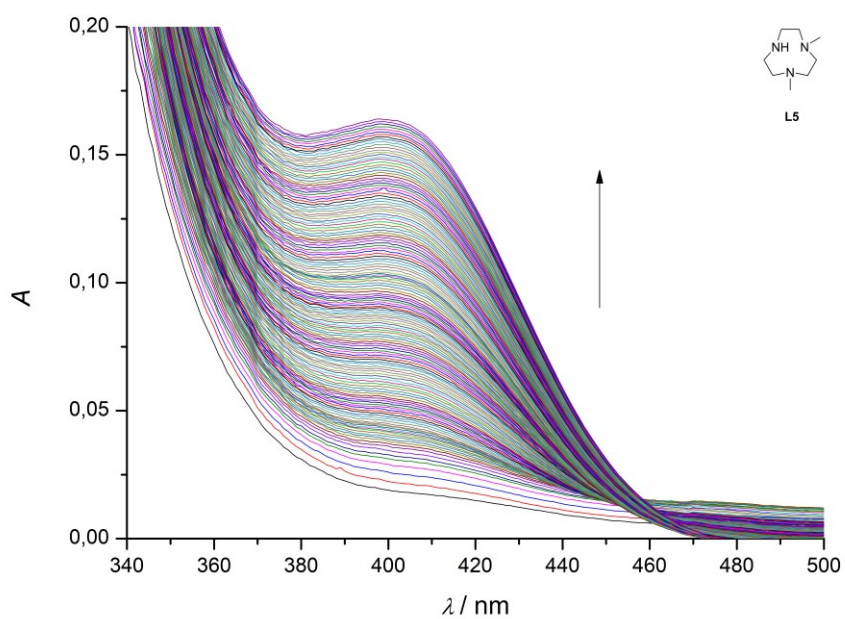
Obr. 27: Závislost absorbance  $A$  na vlnové délce  $\lambda$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu TACN.



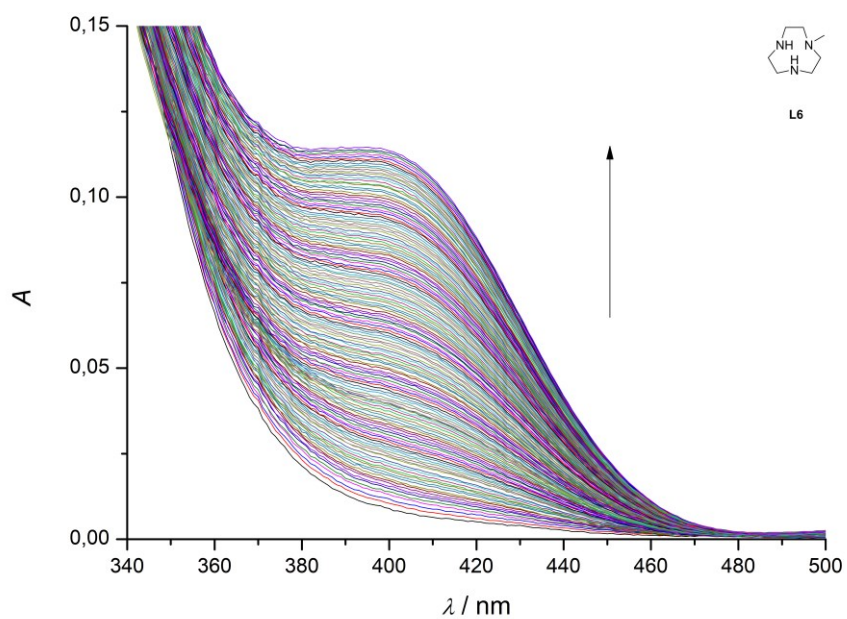
Obr. 28: Závislost absorbance  $A$  na vlnové délce  $\lambda$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L3.



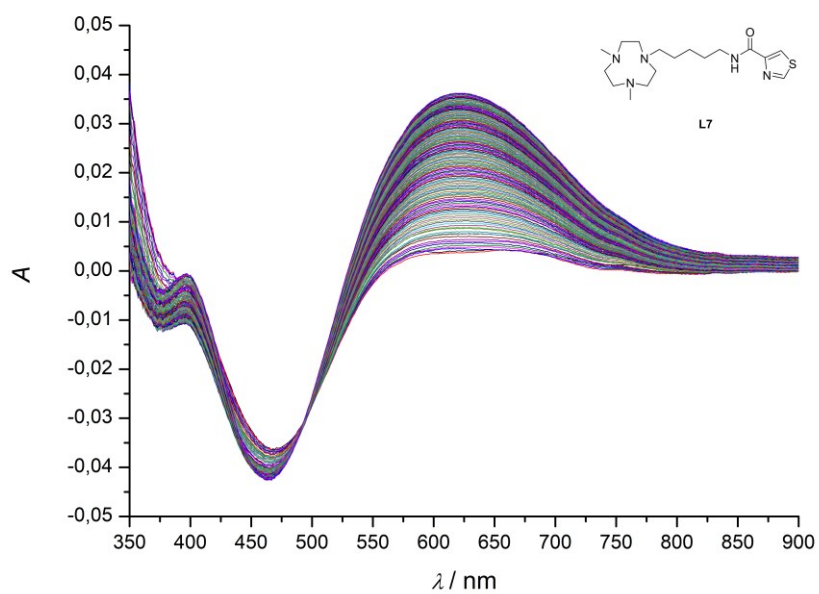
Obr. 29: Závislost absorbance  $A$  na vlnové délce  $\lambda$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L4.



Obr. 30: Závislost absorbance  $A$  na vlnové délce  $\lambda$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L5.

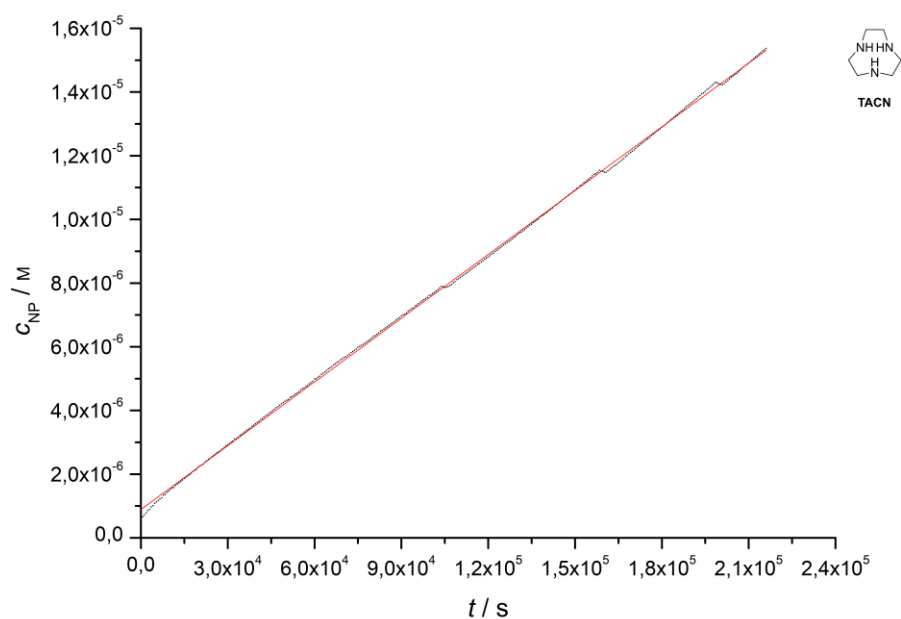


Obr. 31: Závislost absorpance  $A$  na vlnové délce  $\lambda$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L6.

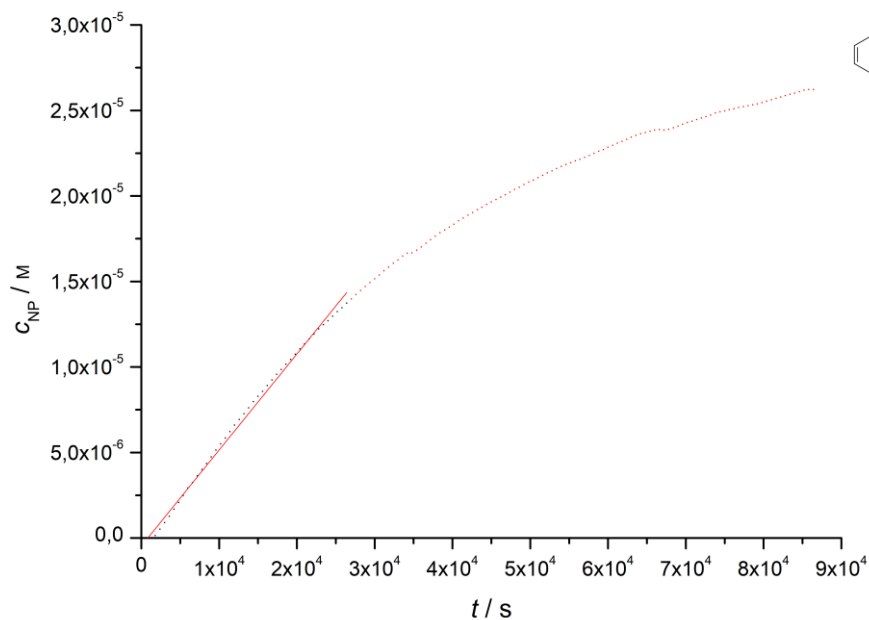


Obr. 32: Závislost absorpance  $A$  na vlnové délce  $\lambda$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L7.

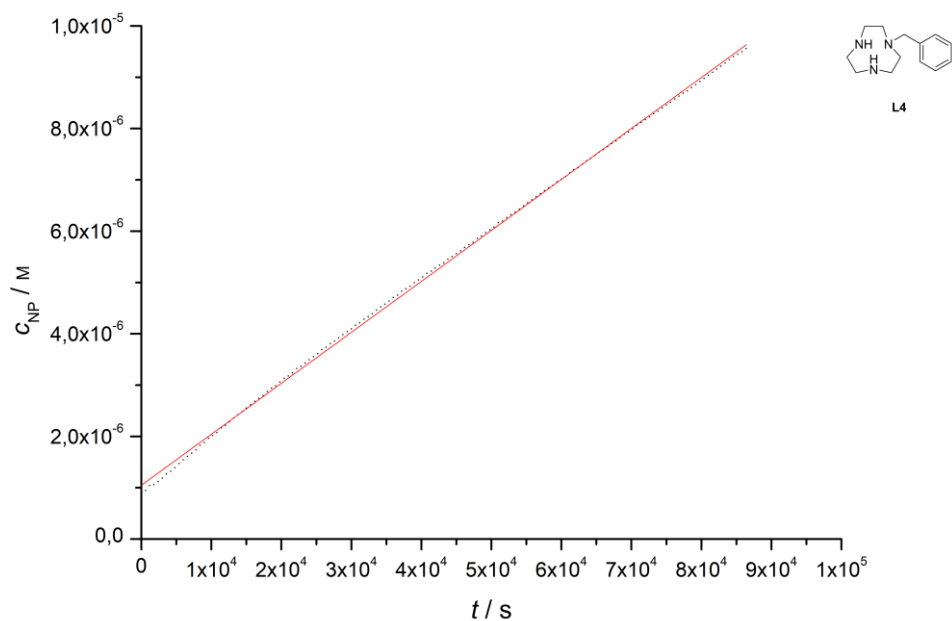
**C. Závislosti molární koncentrace 4-nitrofenolátových iontů  $c_{NP}$  na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu**



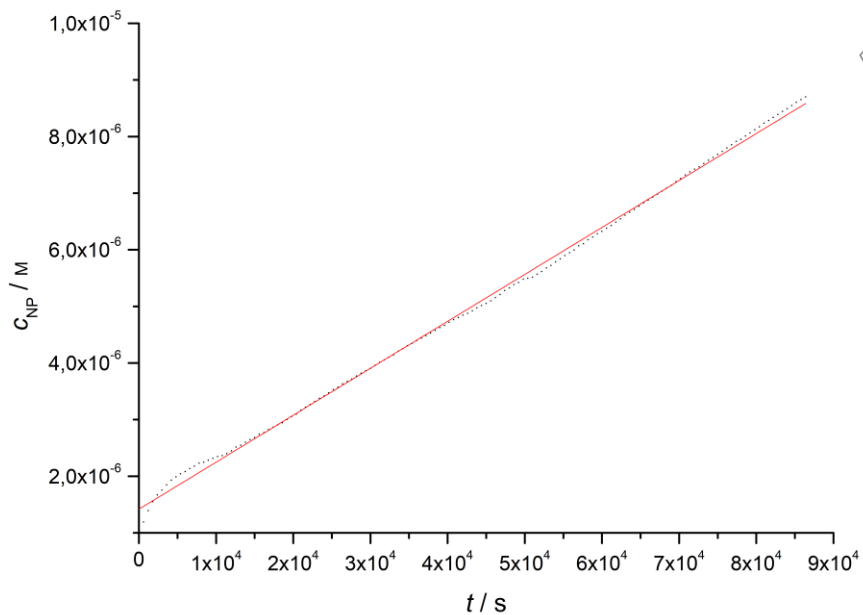
*Obr. 33:* Závislost molární koncentrace 4-nitrofenolátových iontů ( $c_{NP}$ ) na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu TACN.



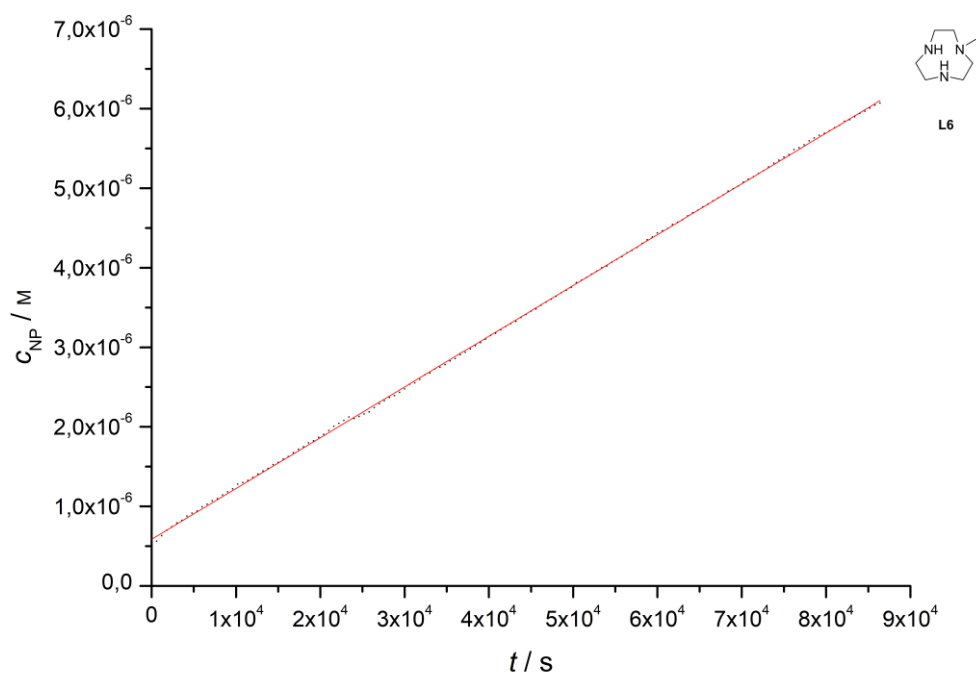
*Obr. 34:* Závislost molární koncentrace 4-nitrofenolátových iontů ( $c_{NP}$ ) na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L3.



Obr. 35: Závislost molární koncentrace 4-nitrofenolátových iontů ( $c_{NP}$ ) na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L4.

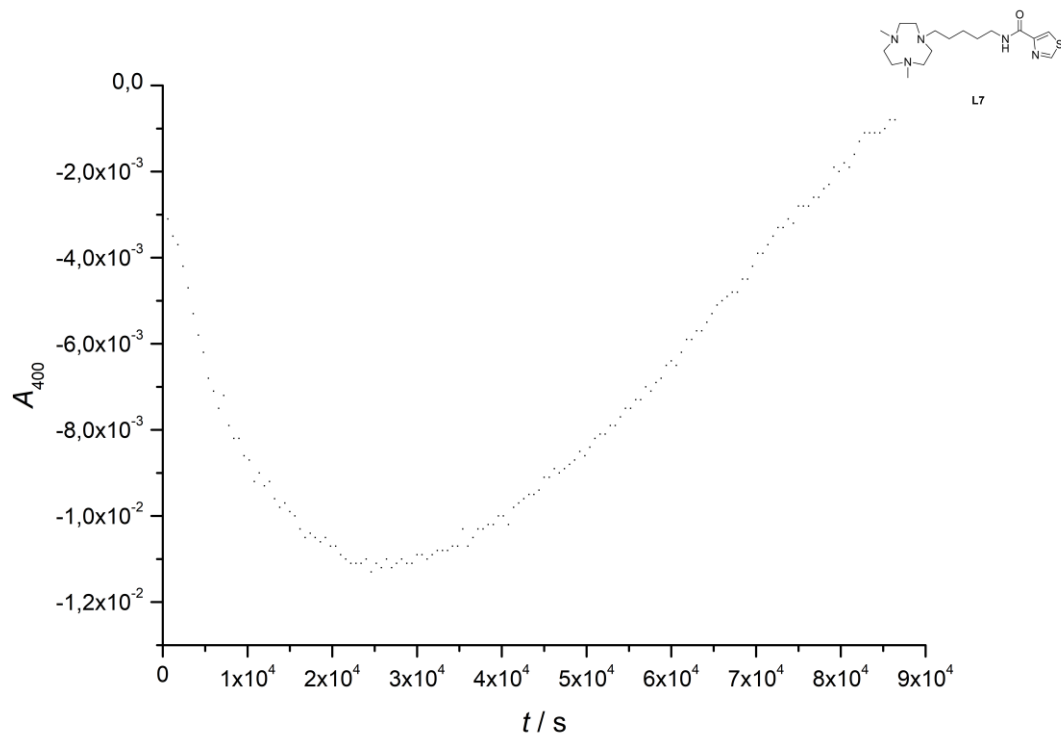


Obr. 36: Závislost molární koncentrace 4-nitrofenolátových iontů ( $c_{NP}$ ) na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L5.



Obr. 37: Závislost molární koncentrace 4-nitrofenolátových iontů ( $c_{NP}$ ) na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L6.

**D. Závislost absorbance při 400 nm na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L7**



*Obr. 38:* Závislost absorbance při 400 nm na čase  $t$  při měření hydrolytické aktivity Cu(II) komplexu ligandu L7.