

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



Šrein, Jakub

Organofosforová analoga trifosfátu

Organophosphorus analogues of triphosphate

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze 26. 5. 2015

Podpis

Jakub Šrein

Obsah

Abstrakt	1
Abstract.....	2
Seznam zkratk.....	3
1. Úvod	4
1.1 Fosfonáty a fosfináty	4
1.2 Bis(fosfonové) kyseliny.....	4
1.3 Analoga trifosfátu	7
1.4 Cíl práce.....	10
2. Experimentální část	11
2.1 Seznam chemikálií.....	11
2.2 Experimentální metody.....	11
2.3 Syntéza.....	12
3. Výsledky a diskuze	16
3.1 Kyselina bis(fosfonomethylen)fosfinová	16
3.2 NMR titrace	18
3.3 Kyselina bis((difenylfosfinyl)methylen)fosfinová	21
3.4 Závěr	21
Reference	22

Název: Organofosforová analoga trifosfátu

Řešitel: Jakub Šrein

Ústav: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta UK

Školitel: doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

E-mail školitele: kubicek@natur.cuni.cz

Abstrakt

V této práci byly připraveny dvě látky obsahující strukturní motiv PCPCP, tedy obdobu biomolekuly ATP, kde jsou kyslíkaté můstky nahrazeny můstky methylenovými. Látky byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie a NMR spektroskopie. V případě kyseliny bis(methylenfosfonáto)fosfinové byly pomocí NMR titrace určeny čtyři hodnoty pK_a . Obě připravené látky mají potenciál sloužit jako chelatující ligandy.

Klíčová slova: organofosforová syntéza, reaktivita, acidobazické vlastnosti

Title: Organophosphorus analogues of triphosphate

Author: Jakub Šrein

Department: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science UK

Supervisor: doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

Supervisor's e-mail address: kubicek@natur.cuni.cz

Abstract

Two substances were prepared in this work, both with PCPCP structure motif. The motif is similar to ATP molecule, although the oxygen bridges are replaced with methylene groups. Both compounds were characterized by mass spectrometry and NMR spectroscopy. Since bis(methylenephosphonato)phosphinate is soluble in water, four pK_a values were determined. Both prepared compounds have potential to serve as chelating ligands.

Keywords: organophosphorus synthesis, reactivity, acid-base properties

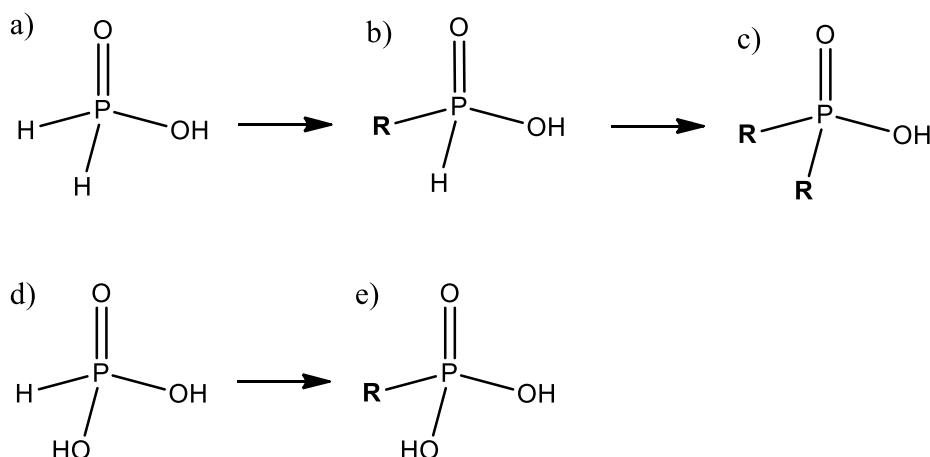
Seznam zkratek

Ac	Acetát
ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
B.v.	Bod varu
CTP	Cytosintrifosfát
dle lit.	Dle literatury
DMF	Dimethylformamid
DOTA	Kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
DTPA	Kyselina diethylenetriaminpentaoctová
ESI	Electrospray Ionization – ionizace elektrosprejem
EtOAc	Ethylacetát
EtOH	Ethanol
Et	Ethyl
GTP	Guanosintrifosfát
IT	Ion Trap – iontová past
MRI	Magnetic Resonance Imaging
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Ph	Fenyl
R	Obecný uhlíkatý zbytek
SPECT	Single-Photon Emission Computed Tomography
teor.	Teorie
UTP	Uracyltrifosfát

1. Úvod

1.1 Fosfonáty a fosfináty

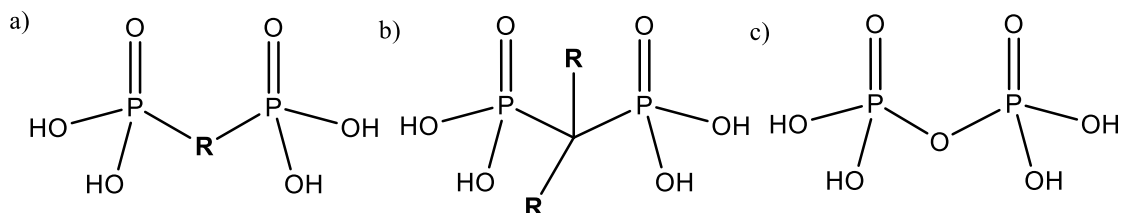
Fosfor tvoří dvě skupiny organických kyselin, kyseliny fosfinové a fosfonové. Kyseliny fosfinové jsou odvozeny od anorganické kyseliny fosforené. Vznikají náhradou jednoho nebo dvou atomů vodíku, navázaných přímo na atom fosforu, alkylem či arylem. Jedná se o jednosytné kyseliny, jejichž kyselost je ovlivněna navázaným organickými substituenty **R**. Soli těchto kyselin, vznikající náhradou atomu vodíku, vázaném na atomu kyslíku, se nazývají fosfináty. Kyseliny fosfonové jsou odvozeny od anorganické kyseliny fosforité náhradou atomu vodíku, navázaném přímo na atomu fosforu, alkylem či arylem. Jedná se o dvojsytné kyseliny, které tvoří dvě řady solí: hydrogenfosfonáty a fosfonáty, vznikající náhradou jednoho nebo dvou atomů vodíku navázaných na atomech kyslíku.



Obr. 1.1: K odvozování organických kyselin obsahujících fosfor a) kyselina fosforená b) Kyselina hydrogenfosfinová c) Kyselina fosfinová d) Kyselina fosforitá e) Kyselina fosfonová.

1.2 Bis(fosfonové) kyseliny

Sloučenin fosforu existuje velké množství. Velké pozornosti se dnes dostává sloučeninám, které obsahují dva atomy fosforu, a to jak ve formách fosfinů, fosfinoxidů nebo fosfonátů a fosfinátů. Kyseliny bis(fosfonové) jsou organofosforové sloučeniny obsahující dvě fosfonové skupiny, které jsou spojeny přes organické skupiny. Speciálním a významným případem bis(fosfonových) kyselin jsou geminální bis(fosfonové) kyseliny. Geminální bis(fosfonové) kyselin jsou strukturně podobné pyrofosfátu (Obr. 1.2).



Obr. 1.2: Sloučeniny obsahující dvě fosfonové skupiny a) Obecný vzorec bis(fosfonové) kyseliny b) Obecný vzorec geminálního bis(fosfonové) kyseliny c) Kyselina difosforečná (pyrofosfát).

Role pyrofosfátu v organismu

Pyrofosfát (sůl kyseliny difosforečné), v biochemii často značen zkratkou Ppi, je sloučenina, která hraje výraznou roli v mnoha biochemických procesech. Asi nejdůležitějším z nich je prodlužování a výstavba DNA a RNA, kdy deoxynukleotid trifosfát přistupuje k rostoucímu vláknu, váže se na něj a odstupuje z něj právě pyrofosfát. Tento proces umožňuje enzym polymeráza I. Pyrofosfát se dále může dále štěpit za pomoci enzymu pyrofosfatasa na dva samostatné fosfáty[1].

Pyrofosfát se také vyskytuje v krevní plazmě, mezibuněčné tekutině a v moči. Zde brání kalcifikaci (vyučování vápenatých solí) a může být přirozeným inhibítoem vyučování hydroxapatitu[2].

Využití bis(fosfonátů) v průmyslu

Využití bis(fosfonátů) je široké. Blízkost dvou fosfonátových skupin vede k dobrým koordinačním vlastnostem a nahrazení kyslíkatého můstku methylenem způsobuje nehydrolyzovatelnost sloučenin. Bis(fosfonáty) nacházely dříve využití v průmyslu. Díky své vysoké afinitě k různým povrchům tvořeným například uhličitanem vápenatým, oxidy titanu, hliníku nebo křemíku, byly používány jako anti-korozivní látky. Dnes se průmyslově používají jako inhibitory krystalizace uhličitanu vápenatého a hořečnatého v zařízeních, ve kterých dochází k uvolňování těchto látek z minerální vody[3].

Bis(fosfonáty) jako léky proti osteoporóze

Bis(fosfonáty) jsou biologicky stabilní a nehydrolyzovatelné. Díky tomu nacházejí široké užití v medicíně, především při léčbě kostních onemocnění. Bis(fosfonáty) totiž vykazují vysokou afinitu k jedné z hlavních složek kostní tkáně, k hydroxapatitu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)[4]. Při adsorpci bis(fosfonátu) na hydroxapatit dochází k uvolnění jedné z hydroxapatitových fosfátových skupin a inkorporaci bis(fosfonátu). Afinita bis(fosfonátu) ke kostní tkáni je ovlivněna organickými skupinami navázanými na α -uhlíku. Přítomnost hydroxidových skupin vázaných na α -uhlík nebo přítomnost protonizovatelné aminoskupiny v postranním řetězci obecně afinitu zvyšuje[5]. Bis(fosfonáty) a jejich afinitu ke kostní tkáni lze využít při léčení a potlačování příznaků osteoporózy, při které dochází buď ke zvýšené

resorpci kosti osteoklasty¹, nebo k nedostatečné tvorbě nové kosti osteoblasty². V současné době převládá názor, že bis(fosfonáty) účinkují na buněčné úrovni jako inhibitory aktivity osteoklastů, zkracují jejich životnost a uvolňují je z kosti. Dalším efektem bis(fosfonátů) na kostní tkáň je snižování rozpustnosti hydroxyapatitu, což vede k dalšímu zpomalení oslabování kostní tkáně. Geminální bis(fosfonáty) vykazují optimálnější vlastnosti pro léčbu než sloučeniny obsahující strukturální motiv P–C–C–P nebo P–N–P. Díky jejich vysoké účinnosti i afinitě ke kostní tkáni je možné podávat nižší dávky a omezit tak křehnutí kostí způsobené inkorporací bis(fosfonátů) do struktury hydroxyapatitu [4].

Účinek geminálních bis(fosfonátů) závisí na skupinách navázaných v postranních řetězcích (na methylenovém uhlíku). Přítomnost atomu dusíku v těchto řetězcích velmi ovlivňuje jejich biologické vlastnosti a působení po navázání na kost. Bis(fosfonáty) obsahující dusík ovlivňují cyklus kyseliny mevalonové, který je v buňkách zodpovědný za produkci dimethylalyl pyrofosfátu a isopentenyl pyrofosfátu, což jsou důležité stavební prvky buněčných membrán, kotvicích proteinů, hormonů a dalších pro buňku kritických látek. Princip ovlivnění tohoto cyklu spočívá v inhibici enzymu farnesyl-difosfát syntáza. Buňka vystavená tomuto léčivu postupně přestane plnit svou funkci a posléze dojde k řízené buněčné smrti – apoptóze. Další působení atomu dusíku obsahujících bis(fosfátů) je aktivace imunitních T-lymfocytů. Tyto lymfocyty uvolňují do kostní tkáně látky s cytolytickou a baktericidní aktivitou a také látky schopné účinkovat proti nádorům a vnitrobuněčným patogenům[6].

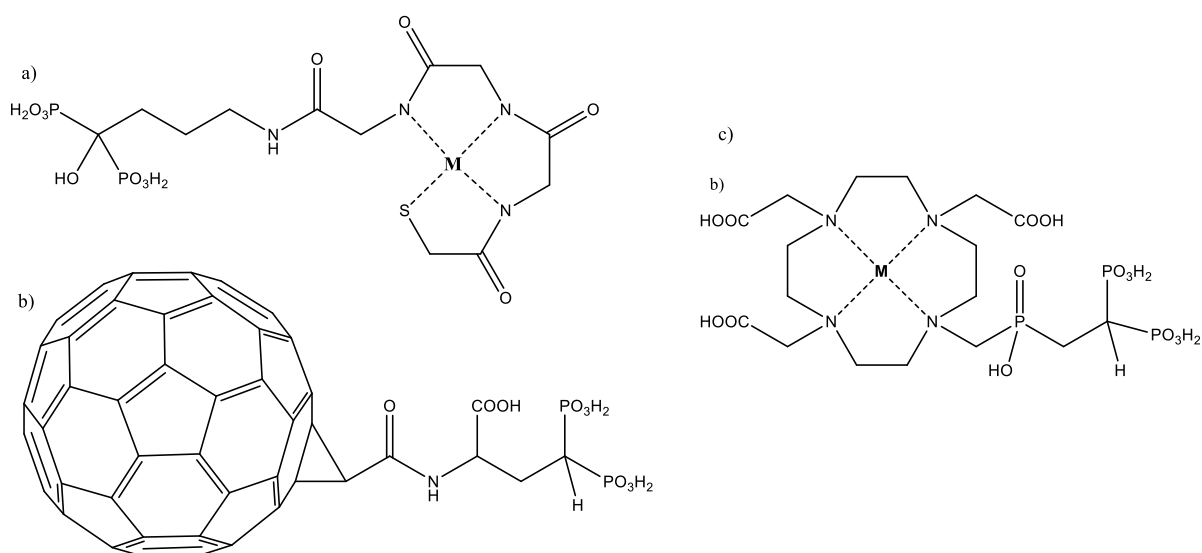
Využití bis(fosfonátů) při léčbě a zobrazování rakovinného růstu na kostech

Vysoká afinita bis(fosfonátů) ke kostní tkáni má kromě využití pro léčbu osteoporózy i další využití, a to v radiologii jak pro diagnózu (^{99m}Tc), tak pro terapie a paliativní léčbu kostních metastáz (¹⁸⁶Re)[7]. Těžké kovy, používané pro tyto druhy léčby, jsou pro lidský organizmus velmi toxické a také se dlouhodobě ukládají v různých měkkých tkáních, jako jsou játra a ledviny. Vpravování těchto látek do organismu se proto provádí většinou ve formě organokovových komplexů. Organokovové komplexy obsahující bis(fosfonát) se specificky ukládají v kostní tkáni. Bis(fosfonát) obsahující komplexy se dokonce velmi často váží přímo do míst patologického růstu nebo změn na kostech[4]. Tato místa jsou pak zobrazena pomocí tomografické scintigrafie (SPECT), což je metoda, při které se snímá gama záření vydávané radionuklidem. Jako radionuklid se většinou používá ^{99m}Tc v komplexu s methylen-

¹ Buňky odbourávající kostní tkáň

² Buňky vytvářející kostní tkáň vylučováním kolagenu I

bis(fosfonovou) kyselinou ($^{99\text{mTc}}$ -MDP), který je v dnešní době snadno dostupný. Je také možné použít složitější, (ale dražší) ligandy obsahující $^{99\text{mTc}}$ a $^{186\text{Re}}$, jako je například MAG3-HBP[8], nebo komplexy s kovem v kavitě heterocyklu (DOTA, DTPA). Také je možné dopravit radionuklid ke kostní tkáni uzavřený v kavitě hydrofilního fullerenu $\text{C}_{60}\text{OH}_{16}\text{AMBP}$ [9] (Obr 1.3). Bis(fosfonová) kyselina je k fullerenu připojena krátkým peptidovým řetězcem. Kvůli povaze těchto metod je možné pouze zobrazování anatomických informací, nelze je použít pro charakterizaci kostního povrchu ani dějů v krátkém časovém horizontu [9]. Některé ligandy, které nacházejí použití v radioterapii, je možné využít i při magnetické rezonanci (MRI), jako nosiče gadolinia, které umožňují selektivně zvýšit kontrast kostní tkáně, a zlepšit tak její zobrazení.



Obr 1.3: Ligandy umožňující transport kovů ke kostní tkáni a) MAG3-HBP b) $\text{C}_{60}\text{OH}_{16}\text{AMBP}$ c) H_8BPED , $\text{M}=\text{Tc}, \text{Re}$.

1.3 Analoga trifosfátu

Podobně jako lze strukturu geminálních bisfosfonátů odvodit od pyrofosfátu, lze odvodit strukturu kyseliny bis(methylenfosfonato)fosfinové od další biologicky významné látky, od trifosfátu.

Role trifosfátu v organismech

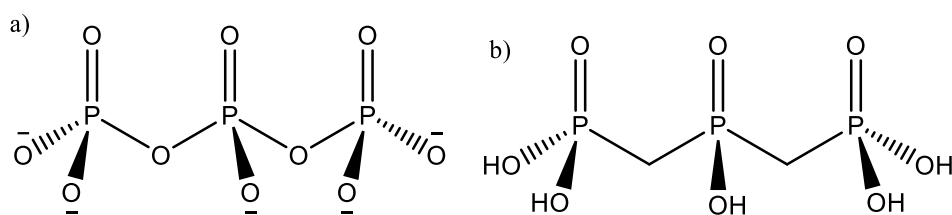
Trifosfáty, estery kyseliny trifosforečné ($\text{H}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, kondenzovaná forma kyseliny fosforečné), se vyskytují ve velkém množství biologických pochodů. Jednou z nejtypičtějším forem výskytu je molekula ATP, tvořená adenosinem (purinová báze), molekulou ribózy a třemi fosfátovými jednotkami vázanými za sebou. ATP vystupuje v biologických pochodech jako přenašeč a zásobárna chemické energie (hydrolyza vazby $\text{P}-\text{O}-\text{P}$ vede k uvolnění

energie 30,5 kJ/mol)[10]. Jeho primárním zdrojem je v aerobních organismech oxidativní fosforylace. Při tomto pochodu se využívají redukováné komplexy vytvořené v ostatních bioenergetických cyklech, jako je Krebsův cyklus, β -oxidace nebo glykolýza. Redukované komplexy jsou využívány mitochondriemi k vytvoření potenciálového spádu na různých stranách membrány. Proud vodíkových kationtů potom putuje podél tohoto potenciálu a „roztáčí“ tak enzym nazývaný ATP-syntáza, který z ADP a volného fosfátu P_i vytváří novou molekuly ATP. I když tato molekula vzniká i v jiných procesech (např. mléčné kvašení), je oxidativní fosforylace hlavním zdrojem ATP pro všechny aerobní heterotrofní organismy[1].

Kromě své podstatné role v bioenergetice vystupuje molekula ATP (a její obdoby s ostatními purinovými a pyrimidinovými bázemi, UTP, CTP, GTP) jako koenzym (kofaktor enzymu, nebílkovinná část, podstatná pro funkci) enzymů transferáz. ATP a jeho obdoby ze sebe snadno mohou odštěpit volný fosfát za vzniku ADP (např. během glykolýzy), vzácně mohou odštěpit molekulu pyrofosfátu za vzniku AMP (během syntézy pyrimidinových bází).

Struktura kyseliny bis(methylenfosfonato)fosfinové

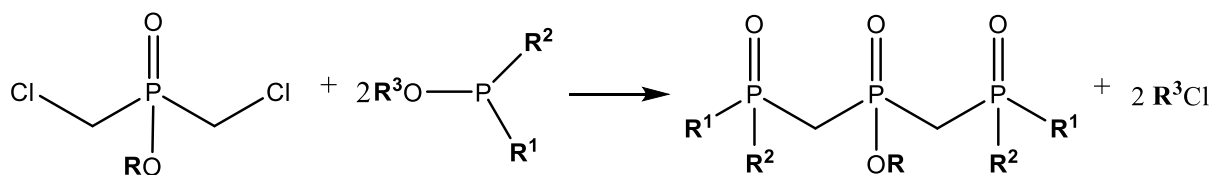
Kyselina bis(methylenfosfonato)fosfinová obsahuje ve své kostře strukturní prvek PCPCP (podobně jako geminální fosfáty obsahují strukturní prvek PCP). V případě úplné hydrolyzy se bude tedy jednat o pětisytou kyselinu (obr 1.4). Deriváty této sloučeniny jsou stejně jako bis(fosfonáty) nehydrolyzovatelné. Kyslík je nahrazen obecnou dvou vaznou skupinou $-R_2C-$, tedy methylenem, jehož atomy vodíku mohou být nahrazeny alkyly nebo aryly.



Obr 1.4: a) Trifosfát b) Kyselina bis(methylenfosfonato)fosfinová.

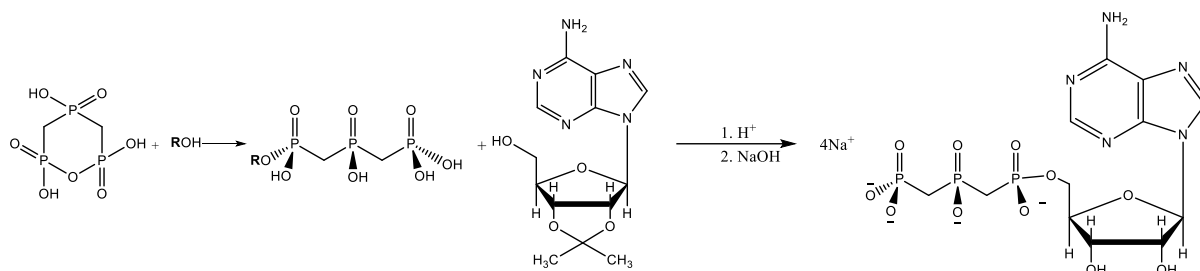
Dosavadní výzkum provedený v oblasti látek se strukturním motivem PCPCP

Podobným látkám se věnoval v 70. letech L. Maier, který připravil různé variace na tuto strukturu Michaelis-Arbusovou reakcí podle obecného schématu[11]:



Obr 1.5: Michaelis-Arbusova reakce na chlorovaném fosfinu.

Výchozí fosfinát byl připraven reakcí chloridu kyseliny bis(chlormethyl)fosfinové s alkoholy v přítomnosti terciálního aminu. Maier syntetizoval i volnou kyselinu H_3L^1 . Maierovy reakce vedou k souměrným produktům. Nesouměrné produkty, (které se více blíží biologickým molekulám jako např. ATP), lze získat otevíráním cyklických sloučenin, například otevřením cyklického anhydridu (Obr. 1.6). Reakce s jedním ekvivalentem methanolu nebo ethanolu poskytuje jedenkrát esterifikovanou kyselinu bis(methylenfosfonáto)fosfinovou. Reakcí takto připravených monoesterů s 2,3-isopropylidenadenosinem a následnou hydrolyzou je možné připravit a izolovat obdobu ATP s methylenovými můstky místo atomů kyslíku mezi atomy fosforu [12].



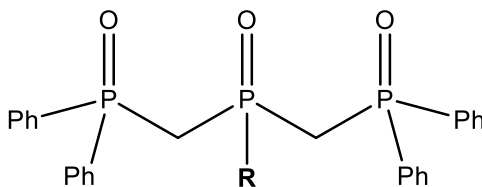
Obr. 1.6: Otevírání anhydridu HL^1 .

Látky podobné kyselině bis(methylenfosfonato)fosfinové

Látek, které obsahují kostru PCPCP, už bylo připraveno mnoho. Většinou se však jednalo o látky, které obsahovaly fosfor ve formě fosfinů nebo fosfinoxidů.

Reakce difenylfosfinoxidových ligandů (Obr. 1.7) s chloristanem nikelnatým, kobaltnatým a měďnatým vedla k izolaci několika komplexů, u nichž byly stanoveny krystalové struktury [13], [14].

K datu 10. 2. 2015 poskytuje vyhledávací software SciFinder přes 500 článků, které se zabývají látkami se strukturním motivem PCPCP. Článků zabývajících se ligandy obsahujícími fosfonátové či fosfinátové skupiny existuje řádově méně.



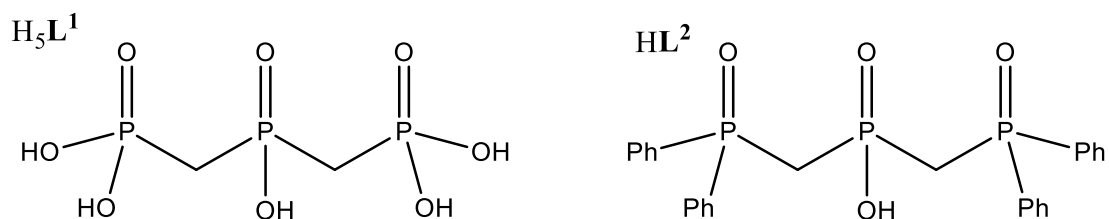
Obr.1.7: pokud $R=OC_2H_5$: bis[(difenylfosfynyl)methylen]ethyl fosfinát

$R=C_6H_5$: bis[(difenylfosfynyl)methylen]fenyl fosfinoxid

$R=OH$: bis[(difenylfosfynyl)methylen]fosfinová kyselina

1.4 Cíl práce

Tato práce byla zaměřena na syntézu a charakterizaci látek se strukturálním motivem PCPCP. Konkrétně se jednalo o dvě už v minulosti připravené látky: kyselinu bis(methylenfosfonáto)fosfinovou a kyselinu bis((difenylfosforyl)methyl)fosfinovou (Obr. 1.8). Provedené charakterizace zahrnují ^{31}P a ^1H NMR, hmotnostní spektrometrii a určení disociačních konstant.



Obr 1.8: Struktury studovaných látek.

2. Experimentální část

2.1 Seznam chemikálií

Veškeré použité chemikálie a rozpouštědla byla zakoupena z komerčních zdrojů (Sigma-Aldrich, Lachema), a pokud není přímo u experimentu popsáno jinak, nebyla dále čištěna.

2.2 Experimentální metody

Tenkvrstvá chromatografie (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna s mobilní fází EtOH:EtOAc v různých poměrech. Látky byly detekovány na fluorescenčních hliníkových destičkách pokrytých silikagelem (F₂₅₄, Merck) pomocí UV lampy a zároveň zobrazovány pomocí I₂ v SiO₂.

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR)

Veškerá spektra byla měřena na přístroji Varian VNMRS 300. Všechny vzorky byly měřeny v 5 mm kyvetách při pokojové teplotě. Jako standardy byly používány 85% H₃PO₄ v H₂O jako externí standart pro ³¹P spektrometrii a TMS pro CDCl₃ jako interní standart pro ¹H spektrometrii.

Hmotností spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie byla měřena se vzorky rozpuštěnými v methanolu na přístroji Esquire 3000. Ionizace byla prováděna metodou ESI a ionty byly detekovány pomocí IT. Byly měřeny jak pozitivní, tak negativní ionty. Pro charakterizaci byly použity pouze signály, které se podařilo interpretovat.

NMR titrace

0,3 ml roztoku látky o koncentraci 40 mM bylo přeneseno automatickou pipetou do vialky. Přidáváním 0,1 M a 0,01 M roztoků KOH a HCl bylo upraveno pH roztoku na požadovanou hodnotu. K měření pH byl použit předem zkalibrovaný pH metr. Konečná koncentrace měřené látky byla po úpravě pH 20 mM. Závislost chemických posunů signálu ³¹P{¹H} na pH poté byla vyhodnocena pomocí programu OPIUM [15], grafická forma byla vytvořena programem Microsoft Excel.

Stanovení bodu tání

Malé množství látky bylo rozdrceno na jemný prášek a přeneseno do předem připravené zespodu zatavené skleněné kapiláry (jako kapilára byl použit konec Pasteurovy pipety). Tato kapilára se vzorkem poté byla spouštěna proti pevné podložce skrz skleněnou

trubicí, aby došlo ke sklepaní vzorku na dno kapiláry. Tato kapilára byla poté umístěna do bodotávku Büchi Melting Point B-540. Bod tání vzorku byl stanoven při teplotním gradientu 3 °C za minutu.

2.3 Syntéza

Chlorid kyseliny bis(chlormethyl)fosfinové (I)[16]

Do kulaté baňky bylo odměřeno 24 g (0,8 mol) paraformaldehydu a 50 g 50 % (0,3 mol) kyseliny fosforové. Do baňky bylo dále přidáno magnetické míchadlo. Směs byla míchána a zahřívána přibližně 12 hodin na teplotu 40 °C. Po uplynutí této doby byla baňka opatřena zpětným chladičem a směs byla dva dny (za stálého míchání) refluxována. Na závěr byla reakční směs odpařena na vakuové rotační odparce při teplotě 75 °C. V reakční baňce zůstala kyselina bis(hydroxymethyl)fosfinová. Do dvouhrdlé kulaté baňky bylo nalito 40 ml SOCl₂. Baňka byla opatřena sestupným chladičem a magnetickým míchadlem, druhé hrdlo bylo uzavřeno zátkou. Chlorid sulfurylu byl přiveden k varu. Druhým hrdlem baňky byla postupně přikapána připravená kyselina bis(hydroxymethyl)fosfinová, dalších 40 ml SOCl₂ a cca 3 ml DMF. Směs byla refluxována 20 hodin. Po ochlazení byly nízkovroucí složky odpařeny na vakuové rotační odparce. Produkt byl čištěn vakuovou destilací. B. v. 100–110 °C při 40 Pa (dle lit.[11] 80–85 °C při 13 Pa). Získáno 19,6 g produktu (52 % teorie).

Charakterizace: NMR: ³¹P{¹H}(CDCl₃): δ = 51,3 ppm (s)

¹H(CDCl₃): δ = 4,04 (qd, ²J_{HCl} = 14,1 Hz ²J_{HP} = 7,3 Hz, Cl–CH₂–P)

Ethyl ester kyseliny bis(chlormethyl)fosfinové (II)[17]

61,7 g (0,34 mol) látky **I** bylo rozpuštěno v 810 ml diethyletheru (vysušeného před použitím MgSO₄) v dvouhrdlé baňce opatřené magnetickým míchadlem. Hlavní hrdlo bylo opatřeno sušící trubicí (CaCl₂), boční opatřeno gumovým septem. Za stálého míchání bylo injekční stříkačkou přidáno 81,5 ml bezvodého ethanolu a 48,5 ml triethylaminu. Směs byla 17 hodin míchána. Poté byla na fritě odfiltrována pevná složka (NHEt₃Cl) a na vakuové rotační odparce byl odpařen diethylether. Produkt byl poté oddestilován za vakua: B.v. 80–90 °C při 66 Pa (dle lit.[11] 104–106 °C při 130 Pa). Získáno bylo 51,5 g produktu (80 % teor.)

Charakterizace: **NMR:** $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 34,0$ ppm (s)
 $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 1,29$ ppm (3H, t, $^3J_{\text{HH}} = 6,0$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$)
 $\delta = 3,65$ ppm (4H, d, $^2J_{\text{HCl}} = 8,1$ Hz $^2J_{\text{HP}} = 7,1$ Hz, $\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{P}$)
 $\delta = 4,15$ ppm (2H, m, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$)

Pentaethylbis(methylenfosfonato)fosfinát Et₅L^I [16]

Trojhrdlá baňka s magnetickým míchadlem a zpětným chladičem byla třikrát naplněna argonem a evakuována. V protiproudu argonu byla opatřena septem a zátka na chladiči byla vyměněna za bublačku naplněnou nujolem. Septem a injekční stříkačkou bylo do baňky vneseno 5,0 g (0,028 mol) látky **II** a 17,4 g (0,10 mol) triethylfosfitu. Poté byla reakční směs zahřívána na 180 °C a míchána 20 h. Reakční směs byla po ukončení zahřívání rozdělena na kugleröhru (220 °C, 86 Pa). Frakce obsahující produkt byla rozpuštěna v cca 20 ml CHCl_3 a dvakrát promyta 30 ml 1% K_2CO_3 . Organická fáze byla odpařena na rotační vakuové odparce. Byla získána viskózní nažloutlá kapalina, množství 6,0 g (58 % teor.).

Charakterizace: **NMR:** $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 60,7$ ppm (2P, d, $J_{\text{PP}} = 11,7$ Hz, $-\text{PO}_3$)
 $\delta = 37,9$ ppm (1P, t, $J_{\text{PP}} = 11,7$ Hz, $-\text{PO}_2-$)
 $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 1,26$ ppm (15H, m, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$)
 $\delta = 2,80$ ppm (4H, dd, $^2J_{\text{HP}} = 20,3$; 18,7 Hz, $\text{P}-\text{CH}_2-\text{P}$)
 $\delta = 4,18$ ppm (10H, m, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$)

Kyselina bis(methylenfosfonato)fosfinová H₅L^I [16]

3,0 g (7,6 mmol) $\text{Et}_5\text{L}^{\text{I}}$ bylo rozpuštěno ve 40 ml 35% HCl v kulaté baňce. Ta byla opatřena zpětným chladičem a magnetickým míchadlem. Směs byla refluxována 8 hodin. Po ukončení zahřívání byla směs odpařena na rotační vakuové odparce, zbylý olej byl znovu rozpuštěn v cca 50 ml vody a opět odpařen. Během odpařování došlo k přechodu části produktu do odparky. V baňce zůstalo 1,6 g (6,3 mmol, 82 % teor.) žlutě zbarvené velmi viskózní kapaliny.

Charakterizace: **NMR:** $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}(\text{H}_2\text{O}, \text{pH} = 2,1)$: $\delta = 19,1$ ppm (2P, d, $^2J_{\text{PP}} = 11,5$ Hz $-\text{PO}_3$)
 $\delta = 38,4$ ppm (1P, t, $^2J_{\text{PP}} = 11,5$ Hz, $-\text{PO}_2-$)
 $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 5,00$ ppm (4 H, t, $^2J_{\text{HP}} = 19,0$ Hz, $\text{P}-\text{CH}_2-\text{P}$)
 $\delta = 7,39$ ppm (7,4 H, s, $-\text{OH}$)
MS: (-): 234,4 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}, \text{H}]^-$
252,5 $[\text{M}-\text{H}]^-$

Ethyl difenylfosfinit

50,0 g (0,22 mol) chlordinfenylfosfinu bylo rozpuštěno v 170 ml bezvodého hexanu a necháno vychladit v lednici. Dále bylo v kulaté litrové baňce rozpuštěno 20,0 g (0,44 mol) EtOH a 30,0 g (0,30 mol) Et₃N v 500 ml bezvodého hexanu. Do této baňky byl za chlazení přikapán připravený roztok chlordinfenylfosfinu v hexanu. Směs byla za stálého chlazení ledovou lázní míchána 4 hodiny. Poté byla za studena zfiltrována na fritě (odstranění vyloučeného Et₃NHCl). Filtrát byl poté vakuově destilován, jímána byla frakce B.v.: 110 °C při 30 Pa (dle lit.[18] 152 °C při 200 Pa). Bylo získáno 24,0 g (0,10 mol, 45 %) čistého ethyl difenylfosfinitu.

Ethylbis((difenylfosforyl)methyl)fosfinát EtL²[11]

24,0 g (0,10 mol) ethyl difenylfosfinitu bylo převedeno do trojhrdlé baňky, ta byla třikrát naplněna argonem a evakuována. V protiproudu argonu byla opatřena gumovým septem. Baňka byla v olejové lázni zahřáta na 170 °C. Injekční stříkačkou bylo skrze septum přidáno 5,0 g (20 mmol) látky **II**. Reakční směs byla 5 hodin míchána za teploty 170 °C. Po ukončení reakce v baňce zůstal velmi tuhý olej, který během noci přešel v bílou pevnou látku (29,0 g). 1,0 g této látky byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Eluce 900 ml směsi EtOH:EtOAc 1:5, velikost jímáných frakcí 25 ml. Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu (20 ml) a promyt 30 ml vody. Chloroform byl odpařen na rotační vakuové odparce. Výtěžek 0,3 g (80 % teor.), vzhledem k hmotnosti chromatografií čištěné směsi.

Charakterizace: **NMR:** ³¹P{¹H} (CDCl₃): δ = 20,6 ppm (2P, d, ²J_{PP} = 11,1 Hz, -POPh₂)

δ = 34,2 ppm (1P, t, ²J_{PP} = 11,1 Hz, -PO₂-)

¹H(CDCl₃): δ = 0,77 ppm (3H, t, ³J_{HH} = 6,0 Hz, -CH₃)

δ = 3,39 ppm (4H, m, P-CH₂-P)

δ = 3,77 ppm (2H, p, ³J_{HH} = 6,0 Hz, ³J_{PH} = 6,0 Hz CH₃CH₂O-)

δ = 7,48 ppm (12H, m, -Ph(*m a p*))

δ = 7,76 ppm (8H, m, -Ph(*o*))

Kyselina bis((difenylfosforyl)methyl)fosfinová HL²[11]

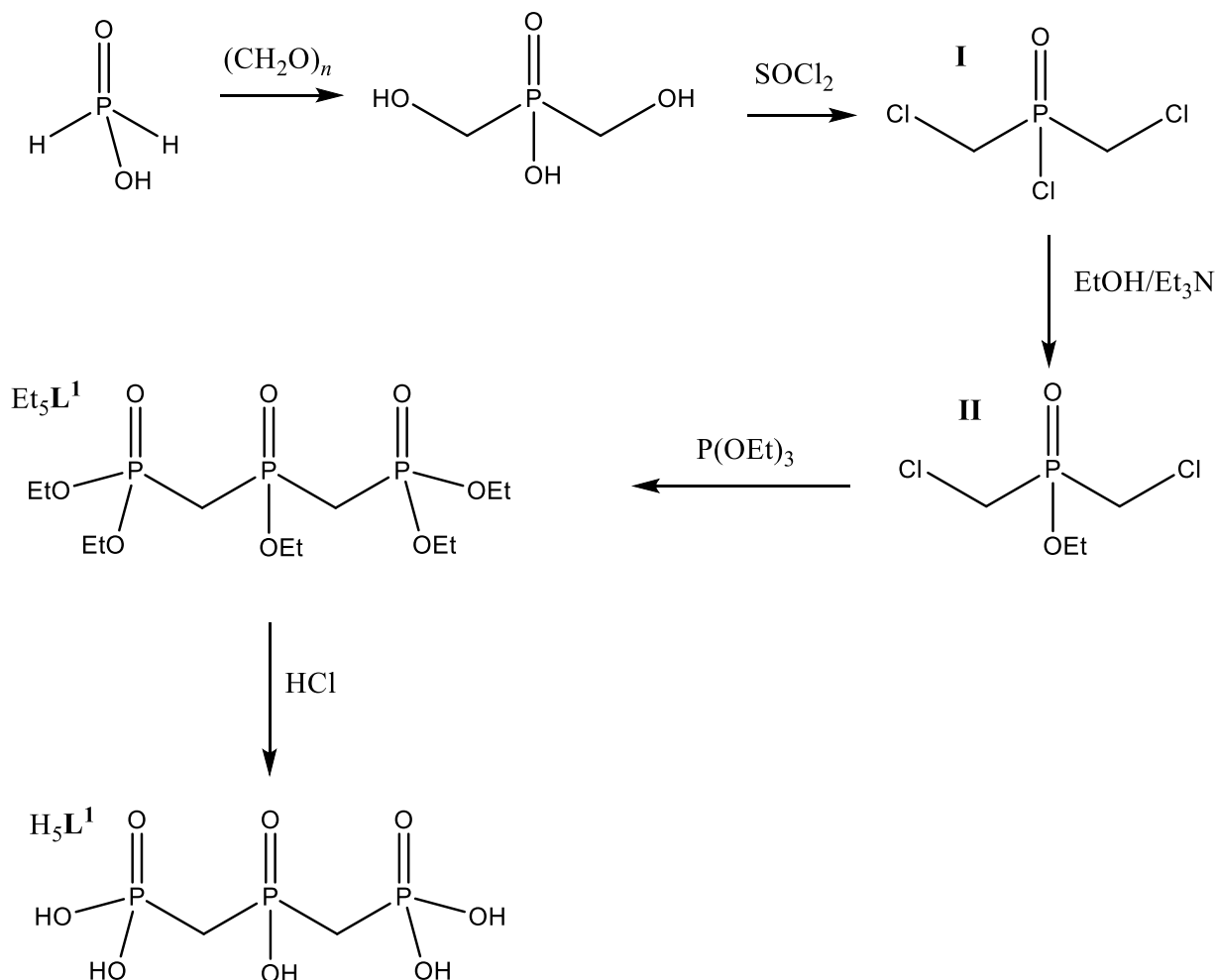
0,30 g (0,60 mmol) EtL² bylo rozpuštěno v 15 ml 35% HCl v kulaté baňce a pod zpětným chladičem refluxováno 9 hodin. Po ukončení zahřívání byla reakční směs odpařena na vakuové odparce. Po odpaření byl olejovitý zbytek rozpuštěn v minimu ethanolu a

ponechán přes noc krystalovat. Olejovitý zbytek byl rozdělen přibližně na třetiny, jedna z nich byla použita pro krystalizaci, zbylé dvě na měření NMR. Krystalizace byla provedena ve 2 ml ethanolu, olejovitý zbytek byl rozpuštěn za horka a poté nechán chladnout v baňce přes noc. Výtěžek krystalizace 15 mg, bílé krystalky, bod tání: 246 °C. Zbylý matečný louch byl odpařen, zbytek rozpuštěn v dichlormethanu a opět odpařen. Výtěžek: 0,1 g.

Charakterizace: NMR: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}(\text{CF}_3\text{COOH})$: $\delta = 32,7$ ppm (2P, d, $^2J_{\text{PP}} = 10,9$ Hz, $-\text{POPh}_2$)
 $\delta = 37,7$ ppm (1P, t, $^2J_{\text{PP}} = 10,9$ Hz, $-\text{PO}_2^-$)
 $^1\text{H}(\text{CF}_3\text{COOH})$: $\delta = 2,9$ ppm (t, $^2J_{\text{HP}} = 15$ Hz, P-CH₂-P)
 $\delta = 7,4$ ppm (12H, m, -Ph(*m* a *p*))
 $\delta = 7,8$ ppm (8H, m, -Ph(*o*))
MS: (-): 491,8 [M-H]⁻
(+): 532,7 [M+K]⁺

3. Výsledky a diskuze

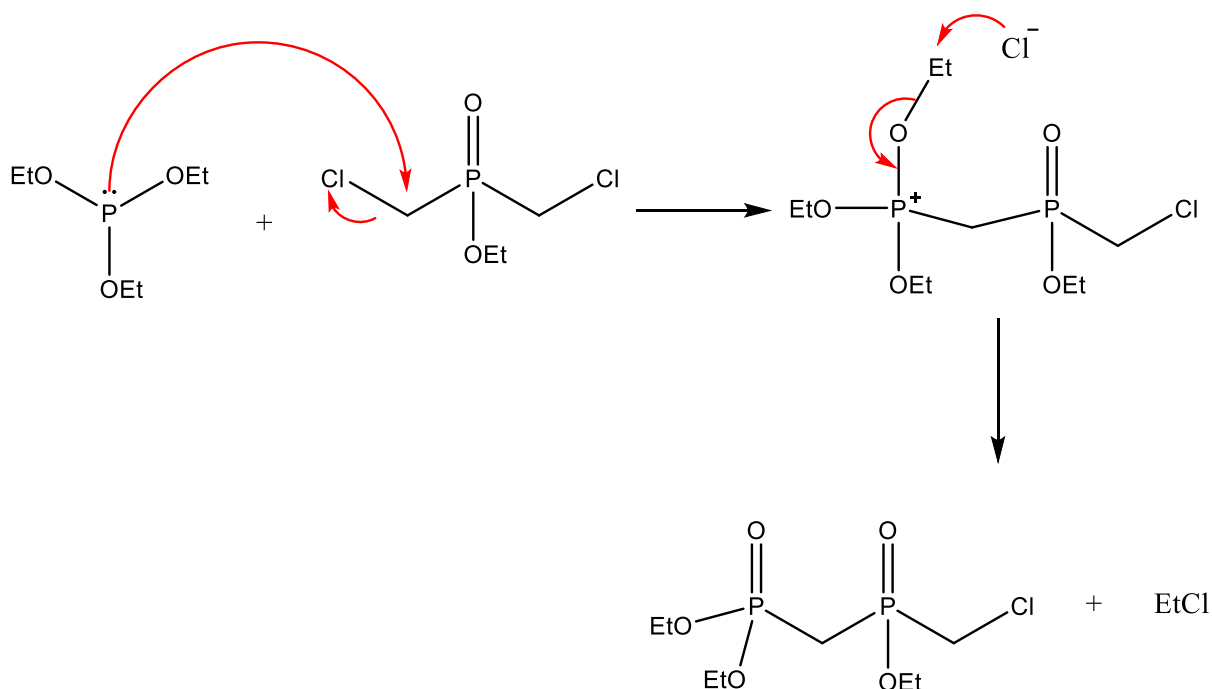
3.1 Kyselina bis(methylenfosfonato)fosfinová



Obr 3.1: Schéma syntézy H_5L^1

Kyselina bis(methylenfosfonato)fosfinová byla připravována v několika krocích. Prvním krokem byla příprava kyseliny bis(hydroxymethyl)fosfinové, která je produktem reakce kyseliny fosforové s formaldehydem při zahřívání. V reakci byl použit paraformaldehyd, který je pevný i při vyšších teplotách a lépe se s ním pracuje. Reakční směs se vzniklou kyselinou bis(hydroxymethyl)fosfinovou byla dále použita bez izolace. Dalším krokem přípravy byla výměna hydroxylových skupin za skupiny chloridové. Použitím chloračního činidla $SOCl_2$ došlo k výměně všech tří přítomných hydroxylových skupin za chlorid. Destilace reakční směsi nevedla k dokonalému rozdělení směsi, část produktu se nacházela v odpadních frakcích (dle ^{31}P NMR). V dalším kroku syntézy bylo potřeba nahradit

chloridovou skupinu vázanou na atomu fosforu skupinou esterovou. To bylo provedeno reakcí bis(chlormethyl)fosforyl chloridu v bezvodém etheru s bezvodým ethanolem za přítomnosti terciárního aminu (Et_3N). Reakci bylo potřeba provádět v suchém prostředí, které bylo vytvořeno několikanásobnou sekurací reakční aparatury. Reakce byla prováděna pod sušící trubicí naplněnou čerstvým CaCl_2 . Výsledný produkt byl opět čištěn vakuovou destilací, která vedla ke konečnému výtěžku 80 %. Tímto postupem byl připraven prekurzor pro další reakce. Látky obsahující chlormethylové skupiny jsou vhodným reaktantem pro Michaelis-Arbusovu reakci. Jde o $\text{S}_{\text{N}}2$ reakci nukleofilního fosfitu s elektronově deficitním atomem uhlíku (elektronová hustota kolem atomu uhlíku je odčerpávána směrem k atomu chloru). Mechanismus reakce je uveden na Obr. 3.2. V prvním kroku dochází k nukleofilnímu ataku fosfitu na elektronově deficitní atom uhlíku. Dochází k uvolnění chloridového iontu a vzniku fosfoniové soli. Chloridový ion v druhém kroku reakce napadá ethylovou skupinu fosfoniové soli a dochází k rozpadu vazby $\text{O}-\text{CH}_2$ a vzniku π vazby $\text{P}=\text{O}$. Výsledkem reakce je pak ethylchlorid a fosfonát vázaný na místo atomu chloru[19].



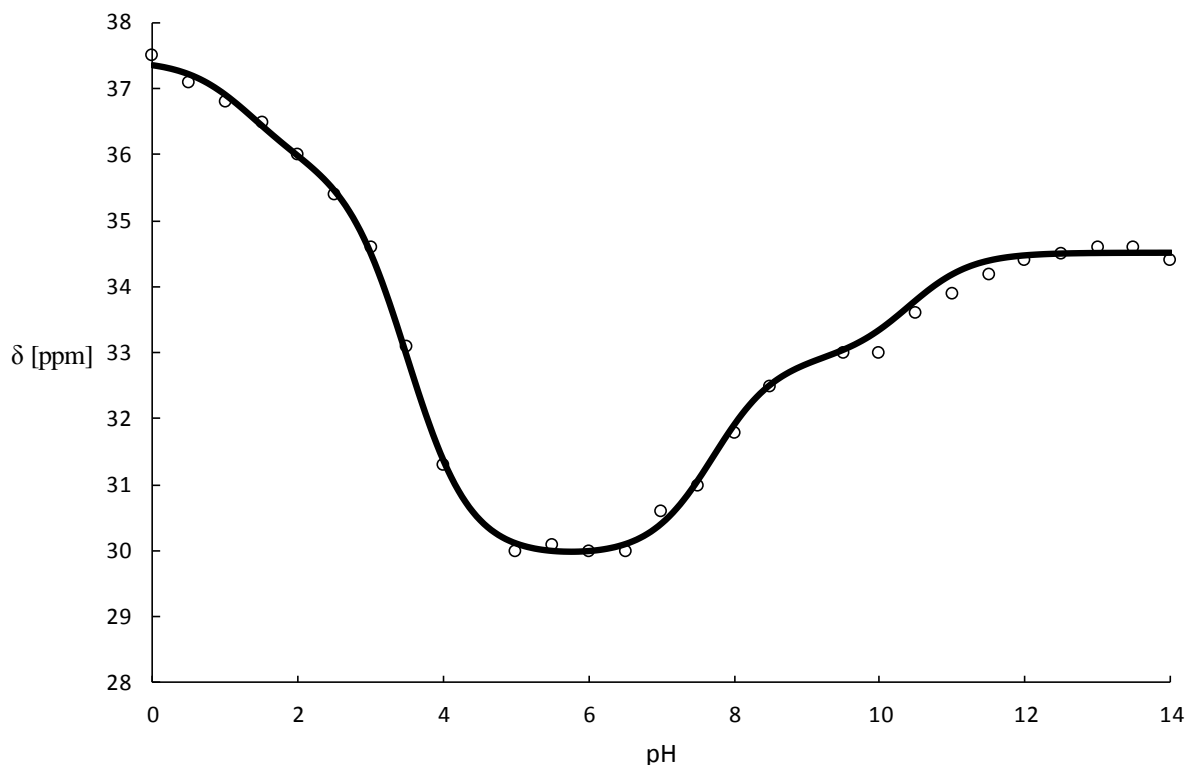
Obr. 3.2: Scéma Michelis-Arbusovy reakce, červené šipky znázorňují přesuny elektronů.

Na rozdíl od dříve publikované syntézy[11], kde byla reakce prováděna s ekvimolární směsí triethylfosfitu a látky **II**, byl jako rozpouštědlo použit velký nadbytek triethylfosfitu, tedy jednoho z reaktantů. I když byla reakce prováděna v inertním prostředí, objevily se zde vedlejší produkty, které bylo nutné odstranit vakuovou destilací. Ta neprobíhala ideálně a vedla k frakcím obsahující směsi produktů. Zvýšení čistoty frakce s látkou EtL^1 bylo dosaženo promytím této frakce rozpuštěné v chloroformu roztokem uhličitanu draselného.

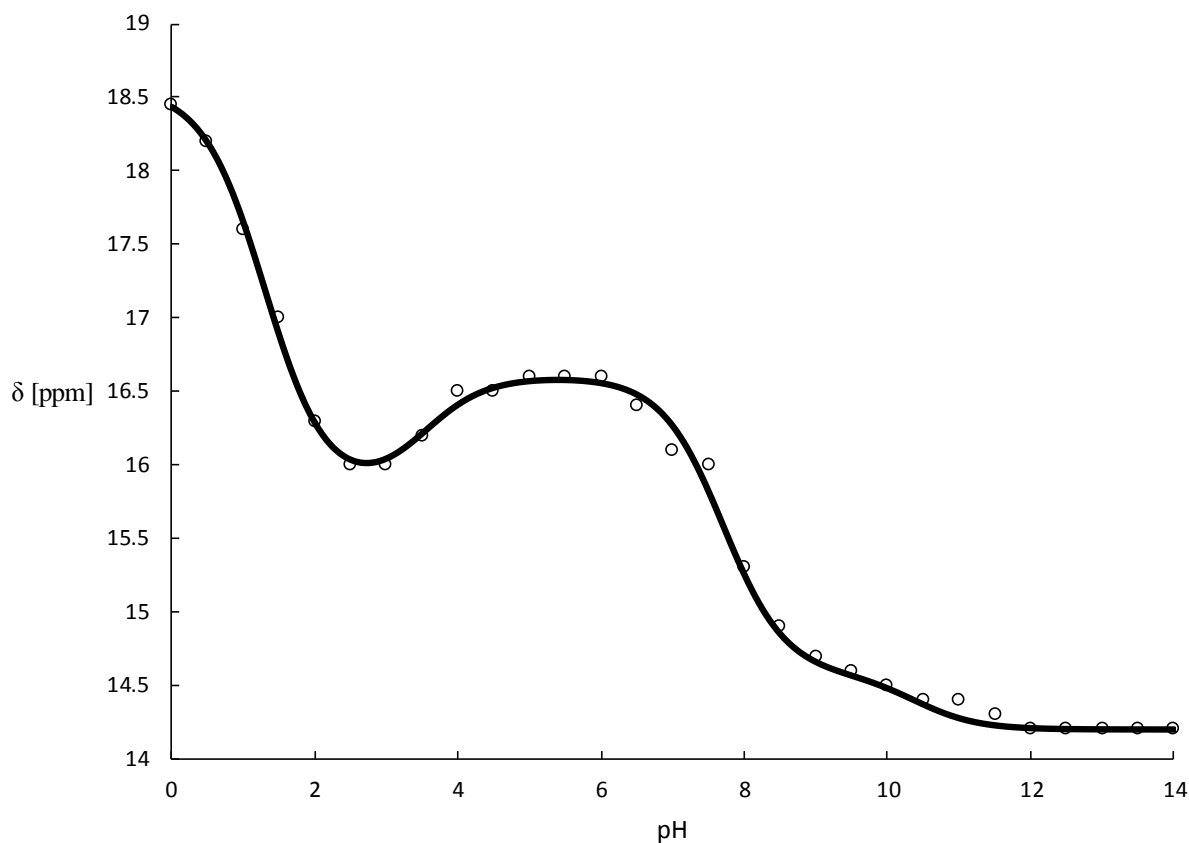
Tímto procesem bylo dosaženo čistoty látky $\text{EtL}^1 > 95\%$ dle ^{31}P NMR. Následná hydrolyzá byla prováděná dle lit.[11] koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Reflux delší než 5 hodin při použití několikanásobného nadbytku kyseliny chlorovodíkové vedl k úplné hydrolyzá produktu, jak je pozorovatelné na rozdílu v ^1H NMR, kde mizí multiplet v oblasti $\delta = 2,5$ ppm a triplet v oblasti $\delta = 1,0$ ppm. Dle ^{31}P NMR bylo dosaženo čistoty látky $>95\%$.

3.2 NMR titrace H_5L^1

Pomocí NMR titrace byly stanoveny disociační konstanty H_5L^1 . Stanovení bylo prováděno měřením změny chemického posunu atomů fosforu v roztocích, jejichž pH bylo upraveno pomocí roztoků hydroxidu draselného a kyseliny chlorovodíkové. Koncentrace H_5L^1 v roztocích činila přibližně 20 mM. Naměřená data byla poté zpracována pomocí programu OPIUM[15].

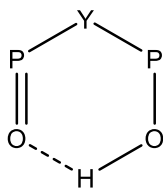


Graf 3.1: Závislost posunu signálu $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ na pH, fosfinová skupina



Graf 3.2: Závislost posunu signálu $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ na pH, fosfonové skupiny

Byly stanoveny 4 disociační konstanty, které jsou spolu s disociačními konstantami kyseliny methylen-bisfosfonové[20], kyseliny methylfosfonové[20] a kyseliny trifosforečné[20] uvedeny v tabulce 3.1. Hodnotu $\text{p}K_a$ posledního atomu vodíku se nepodařilo stanovit, ale lze předpokládat, že bude ležet v oblasti ~ 0 (nižší než předchozí konstanta). Ze srovnání látek je pozorovatelný rozdíl mezi prvními třemi látkami a kyselinou methylfosfonovou: u látek se strukturou umožňující vytvoření intramolekulárních vodíkových můstku (vedoucí k šestičlenným kruhům) dochází ke stabilizaci a zvýšení disociačních konstant (Obr 3.3). Zároveň H_5L^1 i kyselina methylen-bis(fosfonová) vykazují vyšší disociační konstanty než kyselina trifosforečná, což je způsobeno zvýšením elektronové hustoty na atomech fosforu náhradou kyslíkatých můstku za methylenové.

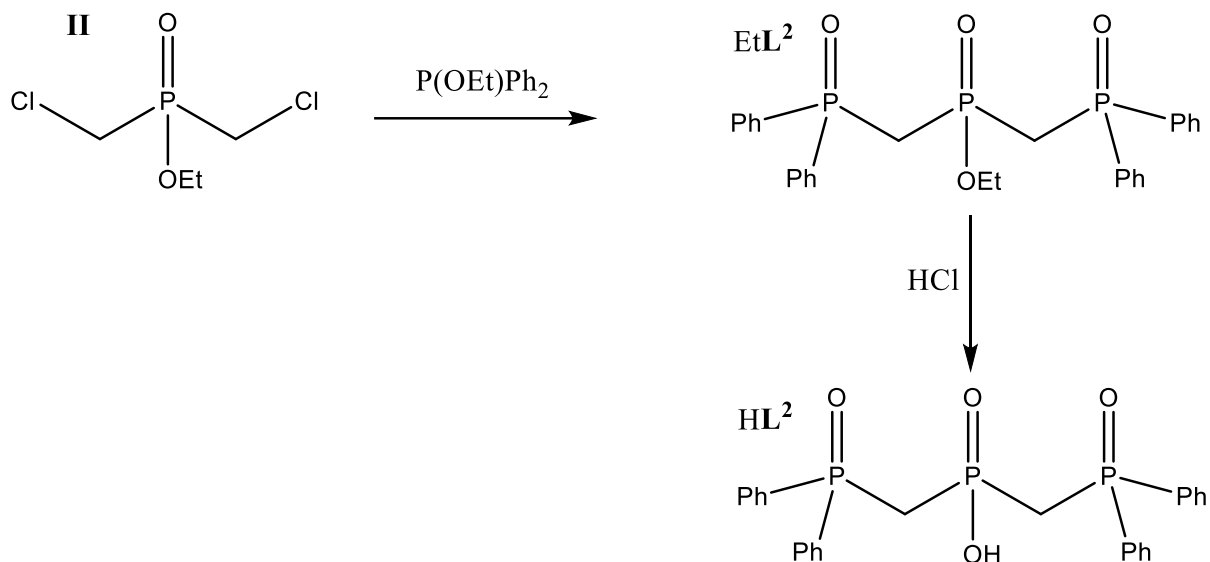


Obr 3.3: Vytvoření intramolekulárního vodíkového můstku, $\text{Y}=\text{O}/\text{CH}_2$, další vazby atomů fosforu nejsou zakresleny

	H_5L^1	Kyselina methylenbis- (fosfonová)	Kyselina trifosforečná	Kyselina methylfosfonová
$pK_a(HL)$	$10,7 \pm 0,1$	10,2	7,67	7,52
$pK_a(H_2L)$	$7,7 \pm 0,1$	6,83	5,33	2,1
$pK_a(H_3L)$	$3,5 \pm 0,1$	2,77	1,9	—
$pK_a(H_4L)$	$1,33 \pm 0,1$	1,6	~1	—

Tab. 3.1: Srovnání disociačních konstant organofosforových kyselin

3.3 Kyselina bis((difenylofosforyl)methylen)fosfinová kyselina



Obr 3.4: Schéma přípravy HL^2

Ze stejného prekurzoru (látka **II**) jako H_5L^1 byla připravena látka obdobná, kyselina bis(difenylofosforyl)fosfinová. Reakce ethyl difenylofosfinitu s prekurzorem **II** byla provedena stejným způsobem jako s H_5L^1 , v nadbytku ethyl difenylofosfinitu. Tento nadbytek nebylo možné odstranit vakuovou destilací, a proto byla použita sloupcová chromatografie na silikagelové koloně. Během reakce nebyla pozorována hydrolyza ester, která byla v dříve popsána[11]. Látku HL^2 je však možné krystalizovat z ethanolu, kdy tvoří bílé krystalky. Kvůli velké nerozpustnosti látky v standardních NMR rozpouštědlech byla pro NMR charakterizaci rozpuštěna v kyselině trifluorooctové.

3.4 Závěr

V rámci této bakalářské práce byly připraveny dvě látky, kyselina bis(methylenfosfonáto)fosfinová a kyselina bis((difenylofosforyl)methyl)fosfinová. Byla získána charakterizační data, především disociační konstanty pro H_5L^1 . Tyto látky mohou představovat základ pro další zkoumání, ať už jejich případná redukce na fosfiny či fosfinoxidy, nebo substituce atomů vodíku na methylenových můstcích. U všech těchto látek se dají předpokládat dobré koordinační vlastnosti.

Reference

- [1] M. Stiborová and D. Sofrová, *Základní kurz biochemie*. Praha, 2009.
- [2] A. M. Ho, M. D. Johnson, and D. M. Kingsley, "Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis.," *Science*, **289**, 5477, 265–270, Jul. 2000.
- [3] L. J. M. J. Blomen, "History of the bisphosphonates: Discovery and history of the nonmedical use of bisphosphonates," in *Bisphosphonates on bones*, Amsterdam: Elsevier, 1995, 111–124.
- [4] H. Fleisch, *Bisphosphonates in Bone Disease*. London: Academic Press, 2000.
- [5] T. David, "Deriváty kyseliny methylen-bis(fosfonové) pro modifikaci biomolekul." Praha, 2010.
- [6] S. Galluzzo, D. Santini, B. Vincenzi, N. Caccamo, F. Meraviglia, A. Salerno, F. Dieli, and G. Tonini, "Immunomodulating role of bisphosphonates on human gamma delta T cells: an intriguing and promising aspect of their antitumour activity.," *Expert Opin. Ther. Targets*, **11**, 7, 941–954, 2007.
- [7] E. Deutsch, K. Libson, S. Jurisson, and L. F. Lindloy, "Technetium Chemistry and Technetium Radiopharmaceuticals," *Prog. Inorg. Chem.*, **30**, 75, 1983.
- [8] K. Ogawa, T. Mukai, Y. Arano, M. Ono, H. Hanaoka, S. Ishino, K. Hashimoto, H. Nishimura, and H. Saji, "Development of a rhenium-186-labeled MAG3-conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain based on the concept of bifunctional radiopharmaceuticals," *Bioconjug. Chem.*, **16**, 4, 751–757, 2005.
- [9] K. Gonzalez, "Synthesis and In vitro characterization of a tissue-Selective fullerene: vectoring C₆₀(OH)₁₆AMBP to mineralized bone," *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 6, Jun. 2002.
- [10] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, "Biochemistry." W H Freeman, 2002.
- [11] L. Maier, "Preparation and Properties of Bis(phosphonylmethyl)phosphinates and Bis(dihydroxyphosphonylmethyl)phosphinic Acid," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, **7**, 5, 384–385, May 1968.
- [12] D. B. Trowbridge, D. M. Yamamoto, and G. L. Kenyon, "Ring openings of trimetaphosphoric acid and its bismethylene analog. Syntheses of Adenosine 5'-bis(dihydroxyphosphinylmethyl)phosphinate and 5'-amino-5'-deoxyadenosine 5'-triphosphate.," *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 11, 3816–3824, 1972.
- [13] P. Bronzan-Planinić and H. Meider, "Synthesis And Characterization Of Cobalt(II), Nickel(II) And Copper (II) Perchlorate Complexes With Bis [(Diphenylph~Sphiny)Methyl]Phenylphosphine Oxide, Bis [(Diphenylphosphinyl)Methyl]Ethyl Phosphinate, And Bis [(Diphenylphosphinyl)Methyl] Phosphinic," *Polyhedron*, **2**, 2, 69–75, 1983.

- [14] P. Planinić, M. Jurić, B. Perić, and M. Herceg, "Crystal Structure and Characterization of $[\text{Ni}(\text{RPOEt})_2(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_2](\text{ClO}_4)_2$ [RPOEt = bis{(diphenylphosphinyl)methyl}ethyl phosphinate]," *J. Chem. Crystallogr.*, **40**, 10, 2010.
- [15] M. Kývala and I. Lukeš, "Chemometrics'95." Pardubice, 1995.
- [16] L. Maier, "Organic phosphorus compounds," *J. Organomet. Chem.*, **178**, 1, 157–169, Sep. 1979.
- [17] L. Maier, "Organische Phosphorverbindungen XXXVI. Darstellung und Eigenschaften von Bis-(dialkoxyphosphonyl-methyl)-, Bis-(alkoxyphosphinyl-methyl)-und Bis-(oxophosphoranyl-methyl)-phosphinsäureestern sowie der entsprechenden Säuren," *Helv. Chim. Acta*, **52**, 3, 827–845, 1969.
- [18] B. A. Arbuzov, N. A. Polezhaeva, and A. K. Vinogradova, V. S. Shamsutdinova, "Reaction products of chloroacetone and ω -bromoacetophenone with esters of diphenylphosphinous acid Title," *Russ. Chem. Bull.*, **4**, 669–678, 1965.
- [19] A. K. Bhattacharya and G. Thyagarajan, "Michaelis-Arbuzov rearrangement," *Chem. Rev.*, **81**, 4, 415–430, Aug. 1981.
- [20] A. E. Martell and R. M. Smith, "Critical Stability Constants," in *NIST Standard Reference Database 46*, Version 7., New York: Plenum Press, 2003.

Poděkování

Na závěr této práce bych rád poděkoval všem, kteří mi s jejím vytvořením pomohli. V první řadě patří dík mému školiteli a mým rodičům, bez kterých by tato práce vůbec nevznikla.

Dále bych chtěl poděkovat osazenstvu laboratoře číslo 19, za jejich ochotu mi v začátcích mé syntetické činnosti věnovat mnoho času, jmenovitě pak Ondrovi za neúnavné měření spekter a zasloučení do tajů měření NMR.