

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie

BIFUNKČNÍ CHELATANTY
DVOJMOCNÉ MĚDI

Bifunctional ligands
for copper(II) complexation

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Martina Benešová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Kotka, PhD., a že jsem všechny technicky použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných touto prací, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze popísemně a s mou souhlasnou dohodou této univerzity.

V Praze, 30. srpna 2010

Martina Benešová

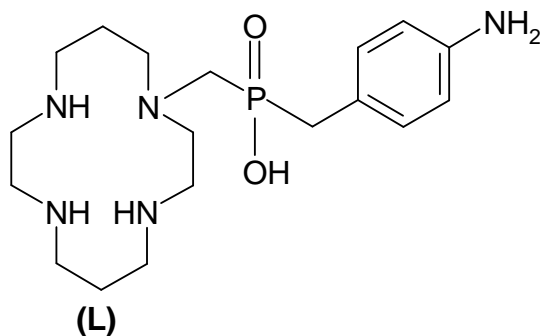
ABSTRAKT

Hlavním cílem této práce byla příprava makrocyclického ligandu založeného na 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekanovém skeletu, jež je vhodný pro komplexaci dvojmocných kationtů. Cyklamový makrocyklus byl navržen tak, aby nesl jednoslabě koordinující seaminobenzylfosfinátový pendantní rameno (sloučenina **L**). V průběhu syntézy byl skelet nesymetricky ochráněn v polohách 1,4 a 8.

Zavedení fosfinátového pendantního ramene bylo vyžádáno Mannichovou reakcí s odpovídajícími methyl a bis(trimethylsilyl)estery 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny a alkyací a použitím sesytlesteru odvozeného od hydroxymethyl derivátu 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny (benzyl *o*-methylsulfonylhydroxymethyl(nitrobenzyl)fosfinátu).

V rámci této práce byl nalezen cestou syntézy cíleného produktu. Rovněž byla zreprodukována syntéza cyklamů a jeho nesymetrické ochrání v různých polohách.

Dále byla studována kinetika ochrání cyklamového skeletu následnou bazickou kyselou hydrolyzou esteru pendantního ramene.



KLÍČOVÁSLOVA

Cyklam, fosfináty, nukleární medicína, měďnaté komplexy.

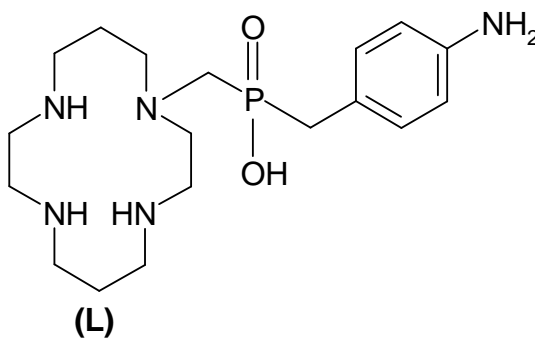
ABSTRACT

The main aim of this thesis was preparation of macrocyclic ligand based on 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane skeleton, which is suitable for selective complexation of divalent copper. Cyclam macrocycle bears one weakly coordinating aminobenzylphosphinate pendant arm (compound **L**). During the synthesis was the skeleton asymmetrically protected in positions 1,4 and 8.

Attachment of phosphinate pendant arm was tried with the corresponding Mannich reaction of ethyl or bis(trimethylsilyl) esters of 4-nitrobenzylphosphonic acid and alkylation using mesityl ester derived from hydroxymethyl(4-nitrobenzyl)phosphonic acid (benzyl *O*-methylsulfonylhydroxymethyl(4-nitrobenzyl)phosphinate).

In the frame of this work the synthesis of the targeted product was developed. Reproducibility was also verified for synthesis of cyclam and its asymmetric protection in three positions.

Furthermore, a study of the kinetics of de-protection of cyclam skeleton and pendant arm using basic and acid hydrolysis was done.



KEYWORDS

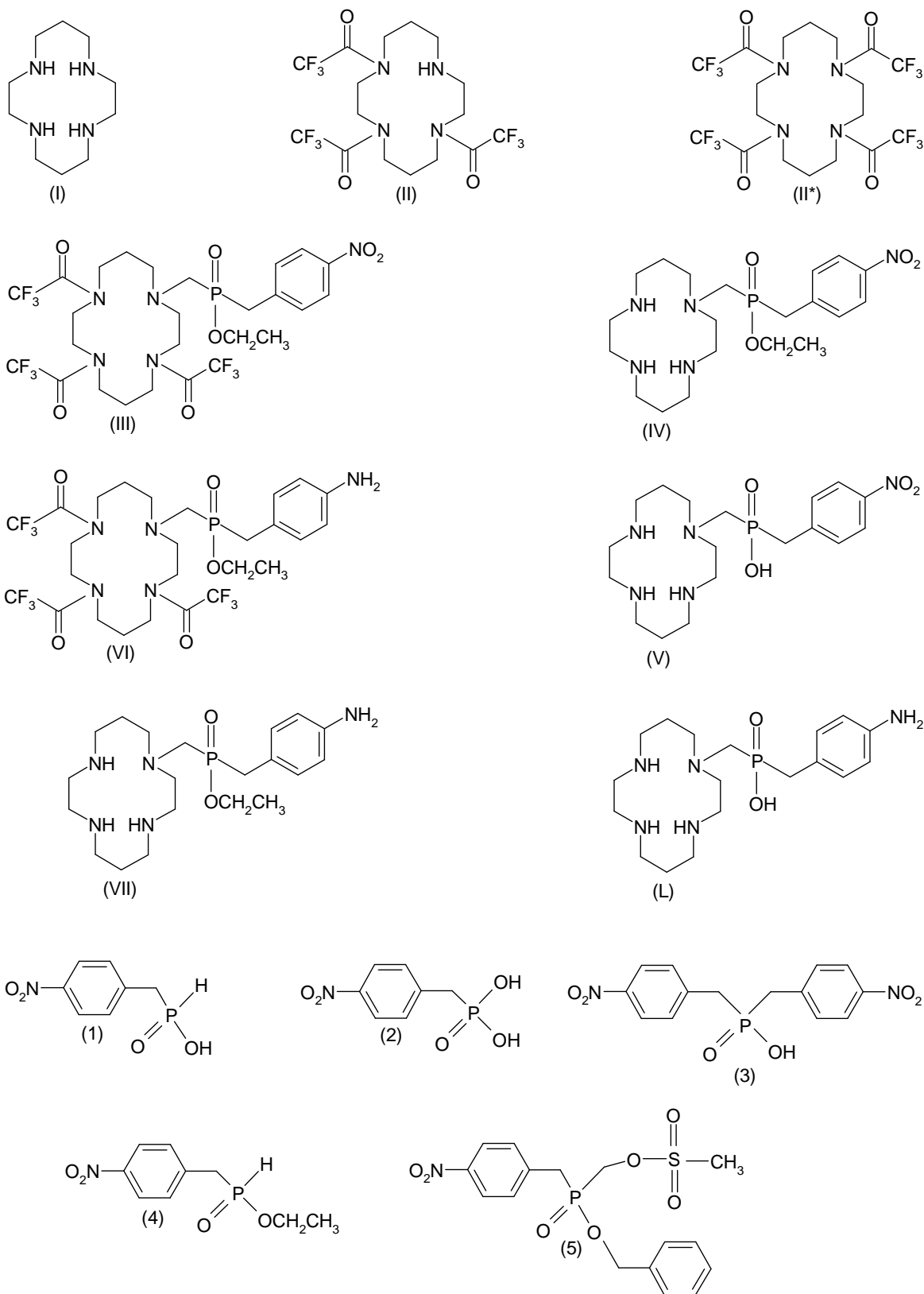
Cyclam, phosphinates, nuclear medicine, copper(II) complexes.

OBSAH

1. Teoretický úvod	8
1.1 Nukleární medicína a její využití	8
1.1.1 Radioterapeutika	8
1.1.2 Radiodiagnostika	9
1.1.3 Radiofarmaka	12
1.2 Měď	12
1.2.1 Koordinační sloučeniny mědi	13
1.2.2 Izotopy mědi a jejich použití v medicíně	14
Radionuklid ^{64}Cu	15
Radionuklid ^{67}Cu	15
1.3 Ligandy vhodné pro komplexaci mědi	16
1.3.1 Polyazamakrocykly (polyaminy)	16
1.3.2 Polyaminokarboxyláty	17
1.3.3 Makrocyclické polyaminofosfonáty	18
1.3.4 Bis(thiosemikarbazony)	19
1.3.5 Porfyriny	20
1.4 Teoretické pozadí a cíl práce	21
2. Experimentální část	23
2.1 Seznam použitých chemikálií	23
2.1.1 Chemikálie	23
2.1.2 Použití rozpouštědla	24
2.1.3 Použití deuterovaného rozpouštědla	24
2.2 Metody charakterizace	24
2.2.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)	24
2.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)	25
2.2.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	25
2.2.4 Rentgenová strukturní analýza	26
2.3 Syntéza	27
2.3.1 Příprava fosforových prekurzorů	28
Syntéza látky 1 (4-nitrobenzylfosfinová kyselina, N ₂ BPIN)	28
Příprava ethylesteru kyseliny nitrobenzylfosfinové	30
2.3.2 Příprava cyklamu	31

2.3.3Ochrán ěnícyclamovéhoskeletu	33
2.3.4Pokusyonavázánífosforovéhopendantu	34
MannichovareakcesethylesteremNBPIN	34
MannichovareakcestrimethylsilylesteremNBPINgen erovaným pomocíBSA..	35
MannichovareakcestrimethylsilylesteremNBPINgen erovaným pomocíHMDS	37
AlkylacesmesylesteremhydroxomethylderivátuNBPI N.....	38
2.3.5Postupnéodšt ěpeníchránícíchskupinasyntézacílové látkyL	39
Odchrán ěnícyclamovéhoskeletuanáslednáhydrolyzaethyles teru.....	39
DeesterifikacepomocíMe ₃ SiBranáslednéodchrán ěnícyclamovéhoskeletu	42
Redukcenitroskupiny naaminoskupinu aodšt ěpenízbylýchchránícíchskupin...	43
3.Výsledkyadiskuze	47
3.1SyntézaNBPINajejichester ů.....	47
3.2Syntézacyklamu	48
3.3Ochrán ěnícyclamovéhoskeletu	48
3.4Zavedenífosfinátovéhopendantníhoramene	48
3.5Hydrolyzacyklamovéhochrán ěníaesteru	49
3.6Úsp ěšnáp řípravicílové látkyL	51
4.Záv ěr	54
5.Seznampoužitýchzkratek	54
6.Pod ěkování.....	56
7.Použitáliteratura	58
8.P řílohy.....	61

Schéma 1: Označení připravovaných látek používané v následujícím textu



1. TEORETICKÝ ÚVOD

Studium radioaktivních nuklidů ům ědi (p ředevším ^{64}Cu a ^{67}Cu) je v posledních letech stále více spojováno s jejich možným využitím v nukleární medicíně. Díky svým vlastnostem jsou vhodně propoužiti jako v diagnostice, tak v terapeutických metodách.

1.1 NUKLEÁRNÍ MEDICÍNA A JEJÍ VYUŽITÍ

Nukleární medicína je speciální interdisciplinární lékařský obor, vyznačující se využitím radioaktivity za účelem diagnostiky a terapie chorob.^[1] Umožňuje vyšetření v různých oblastech medicíny. Svou platnost nachází ve vnitřní lékařství, pediatrii, ale také například v oboru psychiatrie.

Při terapii je metoda nukleární medicíny využívána k léčbě všech druhů rakoviny, k mírnění bolesti rakoviny kostí nebo k léčbě onemocnění krve.^[2]

Zobrazování pomocí tomografické scintigrafie patří mezi nejčastěji uplatňované metody nukleární medicíny pro diagnostiku chorob. Jedná se především o jednofotonovou emisní počítačovou tomografii SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) a pozitronovou emisní tomografii PET (*Positron Emission Tomography*).^[3]

1.1.1 RADIOTERAPEUTIKA

Ve většině případů se jedná především o terapii nádorových onemocnění, která je založena na účincích ionizujícího záření na buňky tkání. Ty jsou vlivem záření usmrcovány nebo inaktivovány poškozením jejich DNA. Žádáné změny může být dosaženo buďto v plném rozsahu, kdy dojde k následkem terapie k úplnému vyléčení pacienta (kurativní terapie) nebo pouze pozastaví průběh onemocnění (paliativní terapie). Dalšího využití pak nachází v léčbě degenerativních a zánětlivých onemocnění.^[3]

Cílem radioterapie je tedy selektivní likvidace nádorového ložiska s ohledem na co nejmenší poškození okolních zdravých tkání. Proto jsou účely vhodné užití radionuklidů produkujících záření s krátkým dosahem (α a β^-). Nadměrná produkce záření by v tomto případě byla narušila diagnostiku krajně nežádoucí, neboť by docházelo k nežádoucímu účinku záření na okolní zdravé tkáně. Výjimkou tvoří směšené (β^- a γ) záření, které mohou být využity k monitorování průběhu terapie. Mezi radionuklidy vhodné pro využití v radioterapii patří například ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re a ^{188}Re .

Zástupci smíšených zářičů radionuklidů ^{64}Cu (β^+/β^- a γ) nebo ^{67}Cu jako kombinovaný β^- zářič s nízkou energetickými γ -fotony. Ty jsou emitovány při deexcitaci metastabilních izomerů jader zinku vzniklých jako produkt rozpadu výchozího radioizotopu ^{67}Zn .^[1,3] Nejčastěji používaným radioizotopem je metastabilní $^{99\text{m}}\text{Tc}$, který je užíván ve více než 90% provedených procedur.^[1]

Radioterapeutika se metodicky dělí na teleterapii a brachyterapii podle způsobu aplikace radioaktivity do cílového místa. Patří sem teleterapie, brachyterapie a radioisotopová terapie.

Teleterapie (označujeme jako EBRT – *External Beam Radio Therapy*) využívá ozařování svazky záření z vnějšího zdroje. Do této oblasti spadají unikátní radiochirurgické přístroje známé jako Leksellův gama nůž (Leksell gammaknife). Používá se při léčbě nádorů mozku. Díky fokusaci mnoha svazků paprsků v oblasti nádoru nedochází k poškození okolní tkáně. Radiační zátěž se tak vyhneme citlivým oblastem jako je optický nerv, oční čočka či mozkové kmeny. Zdrojem vysokoenergetického γ -záření je ^{60}Co (γ , 1,17 + 1,33 MeV).

Brachyterapie spočívá v aplikaci (punkční nebo implantací) uzavřených radionuklidových zářičů přímo do cílové tkáně či do její těsné blízkosti. Jako uzavřený zářič je označován radioizotop zapouzdřený do chemicky inertního obalu, který s okolní tkáněmi jak chemicky neinteraguje.

Radioisotopová terapie je založena na aplikaci otevřených zářičů, ve vhodné chemické formě, přímo do organismu. Vlastní činná látka následně distribuována krevním řečištěm do cílového místa. Otevřený zářič není, oproti uzavřené formě radionuklidu, ničím izolován a může být následně tělem metabolizován nebo vyloučen.^[1,3,4,5]

1.1.2 RADIODIAGNOSTIKA

Do oblasti radiodiagnostického stanovení spadají metody planární a tomografické scintigrafie. Zobrazení spočívá v naměření detekcí fotonů emitovaných γ -zářením pomocí scintilačních kamer. Jednotlivé radionuklidové přístroje využívají různé metody scintigrafie uvedeny v Tab. 1. Každý foton je po vstupu do detektoru pod vlivem elektrického impulsu, z nichž se vytváří scintigrafický obraz distribuce radiofarmaka. Vzniklé γ -záření je emitováno všemi směry, a proto se při snímání scintigrafického obrazu provádí tzv. kolimace – činná projekce. Záření je vystaveno kolimátoru (obvykle z olova sestávající z drobných rovinných nebo kulovitých otvorů), díky kterému projdou pouze fotony rovinně a směrem do otvorů kolimátoru.

Nejstarší a nejjednodušší vyšetřovací metodou je RTG. Užívá vysokoenergetické Roentgenové záření o krátké vlnové délce. Při průchodu záření tkáněmi dojde k jeho zeslabení, které je úměrné hustotě a tloušťce látky. K vyhodnocení zviditelnění prošlého záření se používá fotografický papír nebo fotografická deska obsahující halogenidový film. Vzniklý obraz představuje negativní zobrazení hustoty tkáně. V posledních letech se začaly využívat moderní skenery. Kombinací klasického Roentgenového záření doprovázeného počítačovým systémem nazýváme počítačovou tomografií (CT – *Computed Tomography*). Obě metody však neposkytují vysoké rozlišení.^[3]

Planární scintigrafie je základní a nejčastěji užívaná zobrazovací metoda. Jejím výsledkem je dvojrozměrné zobrazení trojrozměrné distribuce radiofarmak v celém těle, jeho částí nebo vyšetřovaném orgánu. Při řízení většího množství snímků ve velmi krátkém časovém úseku umožňuje dynamickou distribuci radiofarmak v orgánismu. Tato zobrazovací metoda ovšem častěji poskytuje dostatečné rozlišení.^[6]

Mezi nejvýznamnější metody tomografické scintigrafie patří SPECT a PET.

SPECT – Jednofotonová emisní počítačová tomografie (Single Photon Emission Computed Tomography). Tato metoda je založena na detekci fotonů o energii přibližně 100–200 keV emitovaných γ -zářiči. Nejčastěji využívaným radioizotopem je izotop ^{99m}Tc . Při vyšetření rotuje detekční kamera po kruhové dráze kolem těla pacienta, snímá scintigrafické obrazy z různých úhlů (0–360°). Tímto způsobem je získán obraz objektu ze všech stran. Během jedné rotace se jme 32–64 obrazů, z kterých se počítačovou rekonstrukcí získá trojrozměrné zobrazení distribuce radiofarmaka.^[3]

PET – Pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography).

V současné době je označována za nejmodernější diagnostický postup v nukleární medicíně. Je založena na distribuci pozitronového zářiče, který se umísťuje mezi dva dostatečně malé protilehlé detektory zapojené do tzv. koincidenčního obvodu. Vzniklé pozitrony anihlují s okolními elektrony. Při anihilaci vznikají dvě stejné fotony γ -záření o energii 511 keV. Z místa svého vzniku vylétí v protilehlých směrech (pod úhlem 180°). Jejich současná detekce umožňuje určit úvod vzniklých fotonů s velkou přesností. Koincidenční obvodem tedy projdou další elektronické aparatury, které impulzy odpovídající současně detekci fotonů v obou protilehlých detektorech. Ze souboru získaných koincidenčních pářů se rekonstruuje trojrozměrné tomografické obrazy.

Nejdůležitější oblastí využití PET je již široké používání lokalizace a povaha nádorů. Zobrazuje metabolicky aktivní nádorové tkáně (narození buněk inaktivovaných), proto je tedy možné monitorovat odezvu nádorové tkáně na radioterapii. [3]

V PET se používají radionuklidy emitující záření β^+ , vhodné vlastnostmi mají například ^{11}C , ^{15}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{76}Br , ^{124}I . Během organické syntézy sestávají jsou částí molekuly léků či vitamínů. V posledních letech se zaměřuje pozornost také na kationtyp přechodných kovů, a to především na ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{45}Ti , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu a ^{64}Cu . [7] S izotopy ^{66}Ga a ^{76}Br byly provedeny radiochemické a preklinické studie. [8]

Tabulka 1: Radionuklidy a jejich použití v diagnostice [9]

Nuklid	Použití	Nuklid	Použití
^{11}C	vyšetření mozku PET	^{67}Ga	zobrazování nádorových chazanětlivých lézí
^{14}C	značení sloučeniny	^{68}Ga	studie trombozy a aterosklerózy, PET
^{13}N	vyšetření PET	^{72}Se	zobrazování mozku
^{15}O	vyšetření cévního zásobení mozku pomocí PET	^{75}Se	studie proteinů
^{18}F	vyšetření PET	$^{81\text{m}}\text{Kr}$	zobrazování jater a slinivky
^{32}P	diagnostika chorob kostí	^{82}Rb	lokalizace činnosti srdce
^{33}P	značení sloučeniny	^{85}Sr	měření metabolismu kostí
^{35}S	diagnostika nemoci srdce značení nukleových kyselin	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	zobrazování srdce, plic, štítné žlázy, žlučníku, kůže, lymfatických uzlin, kostí, jater, sleziny a ledvin
^{46}Sc	studie krevního oběhu	^{109}Cd	detekce rakoviny pediatrická vyšetření
^{47}Sc	diagnostika rakoviny	^{111}In	diagnostika nemoci srdce detekce odmítnutí srdce činných transplantátů zobrazení bakteriálních infekcí zobrazení metastazujících melanomů
^{47}Ca	buněčné funkce a tvorba kostí	^{123}I	poruchy štítné žlázy
^{51}Cr	studium červených krvinek vnitřní krvácení	^{125}I	detekce osteoporózy značení léků
^{51}Mn	lokalizace činnosti srdce	^{131}I	poruchy štítné žlázy patobiochemie mozku
^{52}Mn	vyšetření PET	^{127}Xe	zobrazování plic zobrazování neuronálních poruch mozku
^{57}Co	zobrazování průdušnic	^{133}Xe	studium plicní ventilace
^{58}Co	indikátor zhojné anémie	^{169}Y	diagnostika GIT
^{59}Fe	vyšetření kostní dřeně studium metabolismu železa	$^{191\text{m}}\text{Ir}$	kardiovaskulární angiografie
^{64}Cu	vyšetření PET	$^{195\text{m}}\text{Pt}$	farmakokinetické studie pro nádorové léky
^{67}Cu	diagnostika rakoviny		

1.1.3 RADIOFARMAKA

Řada metod nukleární medicíny využívá číva značená radioaktivními izotopy, tzv. radiofarmaka. Tímto získává cenné informace o anatomii, metabolismu a orgánových funkcích. Významné jsou platněníchází v kardiologii, neurologii a onkologii.

Radioaktivní látky se do organizmu aplikují perorálně nebo intravenózně.^[3]

Radiofarmakum vstupuje do metabolismu způsobem, jenž je dán jeho chemickou strukturou a farmakokinetikou. Znamená to tedy, že každý typ radiofarmaka má své odlišné metabolismus a distribuci. Jednotlivá farmaka se volí podle typu vyšetření. Mezi častoužívanými izotopy patří ^{32}P (diagnostika chorob kostí), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (zobrazování jater, ledvin, plic a dalších orgánů) a ^{123}I (vyšetření poruch štítné žlázy).^[3,10]

Při terapii rakoviny bývají číva navržena tak, aby byly selektivně vychytávány a akumulovány v cílových tkáních, díky čemuž je nádor likvidován s velkou efektivitou a nízkými vedlejšími účinky. Velice důležitým parametrem je poločas rozpadu, který musí být v řádech hodin až dní.^[1,10]

Nejpoužívanější číva (emitory γ -záření) ve SPECT v České republice jsou: jodid hipuransodný (^{131}I), jodid sodný (^{131}I), chlorid thalný ($^{201}\text{TlCl}$), citronan gallit-sodný (^{67}Ga) a $^{153}\text{Sm-EDTMP}$.^[11]

V zobrazovací metodě PET se nejčastěji používá radioaktivní ^{18}F s poločasem rozpadu $\tau = 110$ min. Nejpoužívanější radiofarmakem je ^{18}F -fluorodeoxyglukóza–FDG.^[12]

1.2 MĚĎ

První zmínky o využití mědi jsou historicky datovány okolo roku 5000 př. n. l. Výzkumy ovšem poukazují na to, že byla měď známá již kolem roku 9000 př. n. l. Po čátek doby bronzové (3000 př. n. l.) nastal společenství s objevem schopnosti mědi tvořit pevné bronzy.^[13]

Původ jejího názvu je jistý, nejpravděpodobněji je spojitost s názvem starověké Médie, na jejímž území se nacházel významná naleziště mědi v Zakavkazí.^[14] Latinský název její prokazatelně spjat s místem výskytu mědi. Pojmenování cuprum je spojeno s ostrovem Kypr (*aescyprum* – kyperský kov), kde byla měď objevena již starými Římany.^[13,15]

Měď se nachází v první vedlejší (I.B) skupině periodické tabulky společně se stříbrem a zlatem. Ryzím měděným železem se objevuje v řadě minerálů. V přírodě se vyskytuje ve dvou stabilních izotopech ^{63}Cu (69,17%) a ^{65}Cu (30,83%). Měď je měkký a kujný kov, vyznačuje se charakteristickým červeným zbarvením a má mimořádnou schopnost tvořit slitiny s většinou kovů. Nejčastěji je rozšířena v podobě sulfidu (chalkopyrit), oxidu měďnatého (cuprit), případně uhličitany a hydroxidů (malachit, azurit). Používá se především v výrobě elektrických vodičů, dále pak v mincovnictví, strojírenství, elektronice, či jako katalyzátor. [13,16,17]

Měď je důležitým biogenním prvkem, komplexně vázaná vystupuje jako kofaktor důležitých metaloenzymů (ceruloplasmin, metalothionein, aj.). Jsou známy dvě geneticky podmíněné choroby (Wilsonova choroba a Menkeho syndrom), které souvisí s metabolizmem mědi. Měď je po železu a zinku třetí nejrozšířenější přechodným kovem v lidské těle. Měďnaté kationty jsou vysoce toxické pro mikroorganismy, a proto je na jejich bázi založena celá řada algicidních, baktericidních a fungicidních prostředků. [13,15]

1.2.1 KOORDINAČNÍ SLOUČENINY MĚDI [13,15,18,19]

Měď nabývá ve svých sloučeninách oxidačních čísel II, III a IV. Výjimečně (v některých jednoduchých fluorokomplexech) může nabývat oxidačního čísla V. Stabilní sloučeninami jsou disulfová a azurová oxidacíslučenina s oxidačním číslem nejvyšší.

Oxidační číslo III – elektronová konfigurace d^8 – sloučeniny podléhají velmi snadno redukci a protonem k oxidacíslu 2+ přecházejí. Z toho důvodu vyžaduje v komplexech stabilizaci silnými elektronegativními ligandy. Většinou komplexů trojmocné mědi je nízká spinová a diamagnetická se čtyřcovou geometrií koordinací sférickou. Výjimkou tvoří světle zelený vysokospinový komplex $K_3[CuF_6]$.

Oxidační číslo II – konfigurace d^9 – vyskytuje se nejčastěji a je nejstálější. Jemně odvodit v jednoduchém měďnatém solitěm řadě aniontů. Převládá většinou měďnatých solí je rozpustná ve vodě, přičemž vzniká modře zbarvený kation $[Cu(H_2O)_5-6]^{2+}$. Nejčastěji se vyskytují koordinacíslu 4, 5 a 6. Převládá vlivem Jahnova-Tellerova efektu odpovídají těmto koordinacíslům nepravidelná geometrická uspořádání. Pro měďnaté kationy je charakteristické velké množství sloučenin s N-donorovými ligandy jako jsou například ethylendiamin, amoniak, 2,2'-bipyridin nebo cyklam.

Hojně zastoupené jsou také *O*-donorové chelatovné ligandy. Z *O,N*-donorových ligandů tvoří významné skupiny látek aminokyseliny, peptidy a Schiffovy báze. Nejběžnější zástupcem ednatých solí je síran známý jako modrá skalice.

Oxidační číslo I – konfigurace d^{10} – měďní iont má nahodilou disproportionovat na Cu^0 a Cu^{II} vzhledem k vysoké hydratační energii Cu^{II} . Jedná se tedy o nestálé oxidační číslo, které je ovšem možno stabilizovat v málo rozpustných sloučeninách nebo za pomoci π -akceptorových či snadno polarizovatelných ligandů. Řadí se mezi níže fosfiny, thioestery, nitrily, případně kyanidové a jodidové ionty. Pro oxidační číslo I je typická existence tetraedrických komplexů jako jsou $[Cu(CN)_4]^{3-}$, $[Cu(py)_4]^+$ a $[Cu(phen)_2]^+$. Běžnější je výskyt koordinací čísel 2 a 3.

1.2.2 IZOTOPY MĚDI A JEJICH POUŽITÍ V MEDICÍNĚ^[16,20,21,22]

Uměle byla připravena řada izotopů (29) v rozmezí nukleonových čísel 52 až 80, společným časem rozpadu několik stovek nanosekund (^{69m}Cu , 360 ns) až několik desítek hodin (^{67}Cu , 61,8 h). Některé z nich existují též v metastabilních formách. Měď má v medicíně své místo vzhledem k hojnému výskytu jejích izotopů s vhodným poločasem rozpadu a energií emitovaného záření.

Příprava radioizotopů mědi probíhá v jaderném reaktoru nebo cyklotronu. Připravují se izotopy prvku sousedících v periodickém systému, díky tomu jsou častými příměsemi Zn nebo Ni.

Nejpoužívanějšími radioizotopy v radioterapii a radiodiagnostice jsou ^{64}Cu a ^{67}Cu . Izotop ^{67}Cu má oproti ^{64}Cu nižší terapeutický index z důvodu delšího poločasu rozpadu. Vlastnosti obou těchto radionuklidů jsou srovnatelné.

Nejdůležitější izotopy mědi potenciálně použitelné v medicíně jsou uvedeny v Tab. 2.

Tabulka 2: Vybrané izotopy mědi^[1,21]

Izotop	Poločas rozpadu	Přeměna
⁶⁰ Cu	23,7min	β^+ (92,6%),EZ(7,4%)
⁶¹ Cu	3,3h	β^+ (61,4%),EZ(38,6%)
⁶² Cu	9,7min	β^+ (98%),EZ(2%)
⁶³ Cu	stabilní	
⁶⁴ Cu	12,7h	β^+ (18%),EZ(44%), β^- (38%), γ (0,5%)
⁶⁵ Cu	stabilní	
⁶⁶ Cu	5,1min	β^- (100%)
⁶⁷ Cu	61,8h	β^- (100%)

RADIONUKLID ⁶⁴Cu

Izotop ⁶⁴Cu je díky svým vlastnostem jedním z nejuniverzálnějších radioizotopů mědi, použitelný jak v radioterapii, tak v radiodiagnostice. Poločas rozpadu (12,7h) je vhodný vzhledem k *in vivo* kinetice používaných molekulárních nosičů a je rovněž dostatečný pro přípravu složek. Přeměnou užívanou je rozpadem β^+ (18%) o energii E_{\max} 655 keV, β^- (38%, 573 keV), případně EZ (44%, 511 keV), podíl γ tvoří asi 0,5%. EZ bývá doprovázen vyloučením Augerových elektronů. Další výhodou je možnost přípravy v reaktorův řízení (⁶³Cu(n, γ)⁶⁴Cu) nebo nepřímou aktivací (⁶⁴Zn(n,p)⁶⁴Cu) na zinkovém terči.

Z medicínského hlediska se používá například ke stanovení retence mědi v játrech a v mozku u pacientů s Wilsonovou chorobou (defekt transportního enzymu mědi).^[23,24,25]

RADIONUKLID ⁶⁷Cu

Izotop ⁶⁷Cu má nejdelší poločas rozpadu (61,8h) ze všech radioaktivních izotopů mědi. Své využití nachází v radioterapii a v diagnostice rakoviny. Přeměnou probíhá rozpadem β^- (o energii E_{\max} 577 keV) na ⁶⁷Zn, případně na některý z řady stabilních nuklidů ^{67m}Zn. Přechod metastabilních izotomů zinku do základního stavu je doprovázen vyzařením γ -fotonů o energii 91,93 a 185 keV. Díky tomu je použitelný pro sledování distribuce radionuklidu pomocí SPECT.^[24,25] Jeho přípravu v reaktorův je poněkud finančně náročná, neboť reakce ⁶⁷Ni(n,p)⁶⁷Cu vyžaduje velký neutronový tok. V dnešní době se hledají vhodnější alternativy výroby.^[26]

1.3 LIGANDY VHODNÉ PRO KOMPLEXACI MĚDI

Radioizotopy kovů, a tedy i mědi, jsou ve volné formě velmi toxické, a proto se vpravují do těla pacienta v podobě stabilního měďnatého komplexu s vhodným ligandem.^[7] Tyto komplexy musí vykazovat vysokou kinetickou stabilitu *in vivo* (co nejmenší ztráty radionuklidu způsobené disociací podobením v těle) a co největší selektivitu komplexace pro daný radionuklid. Tyto vlastnosti musí obsahují mnoho iontů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , apod.) a chelataující chloučnin, které mohou mít za následek konkurenční komplexotvornou rovnováhu.^[27]

Bifunkční ligandy mají už řadu let své uplatnění v medicíně. V posledních letech probíhají intenzivní preklinické výzkumy pro jejich využití v radioterapeutice a radiodiagnostice.^[20] Dříve byly díky svým vlastnostem nasazovány pro sledování léčby Wilsonovy choroby, kdy dochází k patologickému ukládání mědi do organismu.^[28]

Pro správnou funkci je třeba zvolit bifunkční ligand, který pevně váže kovu zároveň umožňuje vznik kovalentní vazby mezi ním a biologicky aktivní molekulou.^[29] Současně je nutná rychlá komplexace (v řádu minut) vzhledem k relativně krátkým poločasům rozpadu izotopů mědi. Radiofarmakum by tak mělo vykazovat co nejvyšší možnou intenzitu záření.

Mezi zástupce chelatanů vhodných pro komplexování dvojmocného mědi patří polyaminy, polyaminokarboxyláty, polyaminofosfonáty, bis(thiosemikarbazony) a porfyriny.^[23,25,30] Rychlost komplexace jednotlivých ligandů lze zobecnit následujícím způsobem. Nejpomaleji se komplexují volné makrocikly. Rychlost komplexace se zvýší navázáním acetátového, případně fosfonátového pendantu (rychlost je pro oba substituenty téměř srovnatelná). Nejrychleji ze všech zmíněných ligandů se komplexují ligandy lineární. Bližší charakteristiky těchto látek jsou uvedeny v následujících oddílech.

1.3.1 POLYAZAMAKROCYKLY (POLYAMINY)

Polyazamakrocikly patří mezi nejčastěji používané chelatany dvojmocného mědi především díky vysoké kinetické stabilitě jejich komplexů.^[31,32] Mezi faktory ovlivňující kinetickou a termodynamickou stabilitu měďnatých komplexů patří velikost makrociklu, počet dusíkatých atomů a jejich bazicita, druhá počet navázaných pendantních skupin. Syntéza těchto komplexů a studium koordinačních vlastností probíhá již řadu let.

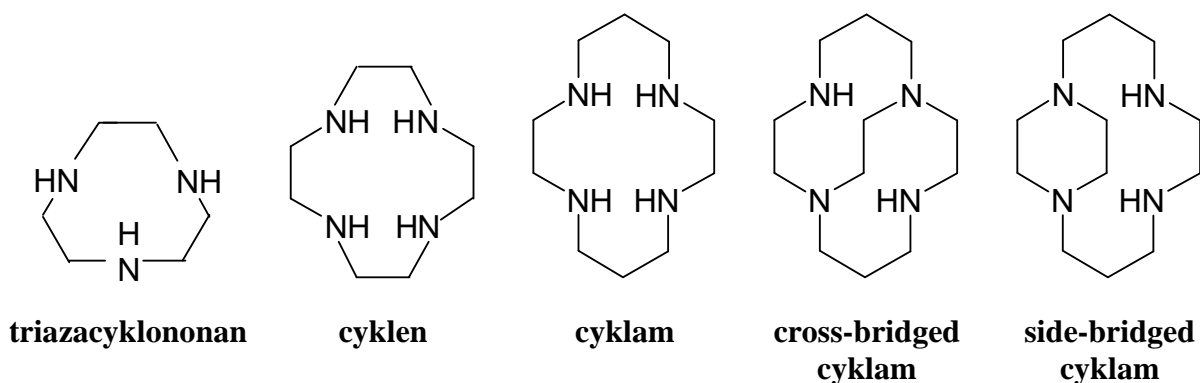
Typickými zástupci jsou 1,4,7-triazacyklononan (TAC N), 1,4,7,10-tetraazacyklododekan (cyklen) a 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan (cyklam), Obr. 1.

Cyklam jako ligand je pro komplexaci mědi jedinečně vhodnější, protože jeho dutina vyhovuje iontovému poloměru (efektivní iontový poloměr Cu^{2+} prokoordinací číslo je 73 pm).^[13] Rentgenostrukturní analýza prokázala, že je mědi natýkation vázán v komplexu čtyřmi ekvivalentními vazbami k atomům dusíku ligandu.^[33]

Vysokou kinetickou inertnost a termodynamickou stabilitou se rovněž vyznačují komplexy derivátů tzv. přemostěného cyklu (cross-bridged cyklam) a side-bridged cyklam, Obr. 1).

Makrocikly bez postranních skupin se vyznačují pomalou komplexací. Přítomnost substituentů (tzv. pendantních ramen) na volných dusíkových cyklových skeletech významně urychlují komplexaci mědi. Postranní pendantní ramena jsou tvořena například acetátovými, fosfonátovými a fosfinátovými deriváty.^[23,25]

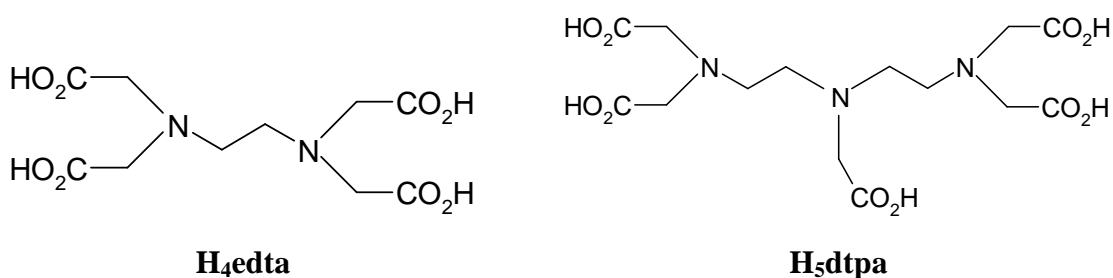
Obrázek 1: Základní polyazamakrocyclické ligandy uvedené v textu



1.3.2 POLYAMINOKARBOXYLÁTY

V popředí zájmu výzkumu byly kromě makrocyclických polyaminokarboxylátů také cyklické polyaminokarboxyláty jako například H_4edta a H_5dtpa (Obr. 2). Jejich komplexace je velmi rychlá, alevzniklý komplex je podstatně méně kineticky inertní než v případě makrocyclických skeletů. Z tohoto důvodu se preferují spíše deriváty makrocyclické.^[27,34]

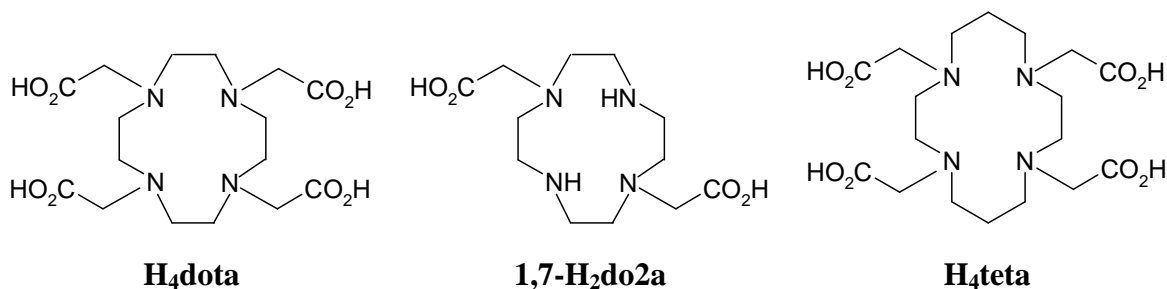
Obrázek 2: Struktury vybraných acyklických polyaminokarboxylátů



Mezivýznamné makrocyclické polyaminokarboxyláty patří H₄dota, H₄teta a 1,7-H₂do2a (Obr. 3). Meďnaté ionty v komplexech s H₄dotamají oktaedrické koordináční okolí. Cyklenový skelet je příliš malý pro planární koordinaci všemi čtyřmi atomy dusíku, proto se v ekvatoriální rovině koordinují dva atomy dusíku a dva karboxylové atomy kyslíku a zbylé dva atomy dusíku obsazují axiální polohy.^[29]

Ligandy odvozené od cyklamunapří. H₄teta – mají větší kavitativní sílu a lepší termodynamickou stabilitu jejich komplexů *in vitro*. Jejich nevýhodou je pomalejší komplexace ve srovnání s acyklickými polyaminokarboxyláty a kinetická labilita komplexu [Cu(teta)]²⁻ *in vivo* způsobená snadnou redukcí a kinetickou labilitou Cu^I komplex. Proto H₄teta ve formě svých bifunkčních derivátů není optimální pro klinické využití. Přesto se velmi často používá, neboť spojuje více vhodných vlastností (levná příprava skeletu, rychlá a poměrně selektivní komplexace, apod.).^[35]

Obrázek 3: Struktury vybraných makrocyclických polyaminokarboxylátů



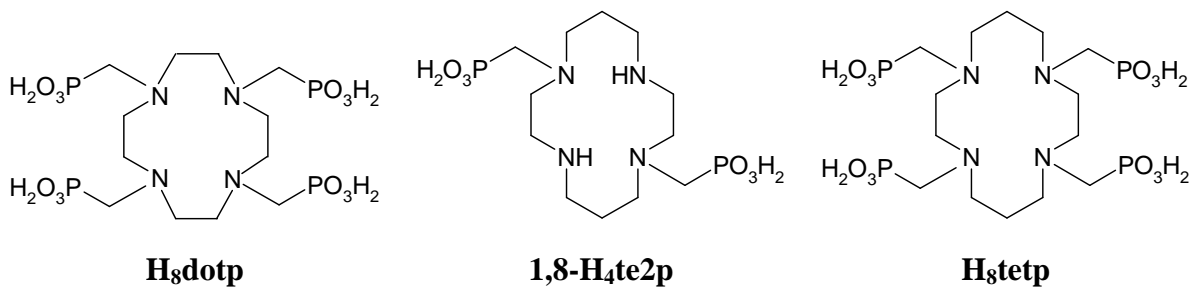
1.3.3 MAKROCYKLICKÉ POLYAMINOFOSFONÁTY

Tato skupina polyazamacyklů nese fosfonovou skupinu a methylfosfonové kyseliny jako pendantní substituenty na atomech dusíku. Ligandy se vyznačují koordináční selektivitou a jejich komplexy vysokou termodynamickou stabilitou.^[36] Komplexy jsou stabilní vůči kyselému hydrolyzu a jsou tak slibnými adreptivy pro využití v radiomedicíně.

Dále se vzhledem k afinitě dimethylfosfonové skupiny k hydroxyapatitu ve zvýšené míře akumulují v kostních tkáních. To by mohlo umožnit diagnostické zobrazování kostí, případně napomoci k léčbě kostních metastáz [37].

Mezi významnými makrocyclickými polyaminofosfonáty patří například H_8dotp , $1,8-H_4te2p$ a H_8tetp (Obr. 4).

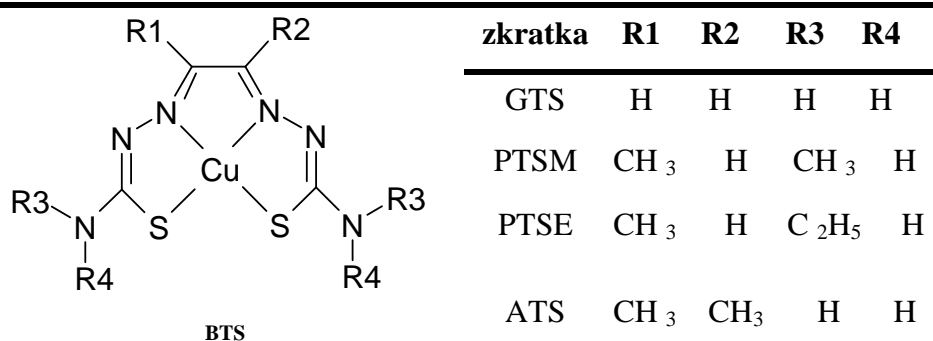
Obrázek 4: Struktury vybraných makrocyclických polyaminofosfonátů



1.3.4 BIS(THIOSEMIKARBAZONY) [23,38]

Bis(thiosemikarbazony) (BTS, Obr. 5) jsou sloučeniny tetradentátne vázající Cu^{II} za vzniku uzavřených čtvercově planárních komplexů s řemi pětičlennými chelátovými kruhy. Vzniklé komplexy jsou termodynamicky ($\log K \sim 17-18$) a kineticky relativně stálé, přesto v porovnání s komplexem makrocyclických ligandů je jejich stabilita mnohem menší. To ovšem v praxi nehraje velkou roli. Biodistribuce radiofarmak závisí hlavně na molekulárních vlastnostech komplexu. Zvládností těchto komplexů je podstatná lipofilita, nízká molekulová hmotnost, vysoká membránová propustnost a nízký redoxní potenciál. Mohou být upravovány alkylací skeletu u terminálních aminů. [39,40] Komplexy se *in vivo* neselektivně vážejí na proteiny (zřejmě albumin u krevního séra), čehož se využívá v radiodiagnostice (sledování krevního oběhu).

Obrázek 5: Příklady různých struktur bis(thiosemikarbazonů) [40]



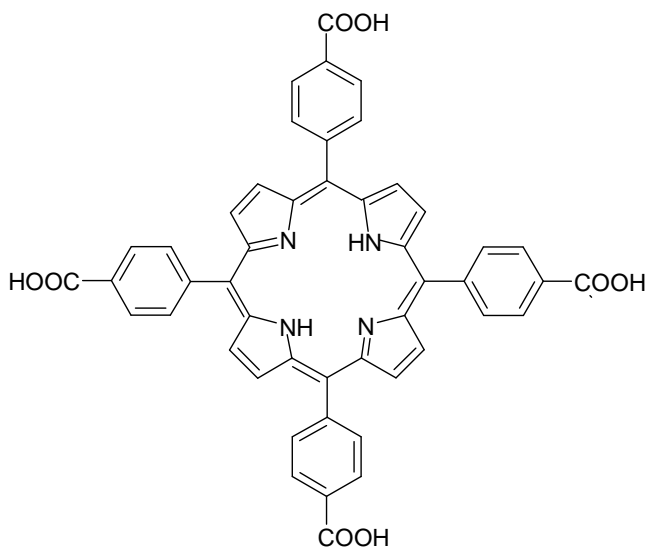
1.3.5 PORFYRINY^[23]

Mezinejnám ějšízástupceporfyrin ůpat řihemyacytochromynacházejícíse v lidském těle.

Mnohéderivátyporfyrin ůse řadímezimolekulyschopnékomplexovatzotopy různýchkov ůaprotospadajímezipotenciálníkomplexa ění činidlasvyžitímvnukleární medicíně.Mohoubýt považoványzavhodnénosi ěradionuklid ům ědidocílovýchtkání. Porfyrinovékomplexysm ědíjsoustáléprotidekomplexaciasnadnoseodnic ěp řipravují derivátynavázánímsubstituent ů,p ředevšímnaaromatickéjádře.Tyto derivátyjsou schopnénavázatsenabílkoviny lidskéhokrevního séra.Zna ěenéporfyrinymajítendenci vázatsenanádorovébu ěňky,p řípadněsekumulovatv tkáních.Tatotentendenceještě ěnebyla zcelaobjasn ěna.

Samotnéporfyrinyseužívajívprotinádorovéfototerapii.Jejichnevýhodap ří použitív radiomedicín ěspo čívávkineticekomplexace,kterájevelmipomalá.T ěnto nedostateksem ůžeeliminovatp řípravouderivát ůsvyššíkomplexa ěnírychlostí. Příklademm ůžebýt karboxylovýderivátnaObr.6.

Obrázek 6: Karboxylový derivát porfyrinu



1.4 TEORETICKÉ POZADÍ A CÍL PRÁCE^[23,41]

V předchozích řádcích teoretického úvodu bylo nastíněno možné využití radioizotopů v diagnostice a léčbě. Z velkých a středních radionuklidů je především zájmem izotopy ^{64}Cu a ^{67}Cu vzhledem k vhodným délкам jejich poločasů rozpadu. Svě využití nachází ve vyšetřování pomocí PET a v diagnostice a terapii rakoviny.

Pro aplikaci radionuklidů v diagnostice a léčbě je velmi důležité, aby tyto izotopy obsahovaly co nejmenší množství nečistot a byly připraveny v čisté formě s vysokou specifickou aktivitou. Jejich výroba spočívá v obohacování cívkami zinkových cívek neutrony v jaderném reaktoru (např. $^{67}\text{Zn}(n,p)^{67}\text{Cu}$), případně odstřelováním neutrony v cyklotronech (např. $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$). Nečistoty, které vždy doprovázejí výsledky z výroby, se mohou oddělit od žádaných izotopů pomocí separačních metod. Velmi efektivní metoda využívá chelatujících pryskyřic obsahujících makrocyclické ligandy. Tyto ligandy tvoří s radioizotopy jediné stálé komplexy a tím je zachycují. Následně se tyto komplexy snadno odbytkem silných kyselin.

Vyčištění izotopů může být prováděno nejčastěji ve formě chloridů nebo jejich hydrátů. Čistě radiofarmaceutické komplexy obsahující Cu^{2+} jsou připravovány pomocí řízení odpovídajícího množství radionuklidu k rozkladu ligandu vysoce selektivním pro komplexaci železa.

Reakce se provádí za pokojové teploty. Komplexace Ni^{2+} do makrocyclických ligandů probíhá obvykle velmi pomalu. Rychlost komplexace Zn^{2+} už je ovšem srovnatelná s Cu^{2+} , proto se užívá pH v rozmezí 3–4. Při této hodnotě pH je Cu^{2+} zcela komplexovaná, ale Zn^{2+} komplexuje ještě (vzhledem k jejich nižší stabilitě) netvoří. K tomu dochází z důvodu postavením železa v Irwingově-Williamsově řadě kovů (mědi se chová jako silná Lewisova kyselina a vytváří nejstabilnější komplexy ze všech kovů v první řadě).

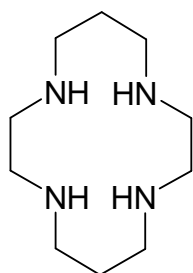
Vzhledem k výše uvedenému má tato bakalářská práce za cíl nalezení postupu přípravy potenciálně vhodného makrocyclického ligandu založeného na 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekanovém skeletu, který je vhodný pro komplexaci dvojmocných kationtů železa. Rozměr centrální kavity makrocyclického ligandu odpovídá poloměru iontu Cu^{2+} a připravený ligand by tedy mohl tvořit stabilní komplexy. Použitím makrocyclického skeletu se předpokládá větší kinetická inertnost díky působení makrocyclického efektu.

Ligand **L** (Obr. 7) byl navržen s jedním, slabě sekoordinujícím, pendantním ramenem, které by mělo zapříčinit rychlení komplexace. Jako pendantní rameno byla zvolena 4-nitrobenzylfosfinová kyselina (**1**), která tak byla použita jako prekurzor k syntéze ligandu **L**. Design tohoto ligandu byl navržen vzhledem k předpokladu, že slabě koordinující seskupiny pendantních ramen urychlují komplexaci, která u makrocyclických ligandů probíhá ve srovnání s acyklickými ligandy pomaleji. V případě, že by komplexy s tímto typem ligandu vykazovaly vhodné kinetické a termodynamické vlastnosti, mohly by nalézt své využití v radiodiagnostice.

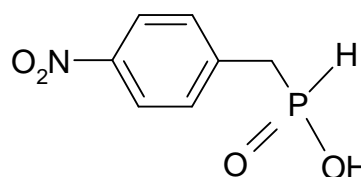
Jako hlavní cíle této práce byly definovány:

Syntéza ligandu a prekurzoru:

- 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan (cyklam, **I**)
- 4-nitrobenzylfosfinová kyselina (NBPIN, **1**)



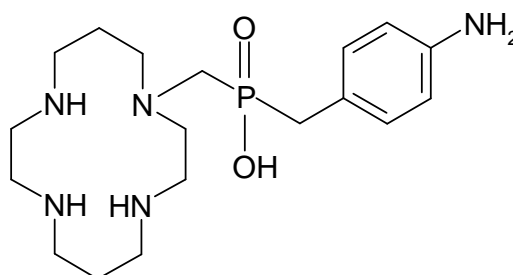
cyklam(I)



nitrobenzylfosfinová kyselina(1)

- Nalezení způsobu přípravy látky **L** (viz Schéma 2 v Experimentální části) tak, aby mohl být do budoucna využit pro syntézu této látky ve větším množství a byl tak umožněn podrobnější zkoumání jejích vlastností.
- Stanovení kinetiky odchránění cyklámového skeletu
- Porovnání bazické kyseliny hydrolyzy esterifikované s pendantem

Obrázek 7: Cílová látka L



(L)

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

2.1.1 CHEMIKÁLIE

argon, 5.6	Linde
bis(3-aminopropyl)-1,2-ethylendiamin(3,2,3-amin)..	Aldrich
benzyl(<i>O</i> -methylsulfonyl)hydroxymethyl(nitrobenzyl)fosfinát	Připraven kolegou Janem Blahutem
bromtrimethylsilan, 98%	Aldrich
fosfornanamonný(<i>rekrytalizovaný z horké vody</i>)	Aldrich
glyoxaltrimer, <i>hydrát</i>	Aldrich
chlorid nikelnatý, <i>hexahydrát</i>	Lachema
hexamethyldisilazan	Fluka
hydroxid draselný, <i>čistý</i>	Penta
hydroxid sodný, <i>čistý</i>	Penta
kyanid draselný	Lachema
kyselina chlorovodíková, <i>36% vodný roztok</i>	Penta
ninhydrin	Lachema
<i>N</i> -ethyl-diisopropylamin	Merck
<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid	Fluka
<i>N,N'</i> -dimethyl-4-aminopyridin	Fluka
<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamid	Aldrich
palladiumnaaktivnímuhlí	Aldrich
paraformaldehyd	Fluka
pentahydrát síranu žďnatého, <i>5% vodný roztok</i>	Lachema
<i>p</i> -nitrobenzylbromid, 97%	Aldrich
RaNi(Raney Nickel)	Lachema
síran sodný, <i>bezvodý</i>	Penta
triethylamin	Fluka
trimethylsilylbromid	Penta
uhlíčitandraselný, <i>bezvodý, žíhaný</i>	Lachema
vodík, 3.0	Linde

2.1.2 POUŽITÁ ROZPOUŠTĚDLA

acetonitril	Penta
acetonitril, suchý(<i>destilacesP₂O₅</i>).....	Penta
amoniak, 25%vodnýroztok	Penta
dichlormethan, suchý(<i>destilacesP₂O₅</i>).....	Lachema
dimethylsulfoxid	Lachema
ethanol, 96%, <i>denaturovaný</i>	LihovarKolín
ethanol, suchý.....	LihovarKolín
ethyltrifluoracetát.....	Fluka
chloroform	Lachema
kyselinaoctová	Penta
methanol.....	Lachema
tetrahydrofuran, suchý(<i>destilacesNa</i>)	Fluka
toluen	Penta
toluen, suchý(<i>destilacesP₂O₅</i>).....	Penta
voda, <i>deionizovaná(získanáreversníosmózou,ROWAPUR200 /100)</i>	P řFUK

2.1.3 POUŽITÁ DEUTEROVANÁ ROZPOUŠTĚDLA

CDCl ₃ , 99,8%	Aldrich
D ₂ O, 99,95%.....	Chemotrade
DMF-d ₇	Chemotrade
DMSO-d ₆ , 99,5%	Chemotrade
NaOD,1 M,(<i>připravenp řidánímsodíkudoD₂O</i>).....	Chemotrade

2.2 METODY CHARAKTERIZACE

2.2.1 NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE (NMR)

Měřeníspekter ¹H, ¹³Ca ³¹PbylorealizovánonaspektrometrechVNMRS300 (rezonančnífrekvence: ¹H299,9MHz, ¹³C75,4MHz a ³¹P121,4MHz)aVarian UNITY INOVA 400(rezonančnífrekvence: ¹H399,9MHz, ¹³C100,6MHz a ³¹P161,9MHz).Tyto přístrojejsoudostupnénaP řFUK.

Uvedené hodnoty chemických posunů δ jsou v jednotkách ppm a interakční konstanty J v jednotkách Hz.

Chemické posuny jsou uváděny s přesností na dvě desetinná místa pro ^1H a jedno desetinné místo pro ^{13}C , ^{19}F a ^{31}P . Interakční konstanty jsou zaokrouhleny na tři platné cifry.

Pro měření byly použity NMR kyvety o tloušťce 5 mm. Druh rozpouštědla je uveden u jednotlivých látek. ^1H NMR spektra byla měřena v čistých deuterovaných rozpouštědlech (CDCl_3 , DMF, DMSO, D_2O , NaOD). Část ^{31}P NMR spekter byla měřena v surové reakční směsi. Některá ^{31}P NMR spektra a všechna ^{13}C NMR spektra byla naměřena s „decouplingem“ vodíkových jader. Teplota měření byla 25°C , není-li uvedeno jinak.

Chemické posuny v ^1H a ^{13}C NMR spektra byly referencovány na interní standardy: TMS pro měření v CDCl_3 ($\delta_{\text{H}}=0,00$, $\delta_{\text{C}}=0,00$), $t\text{-BuOH}$ pro měření v D_2O ($\delta_{\text{H}}=1,25$, $\delta_{\text{C}}=29,13$). Pro měření ^{31}P spekter byl jako externí standard použit 85% roztok H_3PO_4 v D_2O ($\delta_{\text{P}}=0,00$).

Zkratky pro multiplicitu signálů v NMR spektra jsou: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), p (pentet), sp (septet), m (multiplet).

2.2.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)

Hmotnostní spektra byla naměřena na hmotnostní spektrometru Bruker ESQUIRE 3000. Přístroj je vybaven iontovou pastí a umožňuje ionizační elektrosprej (MS-ESI). Vzor byly rozpuštěny v příslušném rozpouštědle a naředěny mobilní fází (MeCN, MeOH). Spektra byla měřena v kladném, ale také v negativním módu.

U charakterizace jednotlivých látek jsou uvedeny pouze signály, které se podařilo interpretovat.

2.2.3 TENKOVSTVÁ CHROMATOGRAFIE (TLC)

Přítentkovstvé chromatografii byly použity destičky typu Silufol[®] širokopórezní silikagelmannesený na hliníkové fólii (Kavalier) se škrobem jako pojivem. Příslušné mobilní fáze jsou uváděny u jednotlivých látek.

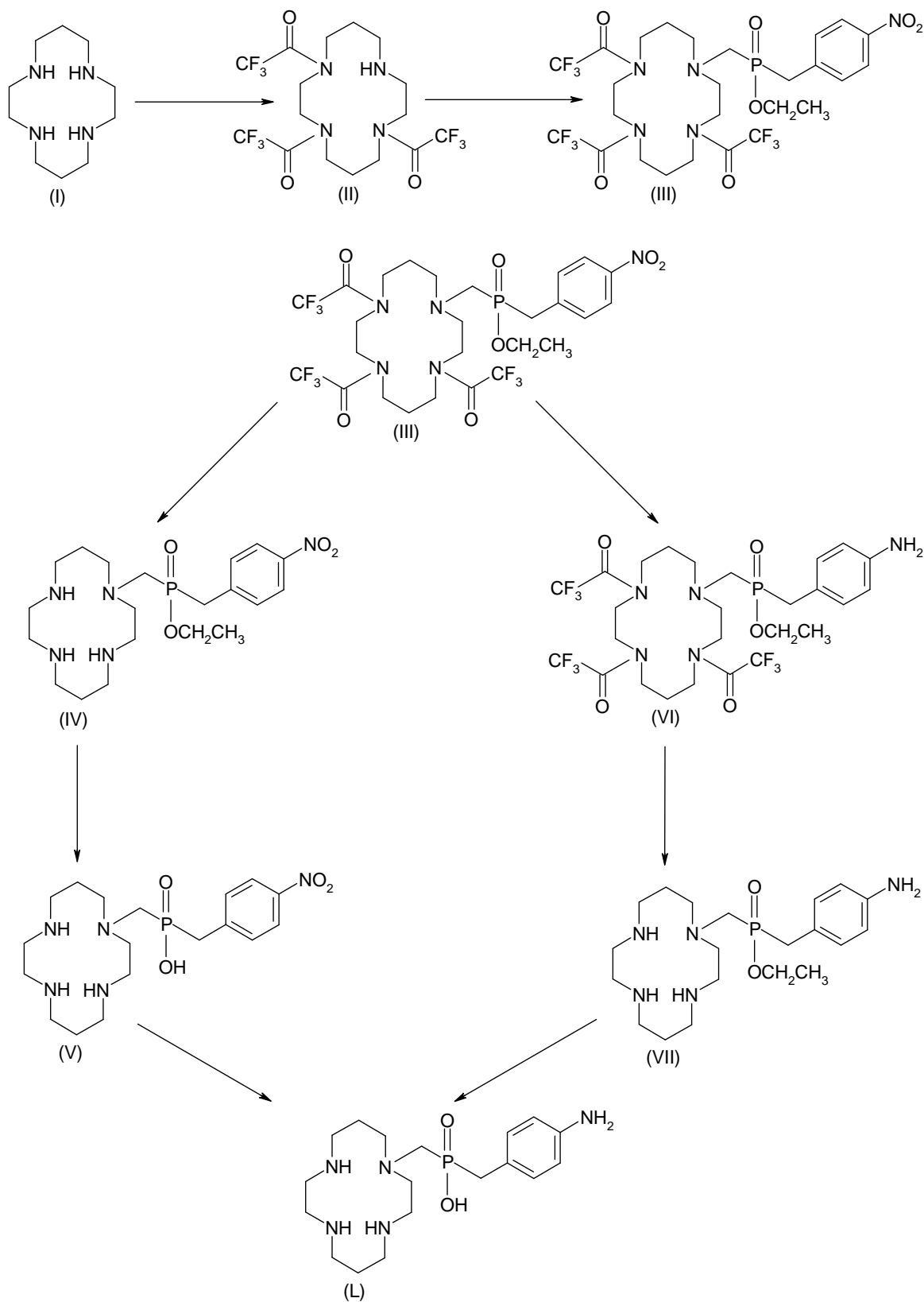
Detekce byla provedena 0,5% roztokem ninhydrinu ve 2-propanol nebo $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5% vodný roztok) následným zahřátím. Hodnoty R_f jsou uváděny na jedné desetině místa.

2.2.4 RENTGENOVÁ STRUKTURNÍ ANALÝZA

Difrakce byla naměřena na přístroji NONIUS KAPPA CCD. Jako zdroj záření byla použita molybdenová lampa ($K_\alpha = 0,71073 \text{ nm}$). Vzor byl naměřen při teplotě 150 K. Krystalové struktury byly vyřešeny RNDr. Ivanou Císarovou, CSc. a vyřešeny školitelem doc. RNDr. Janem Kotkem, PhD.

2.3 SYNTÉZA

Schéma 2: Navržený postup přípravy látky L



V textu uvedeném níže se pod pojmem „odpařování RVO“ rozumí odpařování rotační vakuové odparce. Teplota závislostina odpařování rozpouštědla (viz následující řehled). Dále pod pojmem „amoniak (NH₃)“ je míněn jeho 25% vodný roztok a pod pojmem „kyselina chlorovodíková (HCl)“ je míněn její 36% vodný roztok.

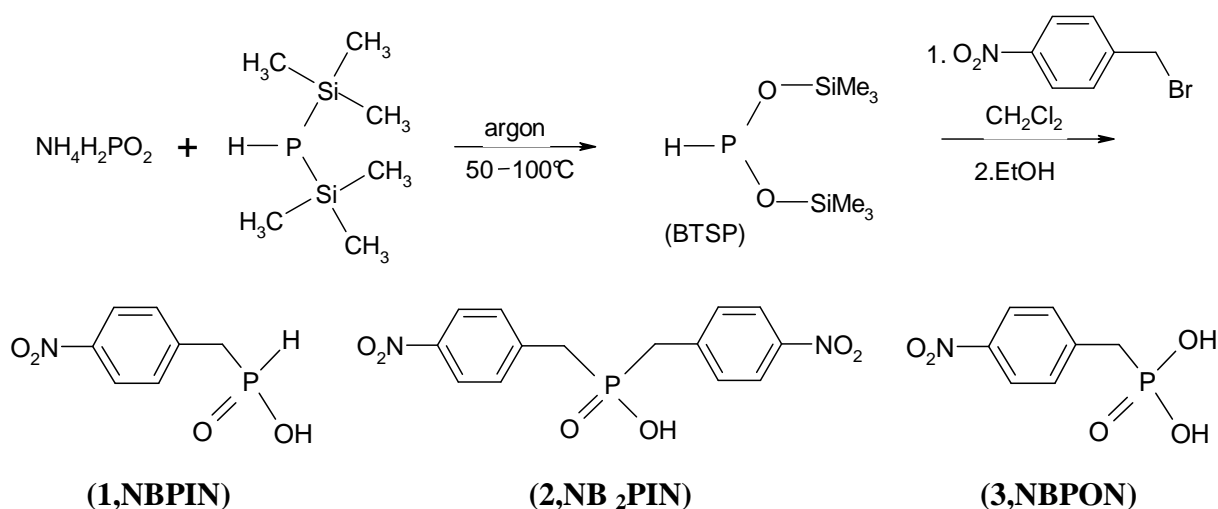
Orientační teplota závislostina odpařování rozpouštědla:

EtOH.....45°C
 Směsi obsahující vodu.....60°C
 Ostatní použité rozpouštědla.....50–55°C

Pod pojmem „teplota“ je míněna teplota olejové lázně, ve které by byly ponořeny baňky reakční směsí.

2.3.1 PŘÍPRAVA FOSFOROVÝCH PREKURZORŮ

SYNTÉZA LÁTKY 1 (4-NITROBENZYL FOSFINOVÁ KYSELINA, NBPIN)^[42]



Do 500 ml trojhrdlébaňky bylo naváženo 10,0 g (120 mmol) rekrystalizované hořčičné fosforanuamonného. Baňka byla opatřena zaváděcí trubicí kouskem houtem (spojena s řívadem argonu), chladičem, a který byl nasazen další trubicí kouskem houtem (napojen na membránovou vývěšovou sloužící jako zdroj vakua) a zátkou, která plnila funkci ventilu pro řízení. Dále bylo přídáno magnetické míchadlo. Aparatura byla říkrát evakuována a následně naplněna argonem.

Poprovedené sekuraciby lazavád ěcitrubi ěkanachladi ěivym ěněnazabubla ěku
snujolemazátkazagumovéseptum. Tytoúkonybyly provedenyvsilnémprotiproudu
argonu. Reakcemusíprobíhatvinertníatmosfé ěe, nebo ějakbis(trimethylsilyloxy)fosfin
(BTSP), taksilylesteryfosfinovýchkyselinjsouve ělicecitlivěnavlhkostaoxidaci.

Přesseptumbylopomocíinjek ěníst ěříkaěkysjehloup řídáno50,0m L(237mmol)
hexamethylsilazanu(HMDS). Proudargonubylnasta ventak, abybubla ěkouprocházela
cca1bublinkaza2s. Reak ěnísm ěšbylazastálěhomíhánízah řívánap řesnocvolejové
láznioteplot ě105–110°C.

Poukon ěeníreakcebylzesílenproudargonuaceláaparatur abyľavyjmuta
zolejovélázni ěaponechánavychladnoutnalaboratorníteplotu. Přesseptumbyloinjek ění
stříkaěkoup řídánokreak ěnísm ěši100m LvysušeněhoDCM. Obsahba ěňkybyľvychlazen
vlázni zesm ěšietanoluasuchěholeduna–40°C. Zastálěhoch lazeníbyľp řesseptum
přídánroztok11,8g(55mmol)4-nitrobenzylbromidu(NBB)v200m LsuchěhoDCM.
Bylonutněbát, abyvinjek ěníst ěříkaěce, jížbyľroztokp řídáván, nebyľažádnávzduchová
bublina. Pop řídáníveškerěhoroztokubylachladíćiláze ěňzvolnaoh řátanalaboratorní
teplotu. Reak ěnísm ěšbyľamíhánadalších12hodinpodmírnýmproudem argonu.

BTSPjemožněalkylovatdodvoustup ěňů, takžemimožádaněhoproduktu **1**(4-
nitrobenzylfosfinovákyselina, NBPIN)vznikávpr ůběhureakcetakěbis(4-nitrobenzyl)-
fosfinovákyselina(**2**, NB₂PIN). Jejívznikbyľomezepoužitím dvojnásobného nadbytku
BTSPoproti4-nitrobenzylbromidu(NBB). Vp řítomnostioxida ěních ěinidel(kyslíku)
můžedocházetkoxidacifosfinovéskupinyzavzniku4 -nitrobenzylfosfonovékyseliny
(**3**, NBPON).

Dalšíděnbyľproudargonuzna ěnězesílenareak ěnísm ěšbyľap řevedenapomocí
kanyľdokáďinky obsahujícíći250m Lethanolu. Zbytekroztokubylzp ůvodníreak ění
baňkyvymyťdalšímicca50m LEtOH. Ob ěetanolovéfrakcebyľyspojenyavzniklá
suspenzebyľaodpa řenadosuchanaRVOvp ředemzváženě500m Lkulatěba ěňce. Źlutý
odparekbyľrozpuš ěňve400m Lvroucívody(50–100m Lvodyna5,0gproduktu).
Většínaproductuserozpustila, malěmnožstvív ůstalonerozpuš ěňě, jednalosehľavn ě
odisubstituovanouslou ěěeninu **2**. Roztokbyľzahorkazfiltrovánnap ředehřátěfrit ěS2do
1Lkulatěba ěňky. Poochlazenífiltrátubyla o ěěkávánakrystalizace4-nitrobenzylfosfinové
kyseliny (**1**). Kěoovšemnedošlo. Filtrátbyľp řevedendo1 Ld ělicínáľevkyabyľop řídáno
20m LkoncentrovaněHCl a200m Lchloroformu. Pod ůkladnémprot řepáníbyľaodd ěľena
vodnáaorganickáfáze. Organickáfázebyľaodpuš ěňnauchovánavErlenmeyerov ě
baňce. Vodnáfázebyľadosuchaodpa řenanaRVO.

Kodparkubylop řídáno100m L10% HCl a100m L chloroformuasm šbylad ůkladně zamíchána. Taktoby laponechánastátp řesvíkend.

Vykrytalizovaná4-nitrobenzylfosfinovákysečina (1)bylaodfiltrovánaafrit šS2, promytamalýmnožstvímstudenévodyapod ůkladněmprosátívzduchemdosušenave vakuovémexsikátorunadP₂O₅.

Vorganickéfázisepodvoudnechvylou čilabílásraženina.Podle ³¹P NMR spektra sejednalootém š čistýprodukt 1(90% čistota).Sraženinaby lap řefiltrovánaafrit šS3a rekrystalizovánazhorkévody.

Výtěžek(4-nitrobenzylfosfinovákysečina)=3,9go čistotě98%,ne čistota:NBPON(2%); 1,2go čistotě90%,ne čistoty:NBPON(4%),fosforitákysečina(3%)afosforečná kysečina(2%)

Charakterizace:

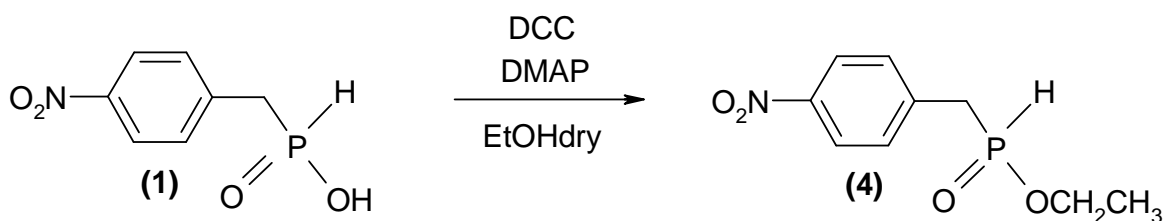
¹H-NMR(NaOD) : δ2,9–3,1(m,vícesignálukv ůli částečným šnězaD); 6,97(d,PH, ¹J_{PH}=523);7,42(d,2H, J=8,4);8,18(d,2H,arom, ³J_{HH}=8.4)

¹³C{¹H}-NMR(DMSO) : δ40,0(d, ¹J_{PC}=107);123,6(2C,arom);130,2 (d,2C,arom, ³J_{PC}=7,4)

³¹P{¹H}-NMR(NaOD) : δ24,8(s)

³¹P-NMR(NaOD) : δ24,7(d; ¹J_{PH}=523)

PŘÍPRAVA ETHYLESTERU KYSELINY NITROBENZYLFOSFINOVÉ



ZískanáNBPIN (1)bylanáslednoureakcí řevedenanasv ůjethylester (4).Do baňkyoobjemu250m Lbylonaváženo3,7gNBPIN(15mmol),spolus3,7g DCC(1,2 ekvivalentu,18mmol)a30mg(0,05ekvivalentu,0,2mmol)DMAPve100m Lsuchého EtOH.Reak čnísm šbylamíchánap řesnoc.

Vba űcevzniklasuspenžežlutéhokapalínysbílousražen inou.Tabylazfiltrována nafrit šS3, částbylaodebránadovialkyarozpušt ěnavCHCl₃.

Tatovialkabylaponechánavgigesto ři,dokudseneodpa řilveřkerýCHCl₃. Následněbylvzorekrozpuřt ěnvCDCl₃abylp řipravenvzorekna ¹Ha ³¹PNMR.Tato látkabylaposlézeidentifikovánaajakovedlejšíprou duktu *N,N'*-dicyklohexylmočovina (DCU).

Přefiltrovanýroztokbylodpa řennaRVOdosucha,odparekop ětrozpuřt ěnvEtOH anáslednějeřt ějednoup řefiltrovanáafrit ěř3.Dokyvetybylodebránvzorekna ³¹P NMR.Potěbylobsařba řňkznovuodpa řennaRVO.Produktbylveform ěřevné,sv ětle řlutě,látky.

Charakterizace:

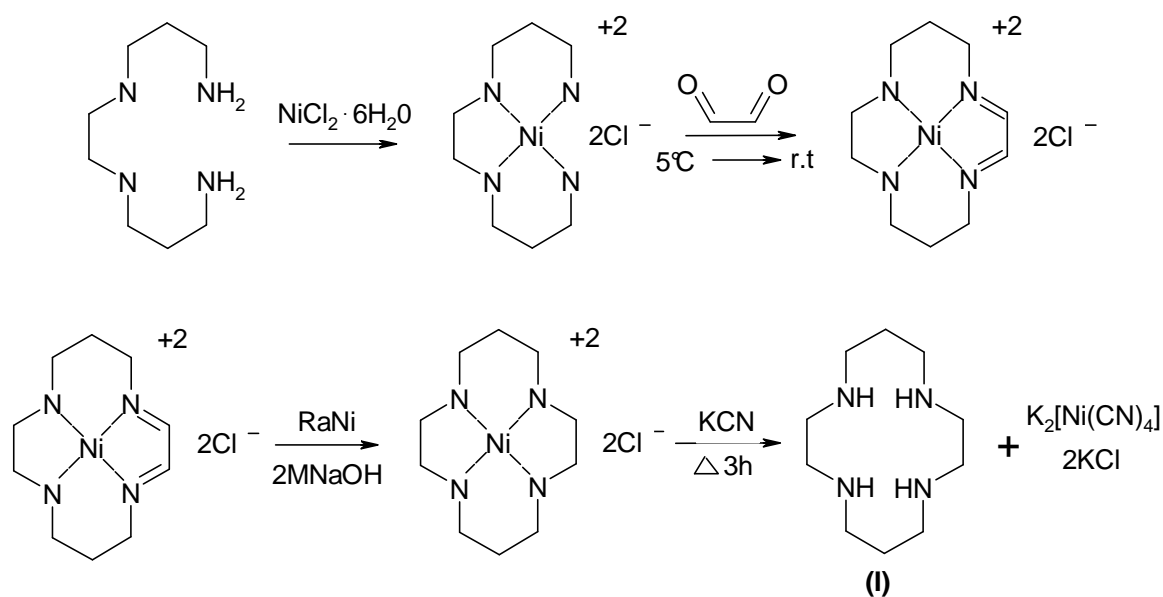
Čistota(ethylester4-nitrobenzylfosfinověkyseliny)dle ³¹PNMR=91%,ne čistoty:

NBPIN(7%)astopyNB₂PIN(2%)

³¹P{¹H}-NMR(EtOH) : δ35,1(s)

³¹P-NMR(EtOH) : δ35,1(dsp, ¹J_{PH}=559; ²J_{PH}~ ³J_{PH}~9,4)

2.3.2 PŘÍPRAVA CYKLAMU^[43,44]



Dokádinkyobjemu2 lbylop řidáno20,0g(110mmol)bis(3-aminopropyl)-1,2-ethylendiaminu(3,2,3-amin),kterýbylnásledněrozpuřt ěnv500m ldestilovaněvody.Za stálěhomícháněbylop řidáno27,3gNiCl₂·6H₂O(110mmol).Kádinkasintenzivněřialov ěřzabarvenýmroztokembylapono řenadoledovět řiřtěřchlazenanateplotuniřřineř5°C.

Dále bylo smícháno 12,0 g trimeru glyoxalhydrátu (5,7 mmol) se 120 mL destilované vody. Vzniklá suspenze byla zahřívána na 65 °C a smíchána do úplného rozpuštění.

K chlazenému roztoku nikelnatého komplexu byl přidáván (Pasteurovou pipetou) připravený horký roztok monomerního glyoxalu. Tato směs byla následně smíchána přes noc při laboratorní teplotě.

Následující den bylo reakční směsí přidáno 500 mL vodného roztoku NaOH (2 M). Ktaková připravená směs byla zastavena intenzivním mícháním po částech 25,0 g Raneyova niklu (RaNi), při čemž byl pozorován vývoj vodíku. Vzniklá suspenze byla smíchána přes noc při laboratorní teplotě.

Následoval dlouhá filtrace přes vlhkou papírovou kašičku (připravena rozmícháním kousků filtračního papíru v destilované vodě) na fritě S3. K filtrátu, získanému v předchozím kroku, bylo přidáno 50,0 g KCN (770 mmol). Roztok byl převeden do 2 L baňky s kulatým dnem a refluxován po dobu 3 hodin pod zpětným chladičem. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl vzniklý cyklam extrahován chloroformem (1 L). Extrakt byl vysušen bezvodým Na₂SO₄, přefiltrován na fritě S3 a zahuštěn na RV o natokový objem, aby právě docházelo ke krystalizaci produktu. Zahuštěný produkt byl ředitel velkým nadbytkem MeCN (trojnásobek objemu suspenze). Vzniklý produkt byl odsátna fritě S3, promyt MeCN a sušen proudem vzduchu po dobu 1 hodiny. Bílý prášek byl přes noc dosušen ve vakuovaném exsikatoru nad KOH.

Další část produktu byla získána opařením matečnicí dlouhán následnou rekrytalizací z vroucího MeCN.

Výtěžek (cyklam) = 5,9 g, 25%

Charakterizace:

TLC: fialová skvrna; $R_f=0$ ve všech amoniakálních mobilních fázích, $R_f=0,5$ v soustavě EtOH:CH₃COOH:H₂O (6:1:8)

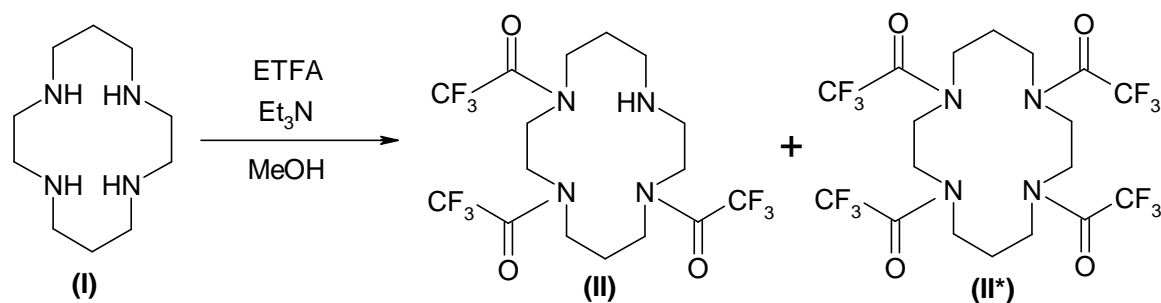
MS(+) : 200,8 ([M+H]⁺, teor. 201,2)

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,71 (p, ³J_{HH}=5,1; 4H, CH₂-CH₂-CH₂);

2,69 (t, ³J_{HH}=5,1; 8H, N-CH₂-CH₂-CH₂); 2,71 (s, 8H, N-CH₂-CH₂-N)

¹³C{¹H}-NMR (CDCl₃): δ 32,2 (2C, CH₂-CH₂-CH₂); 48,3 (4C, N-CH₂-CH₂-CH₂); 48,6 (4C, N-CH₂-CH₂-N)

2.3.3 OCHRÁNĚNÍ CYKLAMOVÉHO SKELETU^[45]



Doinjek čníst říkačkybylonabráno 2,4m l (20mmol, 4ekvivalenty) ETFA, která bylavpr ůběhu 5minutp řídánapokapkáchdomíchajícíesm ěsi 1,0gcyklamu (5mmol) a 0,7m l Et₃N (1ekvivalent, 5mmol) ve 4,0m l MeOH ve 25m l baňce. P řítétoprocedu ře postačovalopouzechlazenívevodnílázni, reakcenenívý razněexotermická. Sm ěšbyla míchánap řesnoc (dleliteratury ^[45]) kreakciposta číp ěthodin).

Následněbylasm ěšodpa řenana RVO dosucha apr ůhlednásirupovitálátka byla rozpuštěnavminimuethylacetátu. Sm ěšbylap řečištěnasloupcovouchromatografiíp řes sloupec SiO₂. Ponanesenílátkybylsloupecproplachovánethyla cetátetemp řibližnědo polovinyobjemu 100m l baňky. Potěbylroztokodpa řenna RVO akolonabyla ještě jednoupropláchnuta obdobnýchzp ůsobemdostejnéba ňky. Částbylaodebránajako vzorekproMSa obsahba ňkybylop ětodpa řenna RVO dosucha.

Výtěžek^[n]: cca 90%

Charakterizace:

MS(+) : 511,0 ([M+Na]⁺, teor. 511,1)

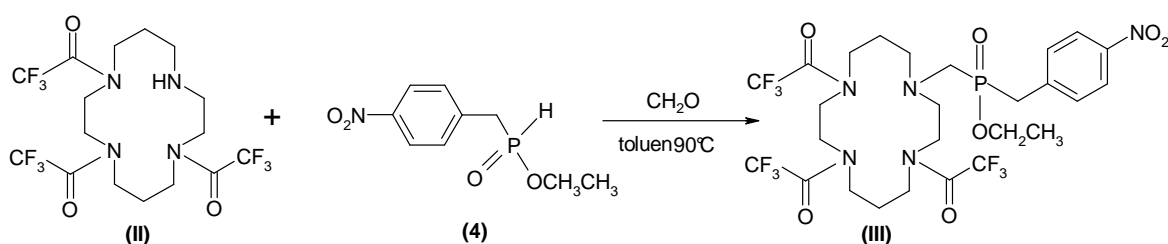
¹H-NMR (CDCl₃)^[n]: (300MHz): δ 3,85-3,25 (m, 12H); 2,90-2,80 (m, 2H);

2,74-2,50 (m, 2H); 2,30-1,90 (m, 2H); 1,85-1,63 (m, 2H); 1,25-0,60 (m, 1H)

¹⁹F-NMR (DMF-d₇)^[n]: (282,4MHz, 120°C): δ 7,5 (s); 6,9 (s); 6,6 (s)

2.3.4 POKUSY O NAVÁZÁNÍ FOSFOROVÉHO PENDANTU

MANNICHOVA REAKCE S ETHYLESTEREM NBPIN



Látka **II** z předchozí reakce byla rozpuštěna v 30 ml toluenu. Ethylester NBPIN (**4**) připravený v předchozích krocích (2.3.1) byl dopařen na RVO dosucha a smíchán s chráňným cyklem v toluenu. Za účelem minimalizace obsahu vody v toluenu byla směs ředitelů Dean-Starkovy pasty (Dean-Stark Trap) a zahřívána na 35°C. Tento postup ovšem nebyl vhodný, směs bouřlivě vypěnila ještě před dosažením požadované teploty.

Obsah pasty byl převeden do 100 ml lbaňky a směs byla zahřívána na 90°C. V průběhu hodiny bylo zastáleno míchání řidáno 0,6 g paraformaldehydu (1,3 ekvivalentu, 20 mmol). Poté byla reakční směs míchána přes víkend a dále zahřívána na 90°C.

Vbaňce se reakce rozděly do fáze. V spodní části baňky se vyskytoval sytě oranžový olej nerozpustný v CHCl₃ a nad ním žlutý toluenový roztok. Navíc v spodní olejové fázi vykrystalizovaly bílé jehlice, které byly rozpustné v DMSO. Část byla odebrána nastavením pomocí MS. Jednalo se o čtyřikrát substituovaný cyklám (**II***). Směs byla ještě jednou zahřívána, k homogenizaci nedošlo. Toluenová fáze byla odpařena na RVO dosucha a olejová fáze byla rozpuštěna v EtOH. Byl odebrán vzorek na ³¹P NMR a MS.

Směs byla rozdělena na frakce, které byly využity v následných reakcích (viz kapitola „Postupné odštěpení chránicích skupin a syntéza cílové látky L“).

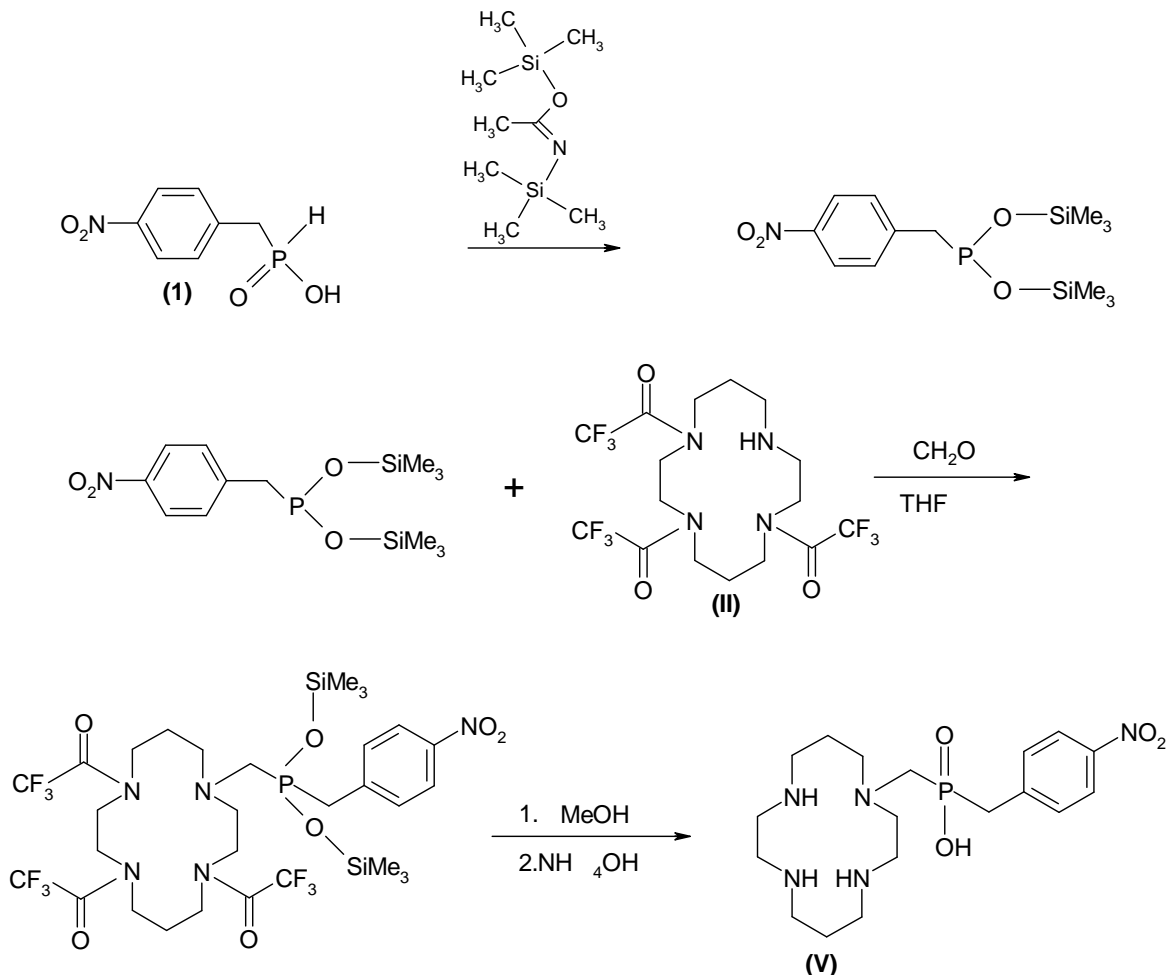
Charakterizace:

MS(+) : 752,3 ([M+Na]⁺, teor. 752,2)

MS(+) pro čtyřikrát trifluoracetylem substituovaný cyklám: 607,2 ([M+Na]⁺, teor. 607,1)

$^{31}\text{P-NMR}(\text{EtOH})$: δ 47,2-49,3 (n ěkolikpík ů, patrnr ěr ůzněkonformeryvd ůsledkurigidity acylovaněhomakrocyklu, souhrnrněaintenzita~30%), jakodalšlělětkybylyidentifikověny ethylhydroxomethyl(nitrobenzyl)fosfinět(s,40,7, 45%),nitrobenzylfosfinověkyselina(d, 23,9, $^1J_{\text{PH}}=532,15\%$),nitrobenzylfosfonověkyselina(t,19, 1, $^2J_{\text{PH}}=21,10\%$).

MANNICHOVA REAKCE S TRIMETHYLSIYLESTEREM NBPIN GENEROVĀNĚM POMOCĪ BSA



Dotrojhrdlěba űkybylonavěženo3,0g(3ekvivalenty,12mmol)NBP IN (1). Baűkabylaopat řenazavěd ěcětrubi ěkouskohoutem(spojenasp řěvodemargonu), chladiěm,nakterybylanasazenadalšětrubi ěkaskohoutem(napojenanamembrěnovou věvěvsloužěcějako zdrojvakua)azětkou, kterěplnil ěafunkciventilup řěsekuraci.Děle bylop řěděnomagnetickěměchadlo.Aparaturabylat řěkrětevakuvěněaaněsledn ěnapln ěna argonem.Poprovedeněsekuracibylazavěd ěcětrubi ěkanachladi ěcěym ěněnazabubla ěku snujolemazětkazagumověseptum.

Potěbylop řěděno10,8m LBSA(3ekvivalenty,44mmol)pomocěěnjek ěcěně stěřěkaěky.Tytoůkonybylyprovedenyvsilněmprotěproudu ěargonu.

Látka II byla rozpuštěna v suchém THF. Pomocí injekce byla převedena do baňky reakční s směsí NBPINaBSA. Dále bylo řízeno proudem argonu 1,8 g paraformaldehydu (4 ekvivalenty, 60 mmol). Reakční směs byla míchána dvadny.

Přítel syntéze byla testována oxidací hydrolytická stabilita směsi. Vzorek byl odebrán do NMRky v etylénu argonem, která byla ponechána otevřená přes noc. Změny v směsi byly sledovány pomocí ^{31}P NMR spekter.

Po 2 dnech bylo do směsi řízeno 10 mL MeOH, pomalu, za intenzivního míchání se zvýšeným proudem argonu. Směs byla odpařena na polovinu objemu následně byl odebrán vzorek na ^{31}P NMR a MS.

Charakterizace:

V MS spektru se vyskytoval signál chráněného cyklamubeznavázaného fosforového pendantu. Signál MS(+): 200,8 ([M+H]⁺, teor. 201,2). Pík odpovídající chráněnému cyklámus jedním fosforovým pendantem (729,2) se v spektru vyskytoval.

V NMR spektru po hydrolyze MeOH zmizel pík v oblasti 150 ppm. Což značí, že došlo k hydrolyze nebo směs zreagovala s paraformaldehydem. V spektru se vyskytovaly signály mnoha látek, v směsi se řevažoval NBPON jako produkt oxidace.

Spektrální test stability

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (MeOH) : δ 152,5 (s); po smíchání NBPINaBSA

^{31}P -NMR (MeOH) : δ 151,2 (t; $^2J_{\text{PH}} = 14,3$)

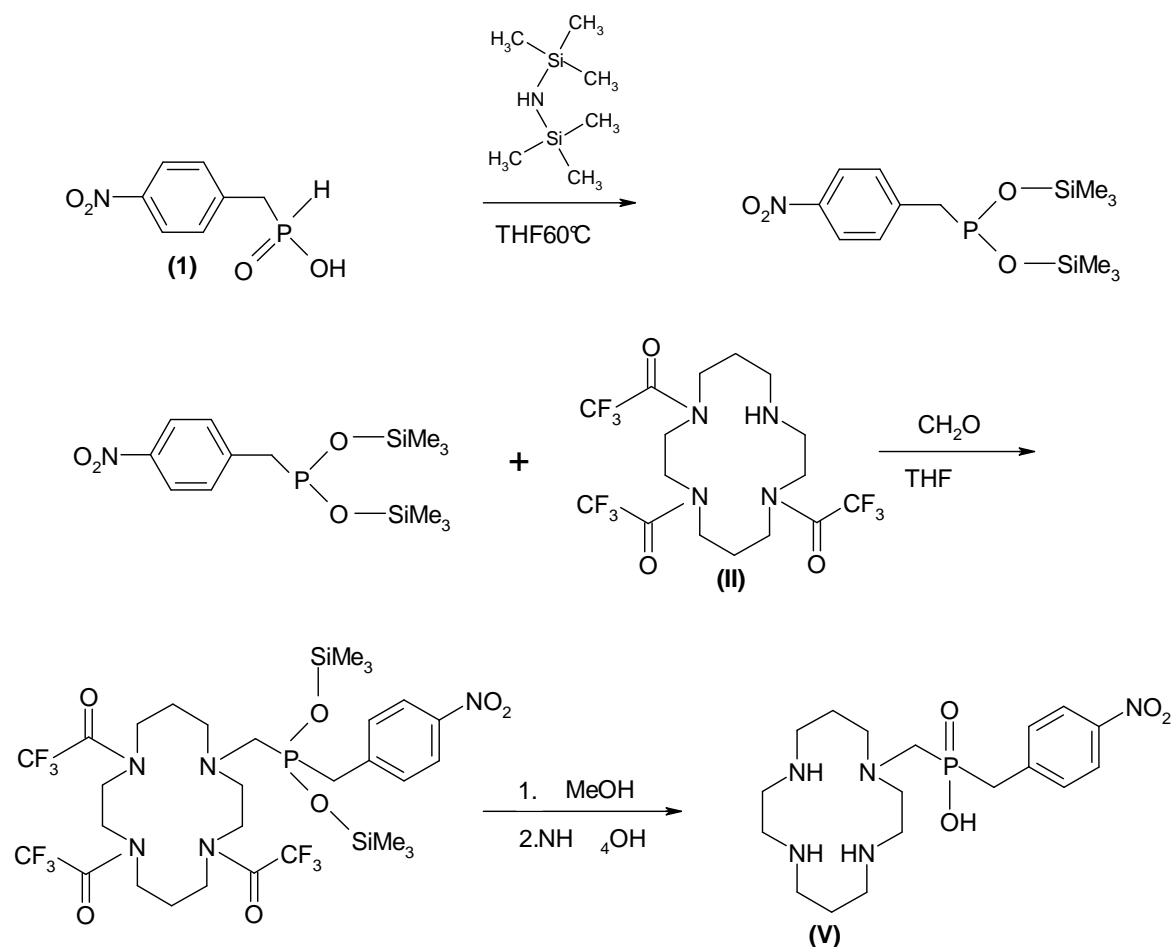
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (MeOH) : δ 148,9 (s); po několika hodinovém stání v navzdruhu květě

^{31}P -NMR (MeOH) : δ 148,9 (t; $^2J_{\text{PH}} = 14,3$)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (MeOH) : δ 148,9 (s); po řízení makrocylu

^{31}P -NMR (MeOH) : δ 148,9 (t; $^2J_{\text{PH}} = 14,8$)

MANNICHOVA REAKCE S TRIMETHYLSILESTEREM NBPIN GENEROVANÝM POMOCÍ HMDS



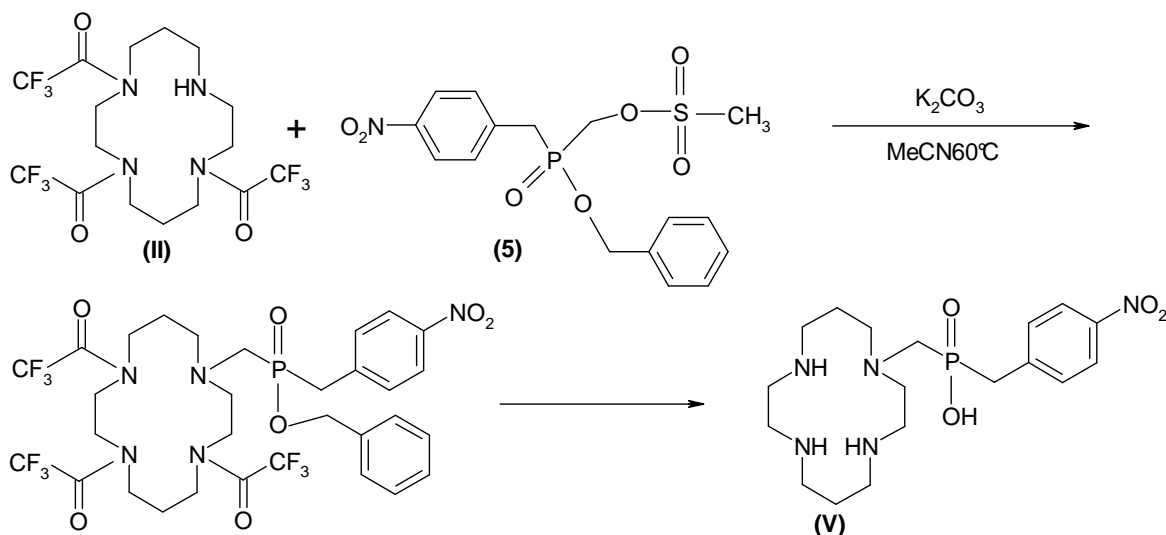
Dotrojhrdlébaňkybylonaváženo0,5glátky **1**(2mmol).Baňkabylaopatřena zaváděcítrubičkouskohoutem(spojenaspřívodemargonu),chladičem,nakterýbylanasadenadalšítrubičkaskohoutem(napojenanamembránouvývěvusloužícíjakozdroj vakua)azátkou,ktéráplnilafunkciventilupřisekuraci.Dálebyloprídánomagnetické míchadlo.Aparaturabylatřikrátévakuovánaanásledněnaplněnaargonem.Poprovedené sekuracibylazaváděcítrubičkanachladičivyměněnazabublačkusnujolemazátkazagumovéseptum.Potébyloprídánoinjekčnístříkačkou5mLsuchéhoTHF.Dálebyloprídáno 1 mLHMDS(2ekvivalenty,5mmol).Směšbylazahřívánana60°Camíchánapřes víkend.

Zvýšenýproudargonuzbavilsměšveškeréhorzpuštědlaavbaňcezústalapouze hnědásraženina.Bylotedypřídánodalších10mLsuchéhoTHF.Směšbylaovšemstále heterogenní.Popřídavku2mLHMDS(4ekvivalenty,10mmol)sesraženinarozpustilaa byloodebráno0,5mL vzorkuna ³¹P NMR.

Charakterizace:

V NMR spektrusenacházelo mnoho signálů úřůžných látek. Nadmimo markantně převažoval signál fosfonátu. Vzhledem k tomu, že by se jednalo o reakční směs řířávacího cyklu.

ALKYLACE S MESYLOVÝM ESTEREM HYDROXOMETHYLOVÝCH DERIVÁTŮ NBPIN



Do 100 mL baňky bylo přidáno 0,2 g látky II (0,5 mmol) v 5 mL suchého MeCN. Dále bylo přidáno dalších 15 mL suchého MeCN. Do této směsi bylo vsypáno 0,6 g látky 5 (1,25 ekvivalentu, 1,5 mmol).

Poté bylo odebráno vzorek na ^{31}P NMR, který sloužil jako standard pro vývoj reakce. K roztoku bylo přidáno 1,0 g vyžehnaného bezvodého K_2SO_4 následně byla suspenze míchána a zahřívána na $60^\circ C$ do druhého dne. Při zahřívání směsi byla nabíjena sazenka nezapojených vodičů.

Následující den bylo odebráno vzorek na ^{31}P NMR. Po naměření spektra bylo patrné, že zůstala nedošlo reakci, proto že spektrum bylo shodné s počátečním spektrem.

Následně bylo přidáno asi 10 mL diisopropylethylaminu a suspenze byla míchána a zahřívána na $60^\circ C$ přes víkend.

Směs byla poté odpařena na RVO, vbaňce byly hrudky potaš. Ty byly celkem třikrát extrahovány ethylacetátem. Ethylacetátový extrakt byl odpařena na RVO do sucha. Odpařky byly rozpuštěny v $CHCl_3$. Část směsi byla odebrána do vialky, která byla ponechána vyschnout. Následně byl vzorek rozpuštěn v $CDCl_3$ a byl naměřeno 1H a ^{31}P spektrum.

Charakterizace:

srovnávací spektrum ředreakcí (látko 5)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR(EtOH) : δ 43,2(s,100%)

spektrum pozah řívání reak čním šis K_2CO_3 jakobáží

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR(EtOH) : δ 43,1(s,100%)

spektrum pozah řívání reak čním šis diisopropylethylaminem jakobáží

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR(EtOH) : δ 22,9(s,92%); -8.8(s,8%)

Vzorek v CDCl_3 : v ^{31}P NMR spektru se nevyskytoval signál fosforu, ani v ^1H NMR

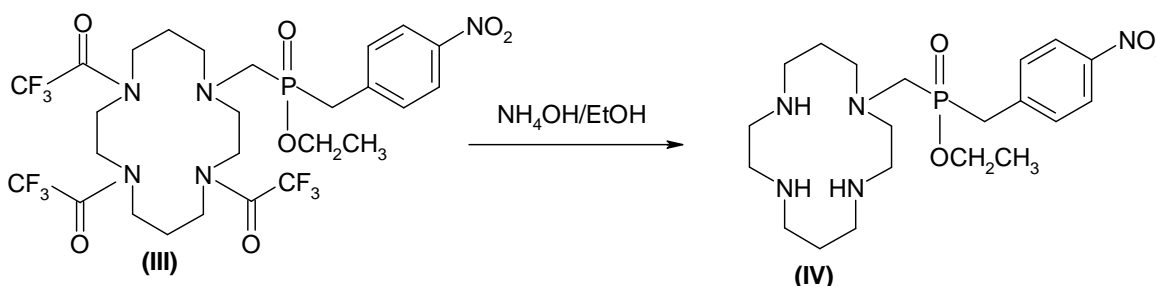
spektru nebyly přítomny signály příslušející aromatickým vodíkům. Fosfor byl hledán

v hrudkách potaše. Ty byly rozpuštěny v H_2O a bylo odebráno vzorek na ^{31}P NMR.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR(H_2O): δ 29,6(s); spektrum zhrudky potaše rozpuštěných v H_2O , posunem neodpovídá esteru bis(alkyl)fosfinové kyseliny.

2.3.5 POSTUPNÉ ODŠTĚPENÍ CHRÁNICÍCH SKUPIN A SYNTÉZA CÍLOVÉ LÁTKY L

ODCHRÁNĚNÍ CYKLAMOVÉHO SKELETU A NÁSLEDNÁ HYDROLÝZA ETHYLESTERU



Surová látka **III** byla rozpuštěna ve 30 mL EtOH a posléze byla poridána 20 mL NH_3 . Směs byla míchána přes víkend.

Poté byla odparena na rotační vakuové odpařovací aparatuře a byla rozpuštěna v EtOH. Bylo odebráno vzorek do květiny na ^{31}P NMR a na MS.

NMR spektrum poukázalo na vysokou čistotu. Směs byla nanesena na silný kationtový iontoměnič (Dowex 50, 50–100 mesh, H^+ cyklus). Po nanesení vzorku byla kolona propláchnuta 400 mL EtOH: H_2O a následně 400 mL H_2O do Erlmeyerovy baňky. Poté byly jímány tři frakce 3% HCl do 250 mL baněk. Obsah baněk byl odparena na rotační vakuové odpařovací aparatuře. Pouze první frakce byla přítomna odparek. Ten byl rozpuštěn v destilované vodě. TLC v IPOV (6:1:8) neprokázalo přítomnost makrocyklu. Vzhledem k tomu byl vodolihový proplach katexy odparena a byla opět provedena TLC. Ani z deseti cyklů se nevyskytoval žádný detekcí měřící aninhydrinem.

Kolonabyly tedy prolitareztokem $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}(1:1)$ do 250 ml baňky. Po odpaření byl odparek rozpuštěn v destilované vodě a byl proveden kontrola pomocí TLC. Zde byl již patrná fialová skvrna z názoru hřívající přítomnosti cyklu. Po přibližně 24 hodinách vztoku vykristalizoval a pevná látka. Část krystalů byla odebrána do vialky a byla ponechána v digestoři, aby se odpařily stopy lehkých rozpouštědel. Následně byly krystalky rozpuštěny v D_2O a ^1H a ^{31}P NMR. Rovněž byly odebrány vzorky nastavení jejich rentgenové struktury.

Následně byl připraven sloupec SiO_2 , který byl promyt EtOH. Poté byl nanesen vzorek a kolona byla promyta roztokem $\text{NH}_3:\text{EtOH}(1:5)$. Jednotlivé frakce byly odpařovány a byly připraveny standardy pro TLC. V prvních frakcích byla identifikována přítomnost cyklu. Dále byla kolona významně propláchnutá EtOH a posléze roztokem $\text{AcOH}:\text{EtOH}(1:5)$. Jednotlivé frakce byly opět odpařovány a byly připraveny standardy pro TLC. Cyklus nebyl přítomen ani v jedné z nich. Proto byla kolona propláchnuta směsí $\text{EtOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}(6:1:2)$. V jednotlivých frakcích se rovněž cyklus nevyskytoval. Proto byly slity pouze frakce, které byly eluovány roztokem $\text{NH}_3:\text{EtOH}(1:5)$. Byly odebrány vzorky na ^{31}P NMR a MS.

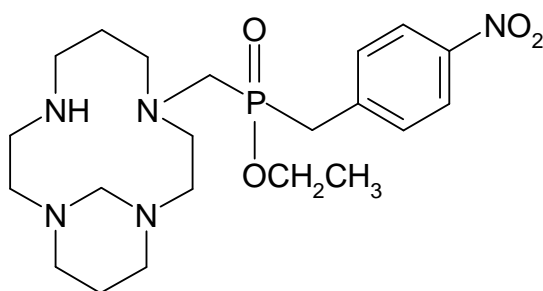
V rámci této reakce byla studována kinetika ochrání cyklamového skeletu pomocí ^{31}P NMR spekter. Po přidání NH_3 do reakční směsi byla měřena spektra v různých časových intervalech a byly sledovány změny jednotlivých signálů.

Charakterizace:

Tato reakce byla provedena za stejných podmínek několikrát s různými výsledky.

V některých případech došlo k ochrání cyklamového skeletu, ale esterová funkce a fosforové pendanty nebyla odštěpena. Signál **MS(+)**: 441,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, teor. 442,0). Občas vykazoval ohmotnostní spektrum vzniklou členinysmolární hmotností ~454. Patrně vznikl methylenovým ústěkem mezi dvěma dusíkovými heteroatomy N4 a N8 (viz Obr. 7). Signál **MS(+)**: 454,1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, teor. 454,0).

Obrázek 7: Látka IV s jedním methylenovým můstkem



Někdy byl pozorován pípk říslušející volnému cyklu, tj. p ří reakci odšt ěpilo cel ěpendantní rameno. Signál **MS(+)** : (200,8([M+H]⁺, teor. 201,2).

Dle ¹H a ³¹P NMR byly krystalky identifikovány jako hydroxomet ylderivát 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny (NB(HM)PIN). Identifikační údaje byly potvrzeny RTG difrakcí na monokrystalu, struktura NB(HM)PIN je uvedena v oddíle 3.5 (Obr. 8).

³¹P{¹H}-NMR(EtOH) : p ří reakci došlo k významnému úžení signálu v oblasti 45–50 ppm. Ostatní signály a jejich relativní intenzity z ůstaly nezm ěněny.

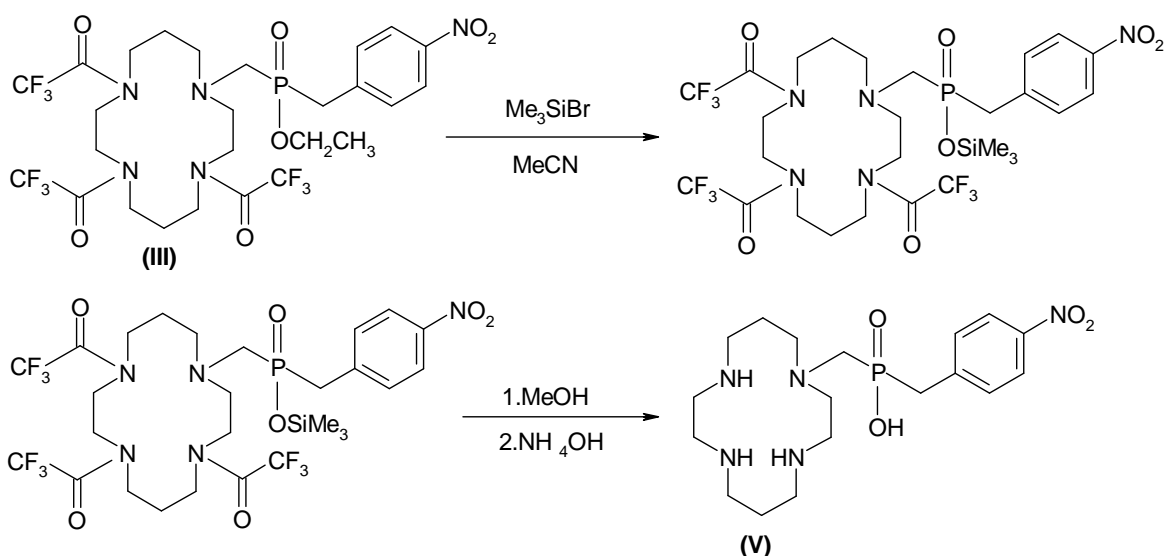
Charakterizace NB(HM)PIN

¹H-NMR(D₂O): δ 3,07(d, 2H); 3,45(d, 2H); 7,34(dd, 2H, $J_{HH}=9,0$; $J_{PH}=2,1$); 8,1(d, 2H, $J_{HH}=8,7$)

³¹P{¹H}-NMR(D₂O): δ 35,8(s)

RTG parametry : C₈H₈NO₅P, koso čtverečná soustava, $P2_12_12_1$, $a=7.7904(3)$, $b=7.9818(2)$, $c=15.6353(4)$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90.00^\circ$, $U=972.23(5)$ Å³, $Z=4$, $R_1=0.0298$, $wR_2=0.0759$.

DEESTERIFIKACE POMOCÍ Me_3SiBr A NÁSLEDNÉ ODCHRÁNĚNÍ CYKLAMOVÉHO SKELETU



Přibližně 0,3 g látky **III** bylo rozpuštěno v 10 mL EtOH a dopařeno na RVO. Odparek byl rozpuštěn v toluenu a znovu odpařeno na RVO. Dále bylo odparek rozpuštěn v suchém MeCN a byl přiveden do magnetického míchadla.

Kroztok byl připraven injekční stříkačkou 2 mL Me_3SiBr (15 mmol). Baňka byla zátkována septem a reakční směs byla míchána přes noc.

Poté bylo do reakční směsi pomalu připraveny 2 mL MeOH a obsah baňky byl odpařen na RVO do sucha. Odparek byl rozpuštěn v EtOH . Průběh deesterifikace byl sledován pomocí TLC v IPA V (7:3:3). Chromatografie poukázala na to, že deesterifikace pravděpodobně proběhla.

K směsi bylo přidáno zbylé množství NH_4OH (přibližně 10 mL). Vývoj ochrání skeletu byl sledován pomocí TLC v ethylacetátu. Zpočátku chránění setrvalo na cyklu, roztok byl zředěn málo bazický, proto bylo přidáno dalších 10 mL NH_4OH .

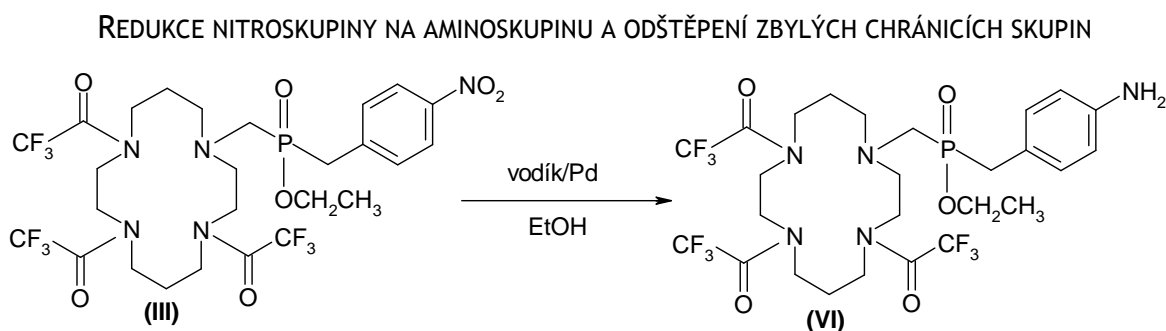
Následující den byla směs reakční směs sledována pomocí TLC smobilní fází $\text{NH}_3:\text{EtOH}$ (1:20). Výsledek naznačoval, že směs je, která by mohla odpovídat ochráněnému cyklamovému skeletu.

Následně byla směs přečištěna sloupcovou chromatografií na iontoměničiči. Byl zvolen silný kationtový iontoměničič (Dowex 50, 50–100 mesh, H^+ cyklus). Po nanesení vzorku byla kolona propláchnuta 400 mL $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, odstranění cyklu - neobsahující nečistoty, tj. fosfonové/fosfinové kyseliny a jejich estery) a poté 400 mL H_2O do Erlenmeyerovy baňky. Dále byla kolona propláchnuta roztokem $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) do 250 mL baňky a její obsah byl dopařeno na RVO do sucha. Čistota byla sledována pomocí TLC.

Toinadálepoukazovalonap řítomnostmnohalátek.Proto bylasm ěsješt ějednou přečiřtěna.Tentokrátbyl zvolensilnýaniontovýiontom ěniĉ(Dowex1,100–200mesh,OH⁻cyklus nazáklad ěchovánípodobnýchlátekbylop ředpokládáno,žeslou ěeninyobsahující skupinuPO⁻jsounavázánynapovrchiontom ěniĉeavuolníseazHCl).Ponanesení vzorkubylakolonapropláchnutal ldestilovanévody.Cht ěnálátkabylaop ěteluována roztokemHCl:H₂O(1:1)do250m lba ňky. Obsahba ňkybylodpa řennaRVODosucha.

Charakterizace:

TLCneobsahovalažádnoulátku,ktarábybyladetekovat ělnáninhydrinem ěimodrou skalicí.Tatoskute ěnostpoukazovalananep řítomnostmakrocykluvesm ěši.



Přibližně0,3g látky **III** ve form ěsurověsm ěši(vEtOH)bylop řevedenodo50m lba ňkysrovným dmem.Potěbylop řidáno0,1gpalladianauhlí.Kesm ěšibylp řidán přibližněstejnýobjemEtOH.Doba ňkybylovloženomagnetickémíchadloazábrusbyl namazánsilikovým tukem.Kba ňěbylp řipojenbaloneknapuřt ěnývodíkem.Vodíkbyl pomocíkohoutuvpuřt ěndoba ňkysesm ěši,párkrátbylospojeníp řeruřenoahadi ěkabyla zba ňkyvytažena,abysevyrovnaltlakplynu.Potěbyls pojzajiřt ěnsvorkouasm ěšbyla míchánap řesvíkend.

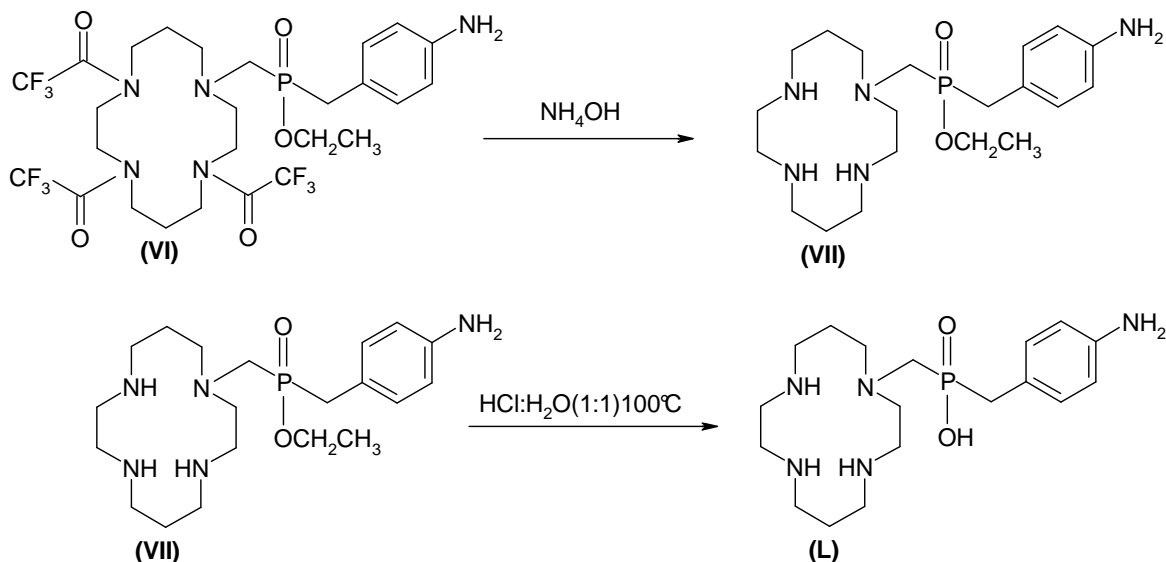
Potěbylroztokp řefiltrovánodkatalyzátorup řesdvojitýskládánífiltra ěnípapírdo 100m lba ňky.NásledněbylopomocíTLCvIPAV(7:1:1)potvrzeno,žehydro ěgenace snejv ěřšípravd ěpodobnostípob ěhla.Ninhydrinemseskvrnazbarvilafialov ěaodlišovala sesvýmodstínemodvýchozílátkyreakce.Následněbylodebránvzorekna ³¹P NMR.

Charakterizace:

³¹P{¹H}-NMR(EtOH) : δ 47,8-50,7(n ěkolikpík ů,patrn ěr ůzněkonformeryvd ůsledku rigidityacylovanéhomakrocyklu,souhrmnáintenzita ~23%),jakodalřílátkybyly identifikoványethylhydroxomethyl(aminobenzyl)fosf inát(40,5;20%),

aminobenzylfosfonová kyselina (20,0; 33%). Vespék trubky ještě další nepřířaditelné signály nízké intenzity.

Surový produkt redukce byl podroben následné hydrolýze podle schématu:



Doba nřkyslátkou **VI** rozpušt ěnou v EtOH byl p řídán koncentrovaný NH_3 v takovém množství, aby byla směs silně bazická. Obsahba nřky byl míchán p ůl hodiny a poté byla směs odpa řena na RVO. Odparek byl rozpušt ěn v destilovan ě vod ě. Rozpušt ění ovšem neprobíhalo uspokojiv ě. Byla provedena TLC v roztoku EtOH: NH_3 (20:1), p řikter ě nebyl spat řena žádná fialová skvrna, který by byl detekovateln ě. Pravd ě podobně chrán ění skeletu neopadalo a proto byl op ět p řídán NH_3 a směs byla míchána p řes noc.

Následující densitometrick ě viditeln ě vy ě ěila. P řed odpa řením na RVO byla obsahba nřky p řefiltrována p řes fritu S3 do 250 mL ba nřky. Po odpa řen ě byl odparek rozpušt ěn v H_2O . TLC stou osm ě s ěji Ź vykazoval op řítomnost ochrán ěn ěho makrocyklu (fialov ě barva podetekcininhydrinem, intenzivn ě modr ě barva podetekci v roztoku modr ě skalice). Následn ě byla směs p ře ěišt ěna sloupcovou chromatografií na iontom ěni ěi. Byl zvolen silný kationtov ý iontom ěni ě (Dowex 50, 50–100 mesh, H^+ cyklus). Po nanesen ě vzorku byl kolonapopl ěchnuta 400 mL EtOH: H_2O a následn ě 400 mL H_2O do Erlenmeyerovy ba nřky. Pot ě byl ochrán ěn ělátka eluována roztokem $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}(1:1)$ do 250 mL ba nřky a následn ě odpa řena na RVO. TLC (IPA V, 7:1:1) neprok ězal op řítomnost nesubstituovan ěho cyklu (fialov ě skvrna s $R_f=0$). Nad ěst ě ěe byla ovšem patrn ě skvrna s $R_f=0,3$. Tam ohla odpovídá t ě jednou substituovan ěmuc yklamu.

Následně byla směs přečištěna na kationtoměnič (Dowex 1, 100–200 mesh, OH⁻ cyklus). Poté byla vzorkována na propláchnutá 400 m² L EtOH:H₂O a následně 400 m² L H₂O do Erlenmeyerovy baňky.

Poté byla látka vypláchnuta roztokem HCl:H₂O (1:1) do 250 m² L baňky a odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn ve vodě, část byla převedena do 25 m² L baňky, odpařena a rozpuštěna v D₂O a ¹H a ³¹P NMR.

Podle NMR spekter byla kyselina acyklostále esterifikovaná, proto byla směs ponechána hydrolyzovat za stálého míchání 60 mL roztoku HCl:H₂O (1:1). Reakční směs byla zahřívána na 100 °C nasazeným nezapojeným chladičem při pokojové teplotě.

Poté byla směs odpařena do sucha. Dle TLC bylo pročištěno látkou přes sloupcovou chromatografii na iontoměnič. Látka byla anesena na silný kationtoměnič (Dowex 50, 50–100 mesh, H⁺ cyklus). Následně byl sloupec propláchnut 1 L H₂O. Čtělátka byla eluována směsí HCl:H₂O (1:1) do 250 m² L baňky a následně odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn ve vodě, část byla převedena do 25 m² L baňky, odpařena a rozpuštěna v D₂O a ¹H a ³¹P NMR.

Dle NMR spekter deesterifikace proběhla. Tyto výsledky TLC stále poukazovaly na výskyt jiných látek jako nečistot. Proto byl vzorek opět přečištěn přes sloupcovou chromatografii na iontoměnič. Tentokrát byla anesena na iontoměnič (Dowex 1, 100–200 MESH, OH⁻ cyklus). Následně byl sloupec propláchnut 1 L H₂O. Čtělátka byla eluována směsí HCl:H₂O (1:1) do 250 m² L baňky a následně odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn ve vodě, část byla převedena do 25 m² L baňky, odpařena a rozpuštěna ve vodě a ¹H a ³¹P NMR.

Vzorek byl kvantitativně převeden do 25 m² L baňky a odpařena. Jeho hmotnost činila 260 mg. Následně byl rozpuštěn v minimálně destilované vodě a byla provedena TLC v soustavě IPA V (7:3:3). V této soustavě se jednotlivé látky separovaly dobře, a ve zhlédnutí, že je isopropanol těžko odpařitelný, byla hledána jiná soustava pro následné přečištění na sloupci SiO₂. Nakonec byla nalezena vhodná alternativa, a to směs NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1). Následně byl připraven sloupec SiO₂ a byl propláchnut EtOH:NH₃ (5:1). Poté byla provedena gradientová eluce směsí EtOH:NH₃:H₂O (5:1:2), kdy byla jímána frakce do 100 m² L klatébaňky. Čtělý produkt byl nazávěr vypláchnut NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1) rovněž do 100 m² L klatébaňky. Frakce byla odpařena, rozpuštěna v destilované vodě a pomocí TLC bylo zjištěno, že se jednotlivé látky rozseparovaly. Frakce byla kvantitativně převedena do 25 m² L a zvážena baňky.

Poté bylo obsahba ňky odpa řen, byl z vážen výt ěžekanásledn ě byl odparek rozpuštěn v D₂O a byl z m ěřena ¹H, ¹³Ca ³¹P NMR spektra. Rovn ěž byl odebrán vzorek na MS.

Výt ěžek: (L) = 50 mg

Charakterizace:

TLC: fialová skvrna; $R_f=0,3$ v soustav ě NH₃:EtOH:H₂O(1:1:1)

MS(+) : 406,2 ([M+Na]⁺, teor. 406,5)

¹H-NMR(D₂O): δ 1,95(m, 2H); 2,19(m, H); 2,76(t, 2H); 2,97(m, 2H); 3,24(m, 2H); 3,26(t, 2H); 3,27(d, H); 3,31(t, 2H); 3,36(t, 2H); 3,54 & 3,57(m, 2x2H); 7,53(dd, arom, 2H); 8,24(d, arom, 2H),

¹³C-NMR(D₂O): δ 38,6(d); 54,2(d); 44,9; 43,6; 45,7; 22,04; 41,6; 43,9; 44,5; 23,13; 55,8 (d); 124,59(d, arom); 131,24(d, arom); 142,87(d, arom); 148,96(d, arom)

³¹P{¹H}-NMR(D₂O): δ 37,8(s)

³¹P-NMR(D₂O): δ 35,2(t; ²J_{PH}=16,5)

Celkov ěp řířazení signál ůa NMR spektra jsou uvedeny v p říloze.

Vedlejší produkt:

Výt ěžek: = 680 mg

TLC: fialová skvrna; $R_f=0,6$ v soustav ě NH₃:EtOH:H₂O(1:1:1)

MS(+) : 428,0

³¹P{¹H}-NMR(D₂O): δ 36,1(s)

³¹P-NMR(D₂O): δ 36,1(s)

Tato slou ěeninane byla zat ím identifikována.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 SYNTÉZA NBPIN A JEJICH ESTERŮ

Syntéza fosforového prekurzoru narazila na úskalí již vém finálním kroku a topení při krystalizaci NBPIN (**1**). Dle návodu [44] mohl být po ochlazení filtrát do jít ke krystalizaci produktu, který ovšem samovolně nedošlo. Proto byl filtrát extrahován 200 ml LHCle ve 200 ml LCHCl₃. Organická fáze byla odpuštěna a uchována a vodná fáze byla dosucha odpařena na RVO. Kodparku bylo přidáno 100 ml 10% HCl a 100 ml Lchloroformu a směs byla důkladně zamíchána. Zapsal se přibližně 72 hodin cínový produkt **1** vykrystalizoval.

V organické fázi se pod vodu nechvalou cílabilasraženina, jednalo se o téměř čistý produkt **1** (čistota 90%) připravený ke krystalizaci z horké vody.

Reakce výchozích látek musí probíhat v inertní atmosféře (argon), nebo třeba jak bis(trimethylsilyloxy)fosfin (BTSP), tak silylestery fosfinových kyselin jsou velice citlivé na vlhkost a oxidaci.

BTSP je možné alkylovat do dvou stupňů, takže mimožádaného produktu **1** (4-nitrobenzylfosfinová kyselina, NBPIN) vzniká v průběhu reakce také bis(4-nitrobenzyl)fosfinová kyselina (**2**, NB₂PIN). Jejívznik byl omezen použitím dvojnásobného nadbytku BTSP oproti NBB. V přítomnosti oxidizačních činidel (kyslíku) může docházet k oxidaci fosfinové skupiny vznikající 4-nitrobenzylfosfonové kyseliny (**3**, NBPON).

Esterifikaci 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny (reakce s NBPIN, suchého EtOH, DCC a DMAP) doprovázela vyloučení DCU, které neprobíhalo kvantitativně. Obsahbaňky byl po reakci odpařen na RVO dosucha a odparek byl rozpuštěn v 96% EtOH. Roztok byl následně filtrován na fritě a odpařen na RVO. Tento postup byl zopakován nejméně třikrát, aby byla veškerá DCU vyloučena. I přesto opakovaný postup DCU už ustal jako nečistota v připraveném methylesteru a vyloučení se izreakční směsí následně Mannichově reakci.

3.2 SYNTÉZA CYKLAMU

Postup syntézy cyklamu byl zreprodukován dle literatury.^[42,43] Výtěžek reakce byl velmi nízký, dosahoval 25% (literatura^[42,43] uvádí až 60% výtěžek).

Možným vysvětlením malého výtěžku by mohla být ztráta extrakce chloroformem. Produkt je velice dobře rozpustný ve vodě a jeho přečistění chloroformem neprobíhá ochotně. Pro vyšší výtěžek může být extrakce ještě provedena vícekrát.

3.3 OCHRÁNĚNÍ CYKLAMOVÉHO SKELETU

Postup přípravy třikrát chráněného cyklamového skeletu byl publikován v literatuře.^[45] Výtěžek reakce je uváděn 92%.^[45]

Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že spolu s třikrát substituovaným cyklem vzniká rovněž dvakrát a čtyřikrát substituovaný. Dvakrát substituovaný cyklem se odstraní sloupcovou chromatografií na sloupci SiO_2 zatímco třikrát (**II**) a čtyřikrát (**II***) substituovaný cyklus na koloně nezadržuje a projde spolu s mobilní fází (ethylacetátem). Tyto dvě látky jdou tedy následně spolu do reakce. Rozsáhlejší vznik čtyřikrát substituovaného cyklamu je omezen řídicím Et_3N .^[45]

Čtyřikrát substituovaný cyklem (**II***) se stopově vyloučil ve tvrdé fázi spolu s DCU v olejové fázi po Mannichově reakci. Tyto směsné krystalky nebyly rozpustné v H_2O , EtOH ani v NH_3 . Částečně se rozpouštěly v CHCl_3 . Nakonec byla nejlepší rozpustnost dosažena v DMSO. Hmotnostní spektrum potvrdilo přítomnost látky **II***. Signál **MS(+)**: 607,2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, teor. 607,1). Tabylavšak zastoupen pouze v netříděném, stopovém, množství v porovnání s vyloučenou DCU.

V návodu^[45] je uvedeno, že je třeba směs řídit při řídicím Et_3N a chladit v ledové lázni. Bylo ovšem zjištěno, že reakce není výrazně exotermická a postačí vodní lázeň.

3.4 ZAVEDENÍ FOSFINÁTOVÉHO PENDANTNÍHO RAMENE

Při přípravě látky **III** byla použita typická Mannichova reakce v prostředí toluenu. Za účelem snížení obsahu vody v toluenu bylo zamýšleno využití Dean-Starkovy pasti. Tato metoda se ovšem neukázala jako vhodná, neboť zavarování směsí bylo příliš obtížné. Proto bylo obsah vody zajištěn pouhým přidáním 90°C paraformaldehydu při řídicím postupně.

Získání látky **IV** bylo řešeno mnoha způsoby. Žádná z nich bohužel nevedla ke
chtěnému produktu.

Reakce silylačními činidly probíhaly v inertní argonové atmosféře. V prvním
případě bylo použito BSA ve druhém HMDS. Navázání fosfinátového pendantu bylo
docíleno Mannichovou reakcí. Měřená ^{31}P NMR spektra měly posunutou škálu do oblasti
kolem 150 ppm, kde bylo očekávaný silylovaného meziproductu.

V rámci syntézy BSA byla zkoumána oxidací hydrolytická stabilita v směsi
před hydrolyzou silylační. Vzorek směsi byl odebrán do NMR kyvet naplněné argonem a
byl analyzován v řadě řešení. Dle ^{31}P NMR spektra se v průběhu 24 hodin složení směsi
nezměnilo. Stále se vyskytoval ostrý pík v oblasti δ 151,2 a nebyl pozorován vznik jiných
signálů. Mezi produkty tedy jeví jako oxidací nestálý. Ovšem po hydrolyze silylační došlo
k současněmu odstínění celého pendantu. V směsi se nepoté vyskytoval cyklus pouze
ve formě volného cyklamů. Signál $\text{MS}(+): 200,8 ([\text{M}+\text{H}]^+, \text{teor. } 201,2)$.

Při reakci HMDS byla potvrzena důležitost použití kvalitně vysušených
rozpuštědel. Použitý THF obsahoval řadu nečistot, které vedly k reakci ubraněných
směrem, kdy se v směsi vyskytoval řada oxidovaných fosfonátů. Z toho důvodu
nebyla reakce směsi řídit analýza **II**.

Reakce směsi esterem hydroxymethyl derivátu NBPIN pro řízení výchozí chlátek
azah řádění na 60°C neproběhla. ^{31}P NMR spektrální křivky 5 reakcí směsi po 24 hodinovém
zahřívání byly totožné. Následně byl řízení isopropylethylamin suspenze byla
míchána azah řádění na 60°C řes víkend. Po odpaření na RVO a extrakci hrudky k potaše
ethylacetátem bylo naměřeno ^1H a ^{31}P spektrum. V fosforovém spektru se vyskytoval
signál fosforu. Fosfor byl hledán v pevné fázi tvořené K_2CO_3 . Tabylarozpuštěná v H_2O
byl odebrán vzorek na ^{31}P NMR. Signál fosforu se nevyskytoval, reakce ovšem
nezdařila.

3.5 HYDROLÝZA CYKLAMOVÉHO CHRÁNĚNÍ A ESTERU

V rámci této práce byla zkoušena bazická hydrolyza cyklamového ochrání
bazická kyselá hydrolyza esteru NBPIN. Bylo předpokládáno, že kdybyž byla látka **III**
podrobena bazické hydrolyze, tak se poluschrání modště pí ester fosfinátového
pendantu bude získána látka **V**.

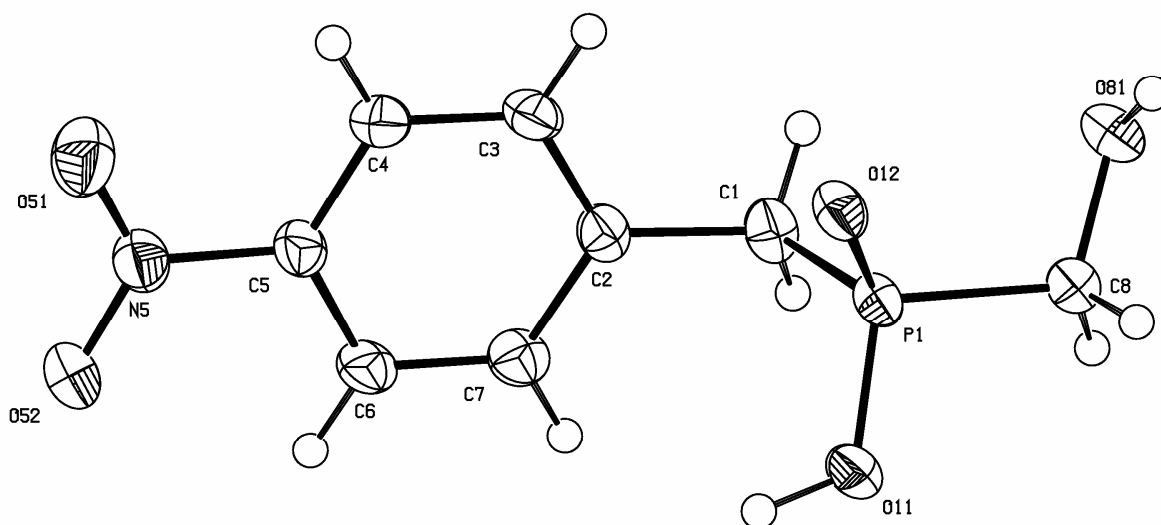
V naší pracovní skupině byl od říve pozorováno, že drsnější bazická hydrolyza způsobuje nechtěné odštěpení nitrobenzylfosfinátového pendantu (ve formě ethylesteru). Z toho důvodu nebyl vyzkoušen bazická hydrolyza použitím alkalického hydroxidu (NaOH, KOH). Proto byl pro hydrolyzu použit jemnějších podmínek (NH_4OH). Takováto bazická hydrolyza cyklamového chránila však nepůsobí odštěpení esterové funkce a tudíž přechod z látky **III** na látku **V** pomocí hydrolyzy pomocí NH_3 není možný.

Pomocí ^{31}P NMR a pomocí TLC byla sledována kinetika odštěpení cyklamového skeletu. Při řešení NMR byla pozornost směřována především do oblasti kolem 50 ppm, kde byl předpokládán výskyt chránila. Postupem času poměrně široká oblast píků ůměnila svůj charakter a jednotlivé intenzivní signály se začaly měnit. Změny po 270 minutách ovšem nebyly nijak významné, proto byla směs ponechána v květu a byla znovu změřena následující den. Po odštěpení chránila se v průběhu reakce očekávalo zostření píků v sledované oblasti, k čemuž také došlo. Je tedy předpokládáno, že reakční směs po ředění NH_3 by měla být míchána aspoň 24 hodin. Toto stanovení je ovšem pouze orientační, v NMR květu není dosaženo stejných podmínek jako v bance. Především z pohledu míchání reakční směsi.

Deesterifikace pomocí Me_3SiBr ůsobilá jako vhodná cesta k přípravě látky **IV**. Produkt byl však ztracen při chromatografii na silném aniontu, kdy byl zřejmě zesloupce vypláchnut vodou ještě před zamýšlenou elucí směsí $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Z čehož vyvstává podezření, že se chránila kavesměsine vyskytovala, protože by se na sloupci silného aniontového iontoměniče zachytila a neprošla by spouškovým proplachem.

Jako náhradní variantou byla zvolena kyselá hydrolyza v prostředí HCl při teplotě 110°C. Vzhledem k MS a ^1H NMR spektr ům selze domnívat, že tento postup vede k hydrolyze esteru zavedení požadovaného produktu **V**. Při prvním pokusu izolací byl tento postup bohužel zatím neznámých důvodů neúspěšný.

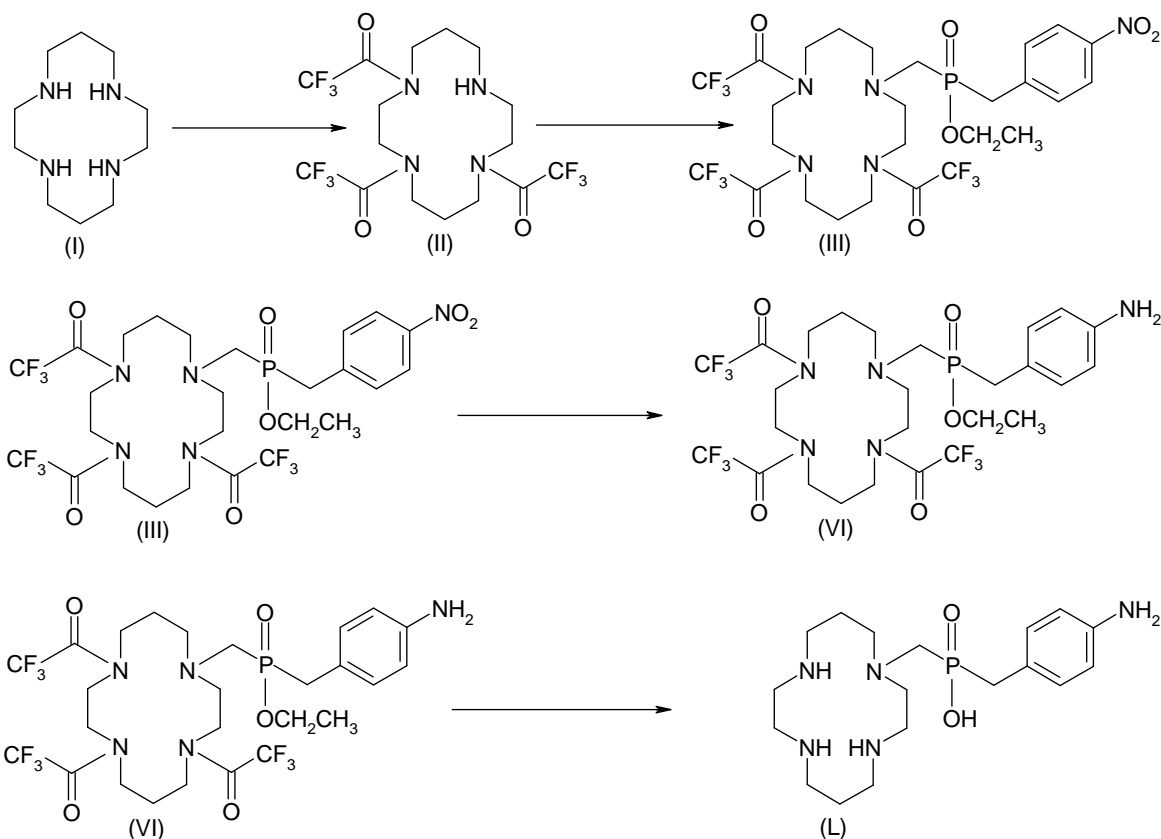
Obrázek 8: Rentgenová struktura NB(HM)PIN



Pojistédob ěvykrytalizovalyvreak ěnism ěsipohydrolyzepr ůhledněkrystalky. DleNMRbylyidentifikoványjakohydroxomethylderiv ět4-nitrobenzylfosfinovėkyseliny (NB(HM)PIN).Odtétolátkybylanam ěřenaistrukturapomocírentgenovėdifrakce(viz Obr.8)

3.6 ŮSPĚŠNÁ PŘÍPRAVA CÍLOVÉ LÁTKY L

Přítomnostnitrobenzylunafosfinátovėmpendantnímra ěmenizp ůsobujeodtahování elektronůzN-C-Pvazbyatímzp ůsobujev ětšílabilitupendantunacyklu.Ztohotod ůvodu směřovalasyntėzakredukcinitrobenzylunaaminobenzyl ě,kerýnaopakN-C-Pvazbu stabilizujeapendantsetakstalodoln ějším v ůčihydrolyze.



Přípravacílovělátky **I** vychází z Mannichovy reakce chráněného cyklamenu (**II**) spolu se esterem NBPIN. Získaná látka **III** byla podrobena hydrogenaci (redukce nitrobenzylu na aminobenzyl) a následně bazické (odchránění cyklamového skeletu) a kyselá hydrolyze (odštěpení esterové funkce fosforového pendantního ramene).

Hydrogenace nitrobenzylu byla uskutečněna pomocí vodíku a palladia na aktivním uhlí. Reakčním prostředkem (Pd) byla směs katalyzátoru, dokud se vyskytoval přetlak plynu v balonku. Občas došlo k usazení katalyzátoru na dně banky, proto byl třeba reakční směs rozpohodnout, aby se katalyzátor opět rozptýlil v míchající směsi.

Následně bylo pomocí TLC v IPA v (7:1:1) potvrzeno, že hydrogenace nejvíce pravděpodobnostně proběhla. V ninhydrinové reakci zbarvil fialově a odlišoval se svým odstínem od výchozí látky reakce. Tato reakce zřejmě byla citlivá na reakční podmínky.

Hydrogenace látky **III** tedy vedla k přípravě látky **VI**. Následně odchránění cyklamenu probíhalo při nižší teplotě, popouštění směsi v koncentrovaném amoniaku nebylo dle pokusů rozpustné v H_2O . Při tom cyklus jedním pendantem se v H_2O rozpouští ochotně. Na TLC nebyl ninhydrin ani manganid detekován v cyklu. To bylo zřejmě způsobeno stálým obsazením všech čtyř atomů dusíku. Proto bylo řízení další množství NH_3 reakce bylo směsí 24 hodin.

Potéto bylo pozorováno vyřešení reakční směsi. TLC vykazovalapřítomnost fialové skvrny zbarvenémědí. Po sloupcové chromatografii přessilnýkatex byla opět provedena TLC v IPA V (7:1:1) a na destičce byla patrná namodralá skvrna s $R_f=1,2$. Ten s velkou pravděpodobností odpovídá jedné substituované mucyklamu. Následovala sloupcová chromatografie přessilnýaniontovýmiontoměnič. Podle NMR byla kyselina na cyklostále esterifikovaná, proto byla směšně ponechána hydrolyzovat v roztoku HCl:H₂O (1:1). Dle NMR spektra deesterifikace proběhla. Tyto všechny spolu s TLC stále poukázovaly na výskyt jiných látek jako nečistot. Soustava NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1) se zdá být posérii zkoušením jako nejvhodnější pro separaci látek ve směšně nasloupci SiO₂. Byly získány dvě frakce. První frakce měla v soustavě NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1) $R_f=1,9$ a byla eluována směsí EtOH:NH₃:H₂O (5:1:2). Cílový produkt, druhá frakce, měla v soustavě NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1) $R_f=1,2$ a byl zesloupcem SiO₂ eluován směsí NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1). Tato druhá frakce byla identifikována jako cílový produkt **L**, sloučeninu obsaženou v první frakci se bohužel nepodařilo identifikovat.

4. ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce bylo reprodukováno a syntézou cyklofosfinátového prekursoru. ^[44]Kochráně ní skeletu bylo zvoleno nesymetrické chránění do tří poloh pomocí ETFA. ^[45]Fosfinátové pendantní rameno bylo navázáno na skelet Mannichovou reakcí. Následoval hydrogencenitroskupinový a aminoskupinový ochrání skeletu hydrolyzou v NH₃. Esterová funkce byla navázána na kyselou hydrolyzou v prostředí HCl. Popřechčištění pířesloupec SiO₂ bylo získáno čistálátka L.

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcOH	kyselina octová
NBB	4-nitrobenzylbromid
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamid
BTS	bis(thiosemikarbazony)
BTSP	bis(trimethylsilyloxy)fosfin
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DCU	<i>N,N'</i> -dicyklohexylmočovina
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTMP	kyselina ethylendiamintetramethylenfosfonová
ETFA	ethylester kyseliny trifluoroctové (trifluoroctové ethylester)
EtOH	ethanol
EC	elektronový záchyt (Electron Capture)
HMDS	hexamethyldisilazan
<i>J</i>	interakční konstanta [Hz]
IPAV	<i>i</i> -propanol/konc.aq.amoniak/voda (<i>i</i> -PrOH/konc.aq.NH ₃ /H ₂ O)
IPOV	<i>i</i> -propanol/kyselina octová/voda (<i>i</i> -PrOH/CH ₃ COOH/H ₂ O)
keV	kiloelektronvolt (1 eV = 1,602176 · 10 ⁻¹⁹ J)

MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MS-ESI	hmotnostní spektrometrie-ionizace elektr. osprejem (Mass Spectrometry-Electron Spray Ionization)
NB(HM)PIN	hydroxomethyl-4-nitrobenzylfosfinové kyseliny
NBPIN	4-nitrobenzylfosfinová kyselina
NB ₂ PIN	bis(4-nitrobenzyl)fosfinová kyselina
NBPON	4-nitrobenzylfosfonová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
PET	pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography)
R_f	retenční faktor
RTG	rentgen
RVO	rotační vakuová odpadarka
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie (Single Photon Emission Computed Tomography)
τ	poločas rozpadu
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol (2-methylpropan-2-ol)
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie tenkých vrstev (Thin Layer Chromatography)
TMS	tetramethylsilan
δ	chemický posun

6. PODĚKOVÁNÍ

Nazáv ěrmizbylamilápovinnostpod ěkovatvšem,kte řiser ůznoum ěroupodřileli navznikutětopráce.

Zásluhulví,tedynejv ětší,p řipisujisvémuškolitelidoc.RNDr.JanuKotkovi,Ph .D. Velicemud ěkujizajehoneutuchajícítrp ělivost,p řátelskýapozitivníp řístuparovn ěžza občasnyímilýúnikzchemiekmineralogiihudebnísou znění.DíkyHonzovidnesvím,že uvařenékomplexyzažádnoucenunechodímerezprašovatn achodbu.Dáled ěkujiza veškerékonzultace,radyadrahocenný čas,kterémiv ěnoval.

Vřelýdíkat řiprof.doc.RNDr.PetruHermannovi,Dr.zanabídku realizace bakalářsképrácenakated řeanorganickéchemieazaletmép ředstaveníprácekoleg ů.

DěkujiRNDr.Vojt ěchoviKubíčkoví,PhD.zaúvoddoproblematikyNMRaza „dozorpodargonem.“

Všemdálejmenovanýmd ěkujizam ěřeníNMRaMSspekter.Jsouto:RNDr.Jan Plutnar,PhD.,RNDr.Vojt ěchKubíček,PhD.,Mgr.Ivan Řehoř,Mgr.TomášDavid,Mgr. JakubŠime ček,Bc.Ji řiBártaaBc.MiroslavPniok.Rovn ěžd ěkujiRNDr.Ivan ěCísa řové, CSc.zanam ěřenírentgenovéstruktury.

Svémuotcid ěkujizafinan čnípodporuamám ězapomocp řibojizagramatickou správnost.

Děkujivšemkoleg ůmz,„velkéamalélaborky“zavytvo řeníp říjemného pracovníhoprost ředí.P ředevšímzajejichp řátelskýp řístupaochotukdykoliporaditnejen profesně,aletakélidsky.

Můjdíkat řítakět ěmnaakterějsemneúmysln ězapomněla.Jednásep ředevšímo jedince,kte řisemnoustate čněsdřileli,každýsvýmojedín ělýmzp ůsobem,t řiroky bakalářskéhostudia.Obrovskýdíkat řírovn ěžjednéspeciální,„postavi čce“,kteráje mémusrdcinejbližší.D ěkujizaTvounekone čnoupodporu.

Rádabychtutopráci věnoval svému dědečkovi, ing. Václavu Benešovi, CSc. (1931-1983), který v sedmdesátých letech pracoval v podnikovém výzkumtovárně PARAMOPardubice na vývoji a zdokonalení živých povrchů asfaltu. Věřím, že on by ocenil můj zájem a snažil se pracovat v přírodovědné oblasti. Bohužel tuto dedikaci již nemůžu přijmout osobně.

7. POUŽITÁ LITERATURA

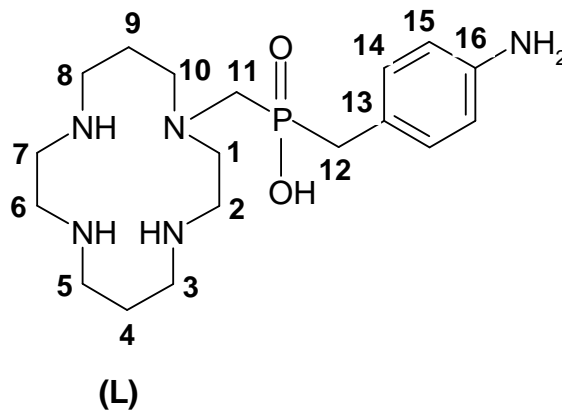
- [1] W. Loveland, D. J. Morrissey, G. T. Seaborg, *Modern Nuclear Chemistry*, WILEY-INTERSCIENCE, New Jersey, **2006**
- [2] P. Komárek, *Praktická lékařství*, **2006**, 5, 231–235
- [3] V. Ullmann, *AstroNuklFyzika- Jaderná radiační fyzika, nukleární medicína*, [online], [cit. 2010-07-22], <http://astronuklfyzika.cz>
- [4] S. M. Qaim, *Radiochim. Acta*, **2001**, 89, 297–302
- [5] *Present and Future Therapeutic Radionuclides*, Scientific Electronic Library, [online], [cit. 2010-07-23], <http://www.scielo.br>
- [6] *Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně*, [online], [cit. 2010-07-24], <http://www.cls.cz>
- [7] C. J. Anderson, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2219
- [8] *Ústav jaderného výzkumu Řež*, [online], [cit. 2010-07-25], www.nri.cz
- [9] J. Havlík, *Bakalářská práce*, P řFUK v Praze, Praha **2008**
- [10] *Česká společnost nukleární medicíny*, [online], [cit. 2010-07-24], <http://www.csnm.cz>
- [11] W. Krause (Editor), *Contrast Agents III: From Diagnostic to Therapeutic* (*Top. Curr. Chem.*, 252), Springer, Netherland **2005**
- [12] J. Pacák, M. Černý, *Chem. Listy*, **2002**, 707, 704–707
- [13] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie prvků*, Informatorium, Praha **1993**, 1455–1487
- [14] J. Rejzek, *Český etymologický slovník*, LEDA, **2001**
- [15] H. Remy, *Anorganická chemie II*, SNTL, Praha **1971**, 377–402
- [16] V. Majeráková, *Základy jaderné chemie*, SNTL, Praha **1981**
- [17] A. H. LeJeune, M. Charpin, D. Sargos, J. F. Lenain, V. Deluchat, N. Ngayila, M. Baudu, C. Amblard, *Aquat. Toxicol.*, **2007**, 83, 223–237
- [18] R. B. Heslop, K. J. Jones, *Anorganická chemie*, SNTL, Praha **1982**
- [19] C. Chambers, A. K. Holliday, *Modern Inorganic Chemistry*, Butterworth & Co (Publishers) Ltd., Butterworth, **1975**, 408–416
- [20] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Curr. Pharm. Des.*, **2007**, 13, 3–16
- [21] G. Audi, O. Bersillon, J. Blachot, A. H. Wapstra, *Nucl. Phys. A.*, **2003**, A729, 3–128

- [22]H. Cai,Z. Li,Ch. W. Huang,R. Park,A.H. Shahinian,P.S.Conti, *Nucl.Med. Biol.* , **2009**, 37,57–65
- [23]P.J.Blower,J.S.Lewis,J.Zweit, *Nucl.Med.Biol.* , **1996**, 23,957–980
- [24]K.S.Bhatki,A.T.Rane,M.B.Kabadi, *J.Radioanal.Chem.* , **1969**, 2,73–77
- [25]J.Kotek,P.Lubal,P.Hermann,I.Čísařová,I.Lukeš,T.Godula,I.Svobodová,P. Táborský,J.Havel, *Chem.Eur.J.* , **2003**, 9,233–248
- [26]R.Schwarzbach,K.Zimmermann,P.Bläuenstein,A.Smith,P.A.Schubinger, *Appl.Radiat.Isot.* , **1995**, 46,329–336
- [27]I.Novak-Hofer,P.A.Schubiger, *Eur.J.Nucl.Med.* , **2002**, 29,821–830
- [28]P.Karlson,W.Gerok,W.Gross, *Pathobiochemie*,Academia,Praha **1987**
- [29]S.V.Smith, *J.Inorg.Biochem.* , **2004**, 98,1874–1901
- [30]S.Füzerová,J.Kotek,I.Čísařová,P.Hermann,K.Binnemans,I.Lukeš, *Dalton Trans.* , **2005**,2908–2915
- [31]C.S.Cutler,M.Wuest,C.J.Anderson,D. E.Reichert,Y.Sun,A.E.Martell, J.M.Welch, *Nucl.Med.Biol.* , **2000**, 27,375–380
- [32]J.Yoo,D.E.Reichert,M.J.Welch, *Chem.Comm.* , **2003**, 6,766–767
- [33]P.A.Tanker,L.Sklar, *J.Cryst.Mol.Struct.* , **1975**, 5,329–341
- [34]P.Barbaro,C.Bianchini,G.Capannesi,L. DiLuca,F.Laschi,D.Petroni, P.A.Salvadori,A.Vacca,F.Vizza, *DaltonTrans.* , **2000**, 14,2393–2401
- [35]L.A.Bass,M.Wang,M.J.Welch,C.J.Anderson, *Bioconjug.Chem.* , **2000**, 11, 527–532
- [36]C.Bianchini,G.Giambastiani,F.Laschi,P. Mariani,A.Vacca,F.Vizza, P.Zanello, *Org.Biomol.Chem.* , **2003**, 1,879–896
- [37]X.Sun,M.Siest,Z.Kovacs,A.D.Sherry, R.Motekaitis,Z.Wang,A.E.Martell, M.J.Welch,C.J.Anderson, *J.Biol.Inorg.Chem.* , **2003**, 8,217–225
- [38]C.J.Mathias,S.R.Bergmann,M.A.Green, *Nucl.Med.Biol.* , **1994**, 36,1451–1455
- [39]J.L.J.Dearling,J.S.Lewis,G.E.Mullen,J.Welch,P.J.Blower, *J.Biol.Inorg. Chem.* , **2002**, 7,249
- [40]J.L.J.Dearling,J.S.Lewis,G.E.Mullen,M.T.Rae,J.Zweit,P.J.Blower, *Chem. Comm.* , **1998**,2531
- [41]I.Svobodová,J.Havlíčková,J.Plutnar,P.Lubal,J.Kotek,P.Hermann, *Eur.J. Inorg.Chem.* , **2009**,3577–3592
- [42]PostupsyntézynavrženRNDr.VojtěchemKubíčkem,PhD.

- [43] I. Meunier, A. K. Mishra, B. Hanquet, P. Colis, R. Guillard, *Can. J. Chem.*, **1995**, *73*, 685
- [44] E. K. Barefield, F. Wagner, A. W. Herbinger, A. R. Dahl, *Inorg. Synth.*, **1976**, *17*, 220–225
- [45] W. Yang, Ch. M. Giandomenico, M. Sartori, D. A. Moore, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 2481–2483

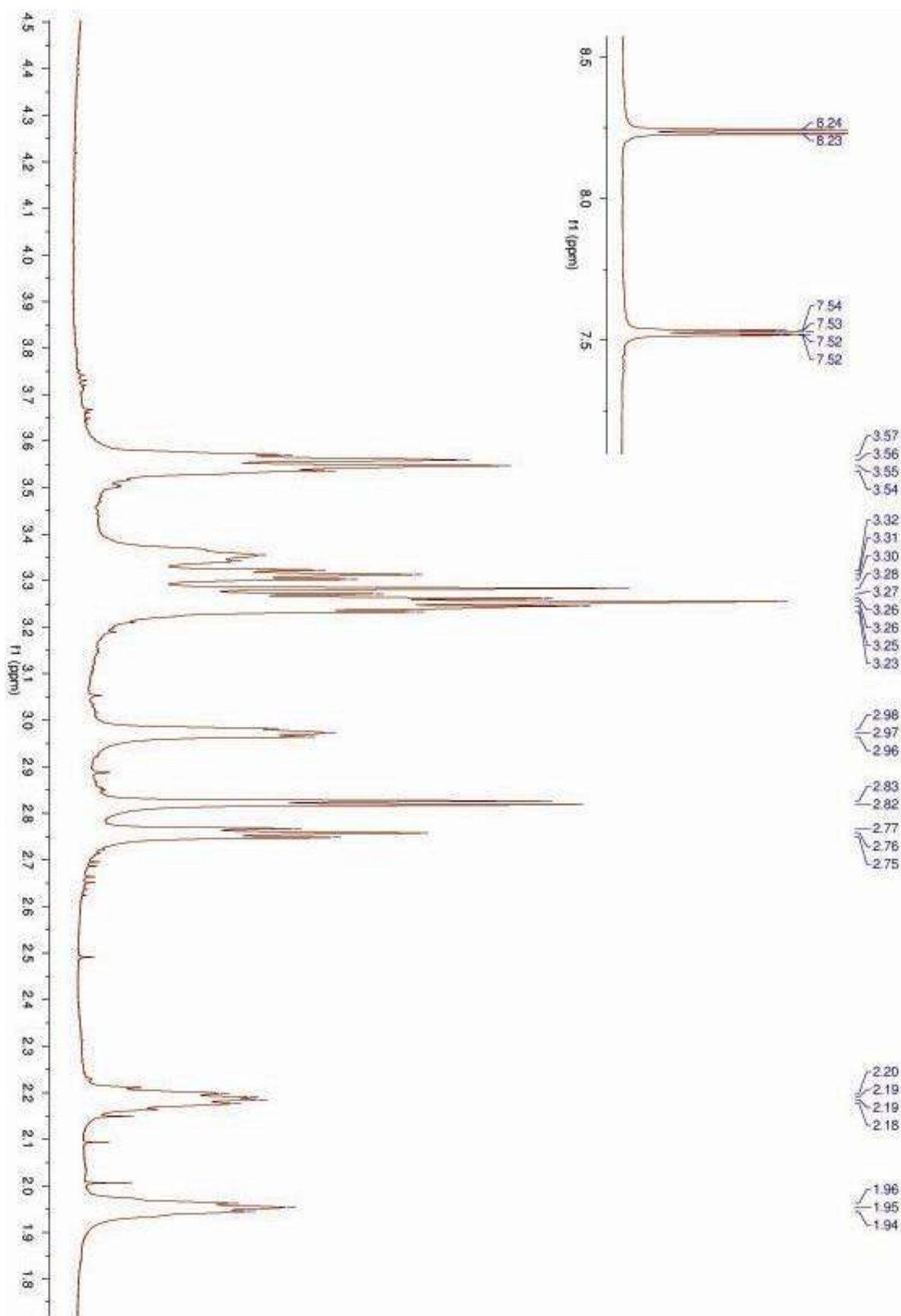
8. PŘÍLOHY

Příloha 1: Charakterizace cílové látky L (^1H a ^{13}C NMR)

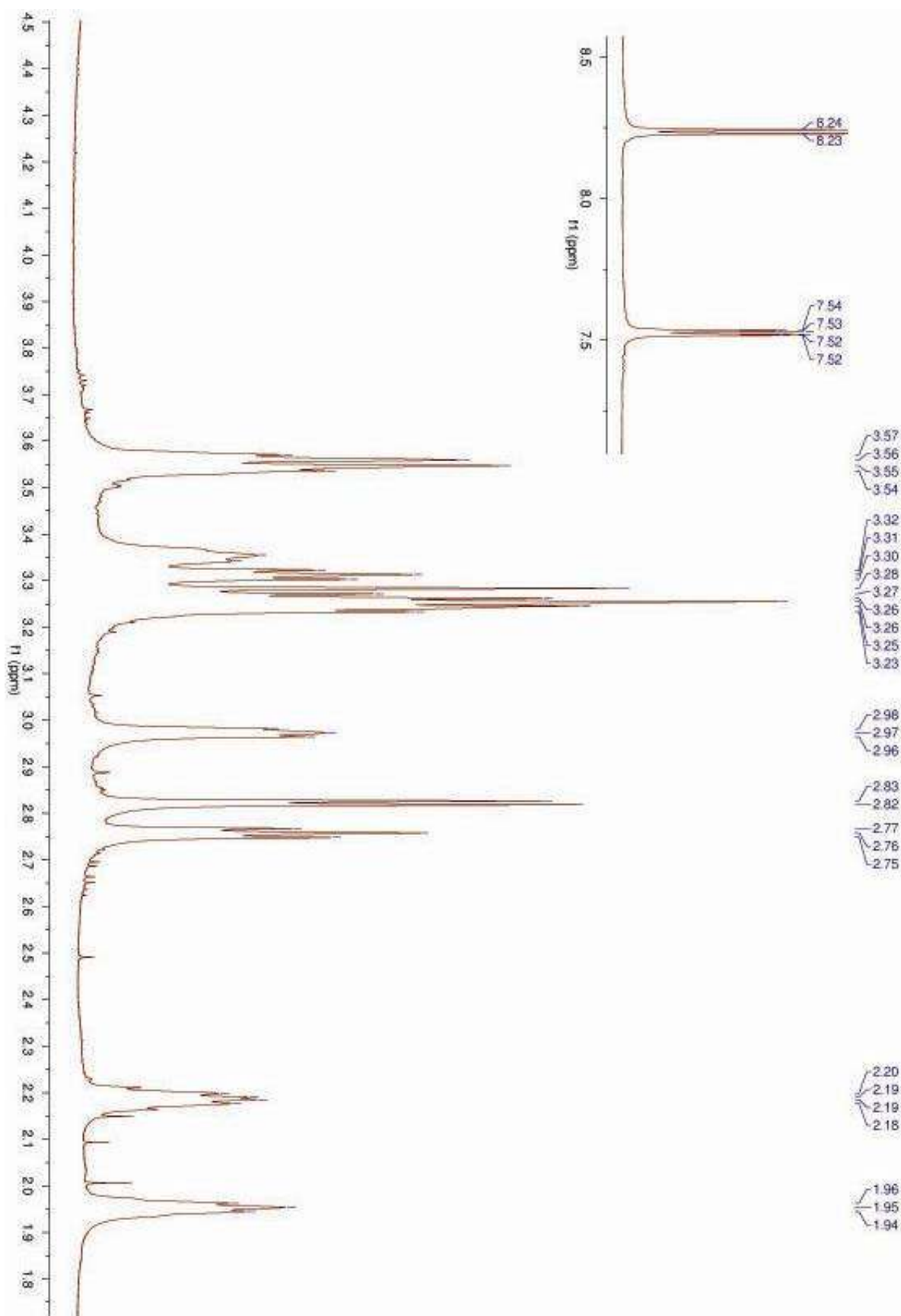


	^1H	^{13}C
1	2,97(m;2H)	54,2(d;6,2)
2	3,24(m;2H)	44,9
3	3,31(t;6,05;2H)/ 3,36(t;6,05;2H)	43,6;45,7
4	2,19(m)	22,04
5	3,31(t;6,05;2H)/ 3,36(t;6,05;2H)	43,6;45,7
6	3,54;3,57(m;2x2H)	41,6;43,9
7	3,54;3,57(m;2x2H)	41,6;43,9
8	3,26(t;5,74;2H)	44,5
9	1,95(m)	23,13
10	2,76(t;5,83;2H)	55,8(d;7,1)
11	2,76(t;5,83;2H)	55,8(d;7,1)
12	3,27(d;17,4)	38,6(d;81,7)
13	-----	142,87(d;7,8)
14	7,53(dd;2,18&8,87;2H)	131,24(d;4,8)
15	8,24(d;8,31;2H)	124,59(d;2,2)
16	-----	148,96(d;3,3)

Příloha 2: ^1H NMR spektrum cílové látky L



Příloha 3: ^{13}C NMR spektrum cílové látky L



Příloha 4: ^{31}P NMR spektrum cílové látky L

