

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra ANORGANICKÉ chemie

Syntéza 1,4-fosfonátových a fosfinátových derivátů cyklenu

Synthesis of 1,4-phosphonic and phosphinic acid
derivatives of cyclen

Diplomová práce
studijního oboru Anorganická chemie

Praha 2010

Jiří Bárta

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Jana Kotka, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

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

V Praze dne 25. srpna 2010

.....

podpis

Poděkování

Děkuji svému školiteli Honzovi Kotkovi za trpělivé vedení mé práce po spletité chemické cestě, za pozitivní přístup ve zdánlivě bezvýchodných situacích, za pomoc při interpretaci spekter a za všechny konzultace, rady a čas, který mi věnoval.

Děkuji Doc. RNDr. Pavlu Vojtíškovi, CSc. za ochotu moji práci oponovat.

Dále bych chtěl poděkovat Miroslavu Pniokovi za pomoc při měření MS spekter, Vojtovi Kubíčkovi za měření MS spekter a také všem dalším kolegům z laboratoře za rady a pomoc při moji práci. Zvláště bych chtěl poděkovat těm, kteří se mnou trávili čas v laboratoři v závěrečných fázích práce, za příjemné večery na balkóně u grilování, ale i za toleranci vůči mé zpupnosti v zabírání si většiny dostupného vybavení a prostoru laboratoře. Jmenovitě děkuji Kubovi Šimečkovi, před jehož burgery blednou všechny fastfoody závistí. Dále bych mu chtěl poděkovat za rozptýlení při šachových dýcháncích v náročných pracovních dnech .

Díky si zaslouží i moji kamarádi, kteří byli ochotní přečíst si tuto práci a opravit mnou napáchané chyby.

Největší dík však patří mé rodině a přítelkyni za podporu, trpělivost a vytvoření ideálních podmínek pro moje studium a vypracování této práce.

Obsah

1. Úvod	6
1.1 Nukleární magnetická rezonance a MRI	6
1.2 MRI kontrastní látky	8
1.3 Relaxivita	9
1.3.1 Relaxivita protonu vnitřní sféry	11
1.3.2 Ladění parametrů relaxivity protonu vnitřní sféry	12
1.4 Ovlivnění rychlosti výměny vody	13
1.5 Cíl práce	17
2. Návrh syntézy	18
2.1 cis-1,4 chránění cykленu	18
2.1.1 1,4-dibenzylcyklen	18
2.1.2 1,4-bis(<i>terc</i> -butoxykarbonylmethyl)cyklen	19
2.2 Zavedení fosfonátové a karboxylové skupiny, odchránění	20
3. Experimentální část	24
3.1 Seznam použitých chemikálií	24
3.2 Metody charakterizace	25
3.3 Syntetická část	27
3.3.1 1,4-oxalylcyklen (2)	27
3.3.2 1,4-dibenzyl-7,10-oxalylcyklen (3)	27
3.3.3 1,4-dibenzylcyklen (4)	28
3.3.4 1,4-dibenzyl-7,10-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (5)	29
3.3.5 1,4-dibenzyl-7,10-bis(fosfonomethyl)cyklen (6)	30
3.3.6 1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen (7a)	32
3.3.7 1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (7b)	34
3.3.8 1,4-bis(fosfonomethyl)-7,10-bis(karboxymethyl)cyklen (8)	35
3.3.9 1,4-bis(diethylfosfonomethyl)-7,10-bis(etoxykarbonylmethyl)- cyklen (9)	37
3.3.10 1,4-bis(monoethylfosfonomethyl)-7,10-bis(karboxymethyl)- cyklen (10)	38
3.3.11 1,4-dibenzyl-7,10-bis(fosfinomethyl)cyklen (11)	39
3.3.12 1,4-bis(fosfinomethyl)cyklen (12)	40

3.3.13	1,4-dibenzyl-7,10-bis(monoethylfosfonomethyl)cyklen (13)	41
3.3.14	1,4-bis(diethylfosfonomethyl)oxalylcyklen (14)	42
3.3.15	1,4-bis(monoethylfosfonomethyl)cyklen (15)	43
3.3.16	1,4-bis(etoxykarbonylmethyl)-7,10-oxalylcyklen (16)	44
3.3.17	1,4-bis(etoxykarbonylmethyl)cyklen (17)	45
3.3.18	1,4-dibenzyl-7,10-bis(<i>tert</i> -butoxykarbonylmethyl)cyklen (18)	46
3.3.19	1,4-bis(<i>tert</i> -butoxykarbonylmethyl)cyklen (19)	47
4.	Výsledky a diskuze	48
4.1	Chránění	48
4.2	Oxalylcyklenová cesta	49
4.3	Dibenzylová cesta	50
4.3.1	Fosfonátové deriváty	50
4.3.2	Karboxylové deriváty	52
4.3.3	Fosfinátové deriváty	53
5.	Závěr	54
6.	Seznam zkratk	55
7.	Seznam použité literatury	57

1. Úvod

1.1 Nukleární magnetická rezonance a MRI

Rozvoj fyziky na počátku 20. století zapříčinil vznik úplně nového odvětví medicíny, kterým se stalo zobrazování vnitřní stavby člověka v téměř reálném čase. Nejprve se jednalo o Roentgenovy paprsky X (objeveny roku 1895), v polovině 20. století se začal využívat ultrazvuk, dále pozitronová emisní tomografie (PET, koncept odhalen v 50. letech), jednofotonová emisní tomografie (SPECT) a v neposlední řadě také tomografie magnetické rezonance (MRI), jejímž základem je nukleární magnetická rezonance (NMR).

NMR je široce rozšířenou analytickou technikou používanou v mnoha odvětvích, např. farmacii, ropném průmyslu a biochemii. Dá se využít pro měření kapalných i pevných vzorků.

Základním principem této metody je interakce magnetického pole se spinem atomových jader. Využívá se k zjišťování fyzikálních, chemických, elektronických a strukturních vlastností molekul a také poskytuje detailní informace o jejich 3D struktuře. Poprvé byla tato metoda popsána v roce 1946 Felixem Blochem^[1] a Edwardem Millsem Purcellem^[2], kteří nezávisle na sobě objevili, že konkrétní atomová jádra jsou schopna absorbovat elektromagnetické záření o určité frekvenci, pokud jsou vložena do vnějšího magnetického pole, a tato frekvence je různá pro každý atom v molekule. V roce 1952 jim byla za tento objev udělena Nobelova cena za fyziku. Dnes patří NMR mezi nejvyužívanější metody analýzy nově připravených látek.

Při vložení objektu do magnetického pole se spiny jader atomů s nenulovým spinovým číslem (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F) zorientují vzhledem k vektoru intenzity magnetického pole a rozdělí se přitom na dvě energetické hladiny. Rozdíl v populaci jednotlivých hladin (už jeden z milionu) vytvoří detekovatelnou změnu. Magnetické dipólové momenty jader rotují okolo axiálního vektoru statického magnetického pole s tzv. Larmorovou frekvencí. Pozorovaný objekt je vystaven pulsům elektromagnetického záření ve směru kolmém na vektor statického magnetického pole, což způsobuje dočasnou rezonanci energetických hladin magnetických dipólů, a díky tomu dochází k vyrovnání populací. Frekvence potřebná k rezonanci konkrétního jádra je definovaná rovnicí (1):

$$n = \frac{g_l B_0}{2p} \quad (1)$$

kde B_0 je velikost vnějšího magnetického pole a g_l je gyromagnetický jaderný poměr.

Po ukončení pulsu elektromagnetického záření nastává tzv. *populační relaxace*. Během tohoto procesu se jádra vracejí do svého termodynamicky výhodnějšího stavu v magnetickém poli a požadovaný signál vyzářený jádry během relaxace je zaznamenáván vysokofrekvenčními cívkami. Jádra relaxují dvěma způsoby, první se nazývá longitudinální (T_1) a druhý transverzální (T_2). Po zrelaxování systému se může měření opakovat, neboť se objekt nachází v původním stavu.

Objev NMR vedl k vývoji velice výkonné diagnostické metody nazývané nukleární magnetická tomografie (též tomografie magnetické rezonance), často zkracované jako MRI (z anglického magnetic resonance imaging). Dříve se i v anglickém názvu vyskytovalo slovo „nukleární“ (nuclear), ale v 70. letech nabylo negativního významu evokujícího vystavení radioaktivnímu záření a bylo tedy vypuštěno. V novodobém lékařství se MRI stala hojně využívanou technikou k vytváření přesných obrazů měkkých tkání a orgánů. Touto metodou se dají získat 2D a 3D obrazy různých orgánů v živých organismech a demonstrovat tak patologické nebo fyziologické změny tkáně. Pro MRI využívanou v lékařství je základem NMR studium jader atomů vodíku vázaných v molekule vody.

Pro získání MRI obrazu je však nutné s informací o relaxaci tkáně zaznamenat i prostorovou informaci, a proto se aplikují tři ortogonální magnetické gradienty. Typické rozlišení MRI je okolo 1 mm³.^[3] V klinické praxi se často MRI využívá k rozlišení patologických tkání (jako je např. nádor) od zdravých. Největší výhodou je, že se nejedná o invazivní metodu, narozdíl od tradičního rentgenologického vyšetření, které může při několikanásobné aplikaci dokonce zvýšit zhoubnost nádoru.

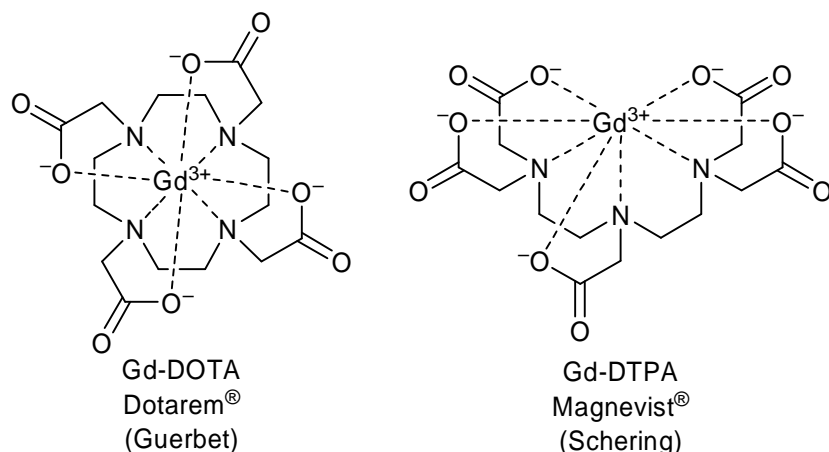
Magnetická pole využívané v MRI se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 3 T, což odpovídá rozpětí Larmorovy frekvence od 25 do 125 MHz.^[4] I když komerční dodavatelé již investovali do zařízení s 4,7 T (200 MHz), 7 T (300 MHz) a dokonce 11.7 T (500 MHz).^[5]

Existuje několik specializací MRI, např. angiografie^[6] (slouží k monitorování cév), difúzní MRI^[7] (měří difúzi vody v tkáni) nebo funkční MRI^[8] (měří změny signálu tkáně v důsledku změny aktivity tkáně).

1.2 MRI kontrastní látky

MRI obraz se vytváří z rozdílu v koncentracích protonu a rozdílu relaxačních časů (T_1 , T_2) v různých tkáních. Bylo zjištěno, že s přidavkem některých paramagnetických iontů (typicky Mn^{II} nebo Gd^{III} iontů) se v mnoha případech zvyšuje senzitivita nebo specifita zobrazení. Při použití paramagnetické látky se výrazně zvyšuje rozlišovací schopnost tkání v MRI, jak demonstroval Paul C. Lauterbur (Nobelova cena v roce 2003).^[9] Zvýšení se dosáhne tehdy, má-li některá tkáň větší afinitu nebo vaskularitu než ostatní. Většina nádorů má vyšší vyživovací nároky než zdravá tkáň a díky tomu vstřebává větší množství kontrastní látky, což vede k viditelnému kontrastu v MRI obrazu.

Vodné aqua ionty kovů jsou většinou značně toxické,^[10] proto se v klinické praxi často využívají jejich komplexy s ligandy typu polyaminokarboxylátů. Pro tyto komplexy se obecně používá označení *kontrastní látky*. Chovají se buď jako T_1 kontrastní látky, které zvyšují signál a vytváří „pozitivní“ kontrast, nebo T_2 kontrastní látky, které snižují signál a vytváří „negativní“ kontrast. Přítomnost pozitivní kontrastní látky se projeví zesvětlením na MRI obrazu. Jedná se obvykle o nízkomolekulární sloučeniny obsahující ionty Gd^{III} nebo Mn^{II} , které mají nespárované elektrony ve valenční vrstvě a dlouhé elektronové relaxační časy. Příkladem pozitivních kontrastních látek jsou komerčně dostupné cheláty Gd^{III} s ligandy 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctovou kyselinou (DOTA) a diethylentriaminpentaoctovou kyselinou (DTPA) – Dotarem[®] a Magnevist[®] (Obrázek 1), nejčastěji používané jako nespecifické kontrastní látky pro zobrazování lebeční a páteřní oblasti, nebo Manganofodipir trisodium[®] využívaný k zobrazování jater.^[3] Přítomnost negativní kontrastní látky se projeví ztmavnutím na MRI obrazu. Jejich reprezentanty jsou většinou malé agregáty nazývané „superparamagnetic iron oxides“ (SPIO), jejímž představitelem je nanokrystalický Fe_2O_3 .^[11] Tato diplomová práce je motivována pozitivními kontrastními látkami obsahujícími Gd^{III} a je především zaměřena na syntézu fosfonátových analogů ligandu DOTA.



Obrázek 1

Komerčně dostupné v klinické praxi užívané kontrastní látky.
 (Koordinované molekuly vody byly pro přehlednost vynechány.)

1.3 Relaxivita

Nejčastějšími T_1 kontrastními látkami jsou komplexy Gd^{III} . Kation Gd^{III} má sedm nespárovaných elektronů a díky tomu značný paramagnetický příspěvek. Navíc v základním elektronovém stavu vykazuje **S** symetrii, která způsobuje pomalou elektronovou relaxaci, což je velmi důležité pro efektivitu kontrastní látky. V principu mají používané cheláty Gd^{III} jedno koordinační místo obsazené molekulou vody (tzv. voda vnitřní, též koordinační sféry – *Obrázek 2*). Paramagnetické centrum v blízkosti molekuly vody zkracuje její longitudiální a transverzální relaxační časy (T_1 , T_2). Pozorované relaxační časy ($T_{1,poz}$, $T_{2,poz}$) roztoku se potom skládají z diamagnetického (T_{1d} , T_{2d} – relaxační časy roztoku bez paramagnetické látky) a paramagnetického (T_{1p} , T_{2p} – způsobeny přítomností komplexu Gd^{III}) příspěvku. Solomon, Bloembergen a Morgan navrhli teorii (SBM teorie) popisující relaxaci jader rozpouštědla v přítomnosti paramagnetické látky. Podle této teorie je pozorovaná rychlost relaxace ve zředěných roztocích popsána rovnicí (2):

$$\frac{1}{T_{i,poz}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}}; \text{ kde } i = 1,2 \quad (2)$$

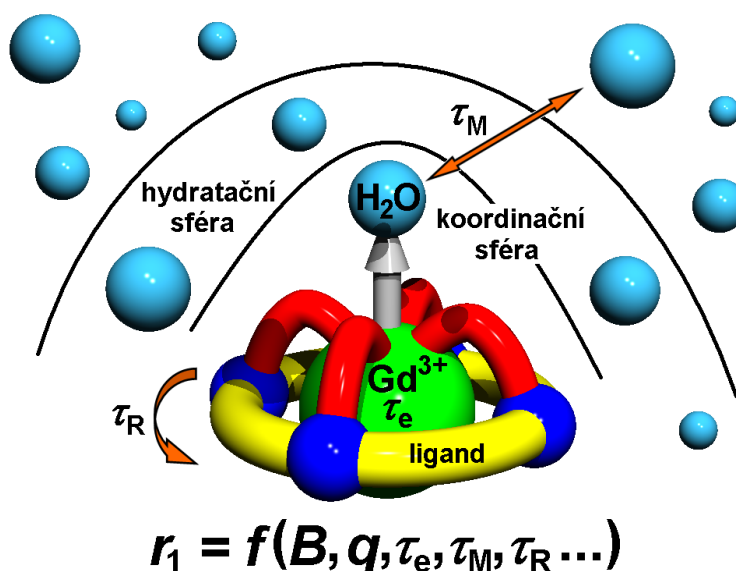
Protože paramagnetický člen je přímo úměrný koncentraci Gd^{III} , rovnici (2) lze psát ve tvaru rovnice (3):

$$\frac{1}{T_{i,poz}} = \frac{1}{T_{i,d}} + r_i[Gd]; i = 1,2 \quad (3)$$

Člen r_i se nazývá relaxivita. Jedná se o měřitelnou veličinu přímo odpovídající

efektivitě kontrastní látky. Jelikož jsou v MRI měřena vodíková jádra vody, rovnice (3) nejčastěji popisuje jejich relaxaci a člen r_i je pak nazýván *relaxivitou protonu*. Relaxivita se skládá z příspěvků vnitřní sféry (koordinační sféry), druhé sféry (hydratační sféry) a vnější sféry (Obrázek 2), což popisuje rovnice (4):

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{SS} + r_i^{OS}; i = 1,2 \quad (4)$$



Obrázek 2

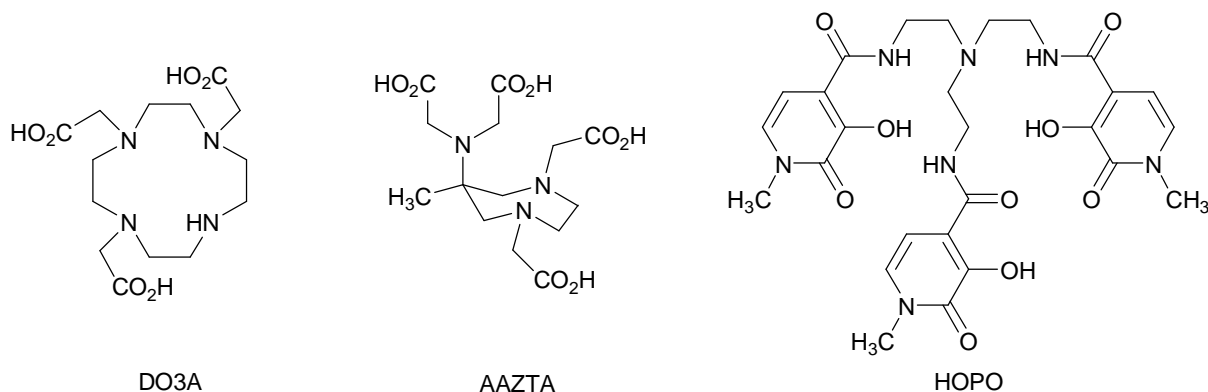
Mikroskopické parametry ovlivňující relaxivitu gadolinitých komplexů.^[12]

Molekula vody koordinovaná přímo k iontu Gd^{III} v paramagnetickém komplexu se vyměňuje s molekulami vody v roztoku a přenáší tak do roztoku paramagnetickou informaci. Tento proces je tzv. *příspěvkem vnitřní sféry* (r_i^{IS}). Molekuly roztoku mohou být také ovlivněny paramagnetickým iontem během difúze, kdy se dostanou dostatečně blízko k iontu kovu, což je tzv. *příspěvek vnější sféry* (r_i^{OS}). Speciálním případem příspěvku vnější sféry je tzv. *příspěvek druhé sféry* (r_i^{SS}), který se vyskytuje u určitých typů chelátů, kde se kromě vody přímo koordinované na ion kovu vyskytují také další molekuly vody vázané v blízkosti paramagnetického centra jinými interakcemi, např. vodíkovou vazbou.^[13] Tato interakce poskytuje molekule vody dostatek času, aby na ni byla přenesena paramagnetická informace a ta byla takto dále rozšířena do roztoku. Avšak oproti přímo koordinované molekule vody je čas molekuly v druhé sféře strávený u paramagnetického iontu ztelně kratší a i vzdálenost od centra je větší, díky čemuž je příspěvek k celkové relaxivitě značně menší. Příspěvky vnější a druhé sféry ovlivňují celkovou relaxivitu přibližně stejně,

každý asi z 20 %. Zatímco příspěvek vnější sféry se nedá ovlivnit, neboť závisí převážně na difúzi, příspěvky vnitřní a druhé sféry závisí na povaze chelátu, a proto se designu nových ligandů věnuje velká pozornost.

1.3.1 Relaxivita protonu vnitřní sféry

Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím relaxivitu vnitřní sféry je počet molekul vody koordinovaných k jednomu chelátu s Gd^{III} (q). Relaxivita je přímo úměrná počtu koordinovaných molekul vody, což znamená, že pokud zvýšíme q dvojnásobně, zdvojnásobí se i relaxivita. Děje se tak často snížením vaznosti ligandu z 8 na 7 (typické koordinační číslo Gd^{III} je 9), uvolní se tedy další koordinační místo pro molekulu vody. Důvodem, proč se v současně používaných kontrastních látkách nevyskytují vyšší hydratační čísla než jedna, je pokles termodynamické a hlavně kinetické stability komplexu a pokles *in vivo* relaxivity při záměně molekul vody za bifunkční chelatanť vyskytující se přirozeně v lidském těle (fosfát, karbonát, aminokyseliny).^[14,15] Příklady chelatanťů umožňujících koordinaci dvou molekul vody v chelátu obsahujícím Gd^{III} jsou uvedeny na *Obrázku 3*, z nichž zvláště AAZTA a HOPO se jeví jako velice perspektivní.^[16,17,18]



Obrázek 3

Ligandy tvořící s Gd^{III} cheláty s dvěma koordinovanými molekulami vody.

Další neméně důležité parametry, které ovlivňují relaxivitu vnitřní sféry, jsou rychlost výměny molekuly vody mezi vnitřní sférou a roztokem (popisovaná rychlostní konstantou k_{ex} , nebo její reciprokou hodnotou nazývanou *rezidenčním časem vody* označovaným jako τ_M), rotační korelační čas (τ_R) popisující přeorientování vektoru kov-proton a časy relaxace elektronových spinů (T_{1e}, T_{2e}). Jelikož je tato práce zaměřena pouze na pozitivní kontrastní látky, bude od tohoto místa termínu *relaxivita*

používáno ve smyslu longitudinální relaxivity protonu r_1 , rovnici (4) můžeme tedy psát ve tvaru rovnice (5):

$$r_1 = r_1^{\text{IS}} + r_1^{\text{SS}} + r_1^{\text{OS}} \quad (5)$$

1.3.2 Ladění parametrů relaxivity protonu vnitřní sféry

Jedním z odvozených parametrů ovlivňujících relaxivitu je také relaxační čas protonu koordinované molekuly vody (T_{1M}), který je závislý na rotačním korelačním čase (τ_R), časech elektronové relaxace (T_{1e} a T_{2e}) a rychlosti výměny vody k_{ex} . Při rozpouštění kontrastní látky v roztoku mohou nastat dvě limitní situace. V případě, že se koordinovaná voda vyměňuje velice pomalu s molekulami roztoku ($\tau_M \gg T_{1M}$), rychlost výměny vody se stává limitujícím faktorem relaxivity. V opačném případě ($T_{1M} \gg \tau_M$) je limitujícím faktorem relaxační čas protonů koordinované molekuly vody. Výše zmíněné parametry společně s počtem koordinovaných molekul vody (q) jsou klíčovými parametry ovlivňujícími relaxivitu. Při správném ladění těchto parametrů lze získat kontrastní látku s vysokou efektivitou.

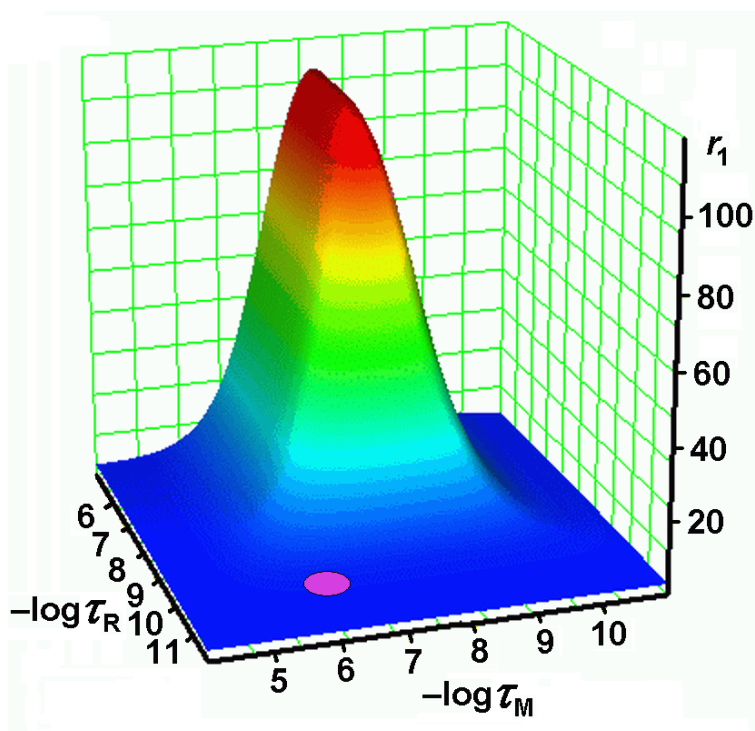
Souvislost mezi molekulární strukturou a relaxací elektronových spinů je těžko předvídatelná a podle dosavadních studií se zdá, že by mohla být příznivější pro symetrické sloučeniny.^[19] Proto je design nových kontrastních látek převážně zaměřen na optimalizaci tří klíčových parametrů: q , k_{ex} a τ_R . Podle simulací vycházejících ze SBM teorie (Obrázek 4) by mělo být možné dosáhnout optimální relaxivity zpomalením rotace komplexu a současnou optimalizací rychlosti výměny vody. Z Obrázku 4 je patrné, že prostor pro ladění parametrů je opravdu rozsáhlý, avšak postup ladění se musí provádět rozumně, neboť např. příliš rychlá nebo pomalá výměna vody má negativní vliv na celkovou relaxivitu.^[20]

Narozdíl od vnitřní sféry počet molekul v druhé sféře nijak neovlivňuje stabilitu komplexu, což vybízí k syntéze ligandů nesoucích skupiny umožňující tvorbu vodíkových vazeb, jakými jsou např. fosfonáty nebo fosfináty, a tím zvýšit celkovou relaxivitu.

Relaxivita nízkomolekulárních chelátů používaných jako kontrastních látek v MRI je prakticky zcela limitována rychlou rotací komplexu. Rotace komplexu může být zpomalena zvýšením molekulárního objemu při zachování rigidní interní struktury. Toho se dá dosáhnout vlastním shlukováním malých chelátů, např. tvorbou micel,^[21] nebo konjugací s makromolekulami jakou jsou peptidy,^[22] lipidy,^[23]

polysacharidy^[24] nebo dendrimery,^[25] ty však zřejmě kvůli vlastní flexibilitě nevykazují i přes značný nárůst objemu a hmoty očekávaný účinek.^[26]

O ladění rychlosti výměny vody bude pojednáno v další části.



Obrázek 4

Závislost relaxivity na hodnotách rezidenčního času koordinované molekuly vody τ_M a rotačním korelačním časem kontrastní látky τ_R . Fialový ovál značí oblast, ve které se nalézají parametry komerčně používaných kontrastních látek.^[12]

1.4 Ovlivnění rychlosti výměny vody

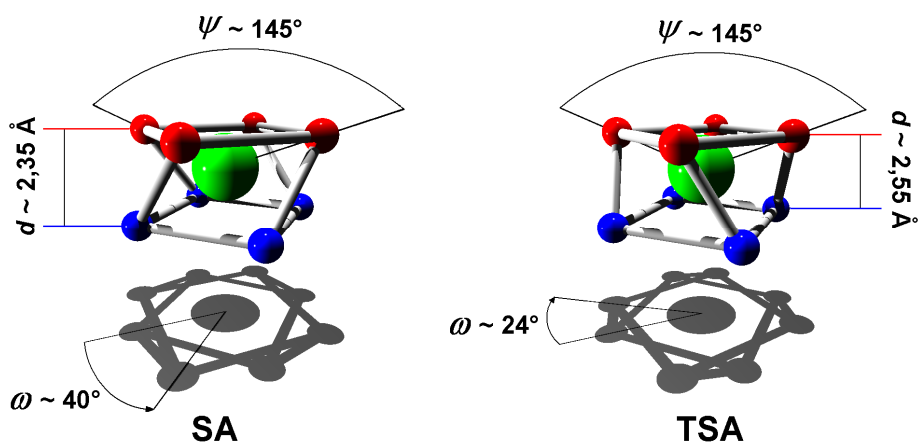
Pro hodnotu konečné relaxivity je klíčová rychlost výměny vody. Právě rychlost výměny vody je limitujícím faktorem pro vysokomolekulární komplexy. Ze simulací podle SBM teorie vyplývá, že optimální rychlost výměny vody leží v poměrně úzkém intervalu 10 – 40 ns pro dnes v klinické praxi běžně používaná magnetická pole.^[20] Pro přístroje pracující při vyšších polích je tato hodnota o něco nižší, ~ 5 ns. Obecně má většina dnes používaných kontrastních látek pomalou výměnu vody (typicky ~ 250 – 1000 ns), a proto se novodobý výzkum zaměřuje na látky s vysokou rychlostí výměny vody.^[13]

K výměně může dojít dvojím způsobem, za neutrálního pH se vymění celá molekula vody, zatímco v kyselém nebo bazickém prostředí probíhá mnohem

rychlejší prototropní výměna pouhého protonu nezávisle od výměny celé molekuly vody.

Výměna vody se dá urychlit také pečlivým návrhem nového ligandu, ve kterém se zvýší sterické nároky v blízkosti paramagnetického centra. Toho se dá dosáhnout např. nahrazením karboxylové skupiny ligandu DOTA fosfonátovou, monoethylfosfonátovou nebo fosfinátovou skupinou. Zvýšení sterického bránění a negativní náboj (destabilizující koordinaci vody) nesený fosforovou skupinou nutí molekulu vody k rychlejšímu odstoupení od centrálního atomu.^[27]

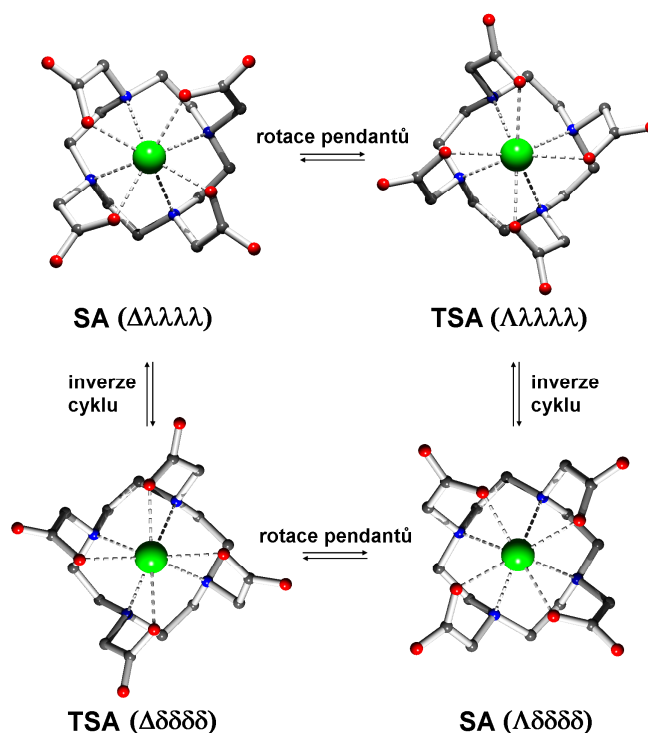
Komplex Gd^{III} s ligandem DOTA se vyskytuje ve dvou izomerech – SA (z anglického square antiprismatic, nebo-li čtvercově antiprismatickém) a TSA (z anglického twisted square antiprismatic, nebo-li zkříženě čtvercově antiprismatickém) (Obrázek 5). Tyto izomery vykazují značně rozdílnou rychlost výměny vody.^[28] Izomer TSA vyměňuje vodu 10krát až 100krát rychleji než SA. Při zavedení fosfonátové skupiny se ze sterických důvodů zvětší zastoupení TSA izomeru a díky tomu i celková relaxivita.^[29,30]



Obrázek 5

Strukturní rozdíly mezi SA a TSA izomery lanthanoidových komplexů s makrocyclickým ligandem DOTA.^[12]

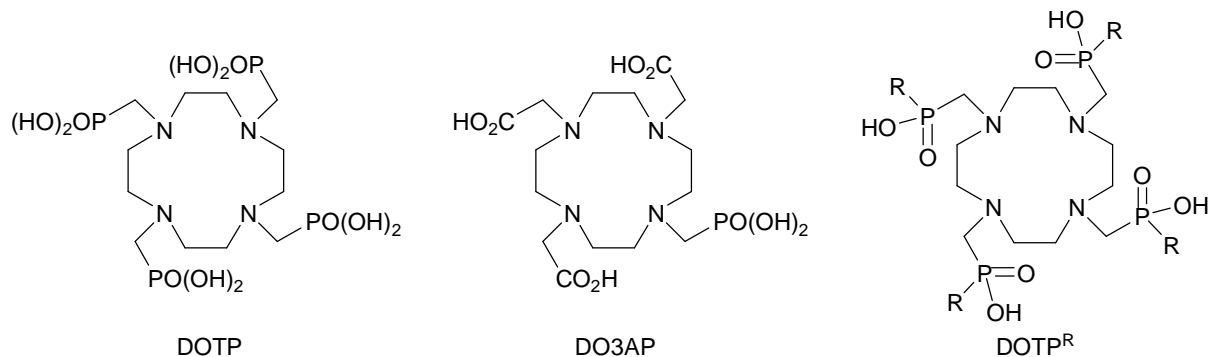
Vznik diastereoizomerů je umožněn dvěma nezávislými zdroji chiralidy molekuly – díky koordinaci makrocyclického skeletu se pětičlenné chelátové kruhy Gd–N–C–C–N mohou vyskytovat v konformaci λ nebo δ , a koordinované pendantní skupiny mohou být zatočeny též dvěma možnými způsoby – Λ nebo Δ , což vede ke vzniku čtyř isomerních forem, které tvoří dva diastereoizomerní páry enantiomerů $\Lambda\delta\delta\delta/\Delta\lambda\lambda\lambda$ a $\Lambda\lambda\lambda\lambda/\Delta\delta\delta\delta$ (Obrázek 6). Diastereoizomer $\Lambda\delta\delta\delta/\Delta\lambda\lambda\lambda$ vytváří koordinační klec o geometrii čtvercového antiprizmatu (torzní úhly N_4 a O_4 rovin (ω) blízké teoretické hodnotě 45° , Obrázek 5), izomer $\Lambda\lambda\lambda\lambda/\Delta\delta\delta\delta$ vytváří zkřížené antiprizmatické okolí (torzní úhly N_4 a O_4 rovin (ω) blízké teoretické hodnotě $22,5^\circ$, Obrázek 5). Koordinační dutina TSA izomeru je poněkud vyšší než dutina SA izomeru (Obrázek 5). Zároveň je TSA uspořádání mnohem flexibilnější než uspořádání SA, což vede k řádově rychlejší výměně koordinované molekuly vody na TSA izomeru v porovnání s SA izomerem (díky flexibilitě TSA uspořádání dochází při vibračních pohybech ke sterickému bránění koordinačního místa vody a k jejímu vypuzení z koordinační sféry; po opětovném přerovnání koordinační sféry se pak koordinuje nová molekula vody).^[12]



Obrázek 6

Strukturní vztahy mezi jednotlivými izomery lanthanoidových komplexů s makrocyclickými ligandy typu DOTA.^[12]

Zastoupení TSA izomeru se také mění v řadě lanthanoidů, ve které stoupá s rostoucí velikostí Ln^{III} iontů. U Yb^{III} a Lu^{III} se vyskytuje pouze SA izomer, u komplexu Gd^{III} je TSA izomer zastoupen jen asi z 20 %, ^[31] kdežto u La^{III} a Ce^{III} byl nalezen pouze TSA izomer, což znamená, že čím větší ion se bude v komplexu nacházet, tím více bude převažovat TSA izomer. Mimo jiné to znamená, že pokud by byl vhodně derivatizován ligand, aby byl stericky náročnější a zmenšoval dutinu, do které se koordinuje Gd^{III} , měl by se také zvětšit poměr zastoupení TSA izomeru v chelátech. Stericky náročnější skupinou než karboxylová je i fosfonát nebo fosfinát. Příkladem zavedení fosfonátu na kruh cyklenu je ligand DOTP (Obrázek 7), který se sice v chelátu vyskytuje pouze ve formě TSA izomeru, ale je natolik kompaktní, že neumožňuje koordinaci vody, která je nutná k funkci MRI kontrastní látky. Stejně jako fosfinové deriváty DOTP^R (Obrázek 7).^[32,33] Proto se syntetizují deriváty ligandu DOTA s menším počtem fosfonátových skupin, např. DO3AP (Obrázek 7), který je již schopný v chelátu vázat vodu. Další možností je zavedení monoesteru fosfonátu, který také podporuje vyšší zastoupení TSA izomeru v chelátu (DO3AP(OEt) – Obrázek 8).^[29,30]



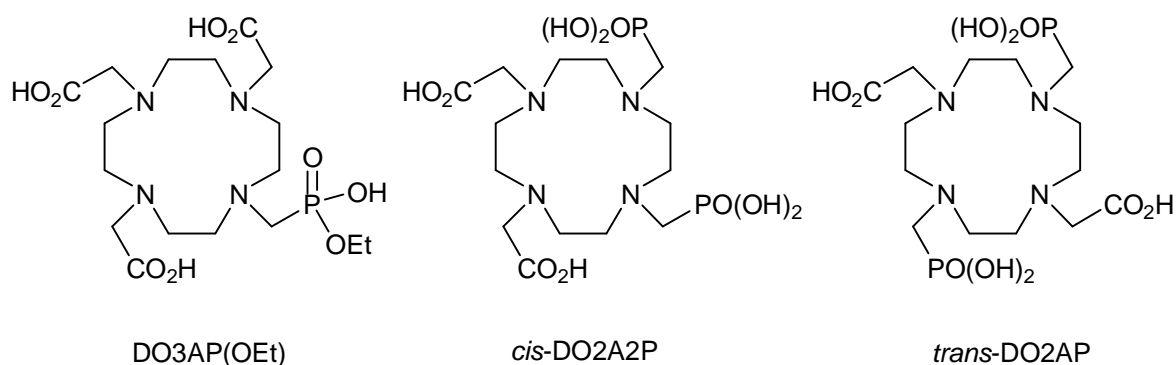
Obrázek 7

Deriváty ligandu DOTA nesoucí fosfonátovou nebo fosfinátovou skupinu.

1.5 Cíl práce

Jak bylo mnohokrát zmíněno výše, zavedení fosfonátové nebo fosfinátové skupiny místo karboxylové funkce v molekule ligandu DOTA by mělo vést ke zvýšení rychlosti výměny vody v důsledku zvýšení zastoupení TSA izomeru. Rovněž by se měla zvýšit celková relaxivita chelátu případným příspěvkem vodíkovými vazbami vázaných vod druhé sféry. Tento motiv byl již několikrát vyzkoušen, např. u již uvedené DOTP nebo DO3AP a jejího esteru DO3AP(OEt) (Obrázek 8). Komplexy s DOTP nejsou schopné vázat vodu, proto se připravovaly chelatanty s menším počtem fosfonátových skupin jako je DO3AP a DO3AP(OEt), které již v chelátech koordinují molekulu vody, a jejich vlastnosti byly rozsáhle zkoumány.^[34,35] V jejich případě došlo k výraznému zvýšení rychlosti výměny vody, dokonce 5 až 10 násobně oproti komplexu ligandu DOTA, ale optimální hodnoty stále nedosáhly. Byl připraven i *trans*-DO2A2P derivát (Obrázek 8), který ovšem také nemá přímo koordinovanou molekulu vody na centrální Gd^{III} ion.^[36] Nabízí se tedy logický krok syntézy difosfonátového derivátu ligandu DOTA v poloze *cis*-1,4-cyklenu, který by mohl narozdíl od *trans*-difosfonátového analogu v chelátu koordinovat molekulu vody.

Cílem této práce je syntéza 1,4-bis(fosfonomethyl)-7,10-bis(karboxymethyl)cyklenu (*cis*-DO2A2P – Obrázek 8), případně izolace a charakterizace meziproduktů ve formě *cis* disubstituovaných cyklenuů, které by mohly sloužit jako vhodné chelatanty pro radioaplikace (např. komplexaci ⁶⁴Cu).



Obrázek 8

Fosfonátové deriváty ligandu DOTA včetně cílové látky.

2. Návrh syntézy

2.1 *cis*-1,4 chránění cyklu

2.1.1 1,4-dibenzylcyklen

Již byly zkoumány vlastnosti *trans*-1,7-disubstituovaných cyklenů,^[37] jejichž syntéza je známa od roku 1995.^[38] Rozsáhle se věnovalo několik prací DO3A nebo 1-karboxymethylcyklu.^[39,26,35] Vznik *trans*-cyklenových derivátů a tris, nebo mono substituovaných cyklenů je podle výše zmíněných publikací mírně preferován, proto je disubstituce v polohách 1,4 problematická. Jednou z možných cest je využití vhodného chránění, které zabrání vzniku nechtěných vedlejších produktů. Jako dobré řešení se jeví navázání oxalylu,^[40] jenž přemostí dva atomy dusíku v poloze 1,4. Toto chránění však samo o sobě není úplně vhodné pro následné syntézy. Při jeho hydrolýze by mohlo dojít i k odbourání navázaných fosfonátových, fosfinátových nebo karboxylových skupin, proto se na takto chráněný kruh cyklu následně zavádí dvě benzylové skupiny,^[40] jejichž odstranění by nemělo ovlivnit další navázané pendanty. Po bazické hydrolýze 1,4-dibenzyl-7,10-oxalylcyklu (**3**), při které se odstraní oxalylový můstek, vznikne *cis*-1,4-dibenzylcyklen (**4**),^[40] který je *cis*-1,4 chráněnou výchozí látkou pro další syntézu a je na ni možné navázat požadované karboxylové, fosfonátové i fosfinové skupiny. Reakce jsou přehledně zobrazeny ve *Schématu 1*.

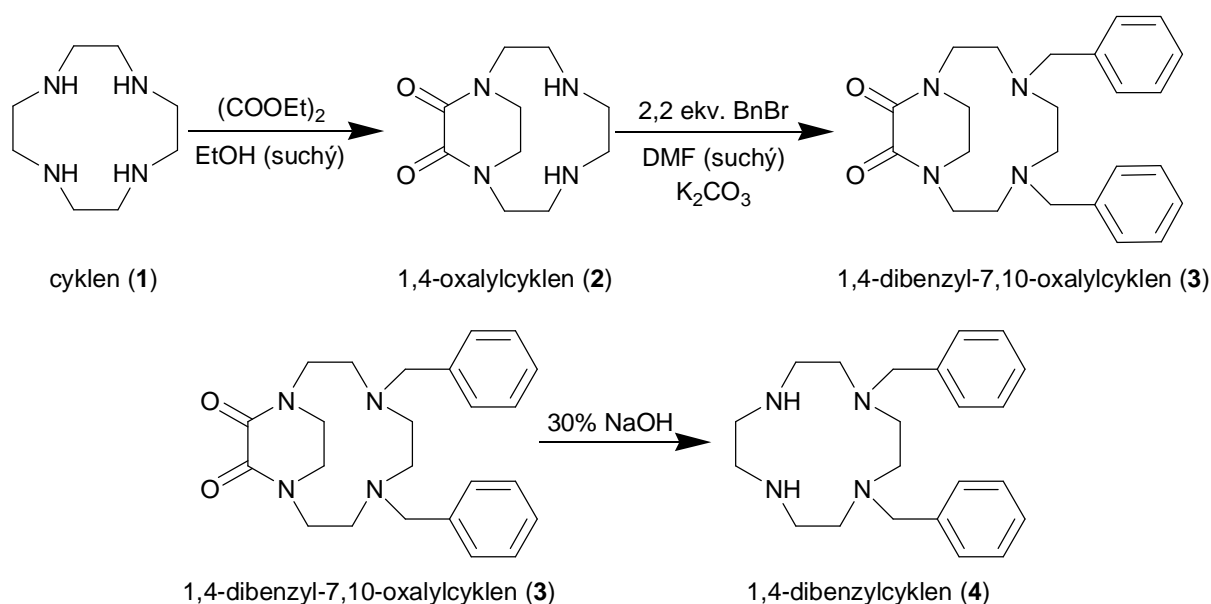


Schéma 1: Syntéza *cis*-1,4-dibenzylcyklu (**4**) s využitím oxalylového můstku

cis-1,4-dibenzylcyklen (**4**) je možné připravit i přímou reakcí cyklenu (**1**) s benzylbromidem.^[41] Podle dat v publikaci^[41] by mělo být možné touto cestou získat po chromatografickém dělení *cis*-1,4 chráněný cyklen v 78% výtěžku, což by bylo vzhledem ke kratší reakční době oproti oxalylovému chránění a menšímu počtu čistících operací vynikající. Přímá syntéza 1,4-dibenzylcyklenu (**4**) je zobrazena i s vedlejšími produkty ve *Schématu 2*.

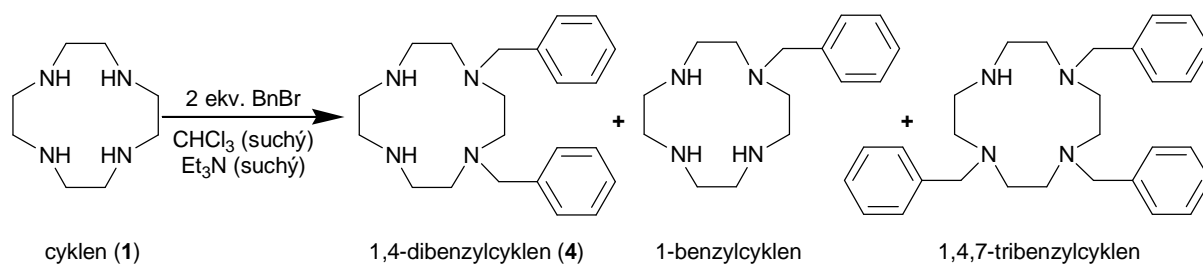


Schéma 2: Přímá syntéza *cis*-1,4-dibenzylcyklenu (**4**)

2.1.2 1,4-bis(*tert*-butoxykarbonylmethyl)cyklen

Přímější cesta ke kýžené látce vede přes meziprodukt vznikající při reakci cyklenu s *tert*-butylbromacetátem v bezvodém chloroformu,^[42] kterou se zavede na kruh cyklenu (**1**) karboxylová skupina v esterové formě. Její velkou nevýhodou je vznik vedlejších produktů a z toho plynoucí oddělování požadovaného produktu 1,4-bis(*tert*-butoxykarbonylmethyl)cyklenu (*cis*-^tBu₂DO2A – *Schéma 2*). Stopy vody podporují vznik jinak téměř nevznikajícího *trans*-regioizomeru. Dělení se provádí chromatograficky na silikagelu s isokratickou elucí mobilní fází amoniak:ethanol 1:10. Vedlejšími produkty jsou velmi dobře vznikající ^tBu₃DO3A (*Schéma 2*) a také ^tBuDO1A (*Schéma 2*).^[39] Kvůli snadno vznikajícím vedleším produktům se rovněž snižuje výtěžek celé reakce, což významně hovoří v neprospěch této varianty. Reakci i s vedlejšími produkty zobrazuje *Schéma 3*.

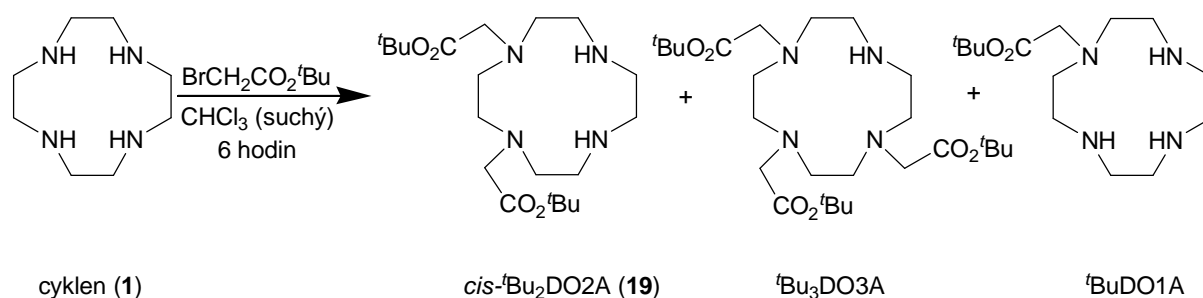


Schéma 3: Syntéza ^tBu₂DO2A (**19**) i s vedlejšími produkty

2.2 Zavedení fosfonátové a karboxylové skupiny, ochrání

Fosfonomethylové skupiny se na kruh cyklenu zavádí obvykle variací Mannichovy reakce, tzv. Michaelis-Arbuzovova typu, při které reaguje cyklen s nadbytkem paraformaldehydu v triethylfosfitu (triethylesteru kyseliny fosforité). Triethylfosfit se oxiduje na triethylfosfát, který sice neovlivňuje vznik chtěného produktu, ale snižuje výtěžek reakce, proto je zapotřebí do reakce přidat nadbytek triethylfosfitu. Produkt reakce je v plně esterové formě. Úplná hydrolyza esterů se nejčastěji provádí refluxováním v koncentrované HCl. Při bazické hydrolyze dochází k selektivní deesterifikaci na monoester.^[35] Fosfonátové estery je také možno hydrolyzovat pomocí TMSBr, kdy se po jednom dni refluxování převedou ethyl estery na trimethylsilyl estery, které se dají následně odstranit již v slabě kyselém prostředí (MeOH).

Karboxylovou skupinu je možné na kruh cyklenu navázat analogicky jako v případě syntézy *cis*-^tBu₂DO₂A, v tomto případě reakcí chráněného cyklenu s *tert*-butylbromacetátem v bezvodém prostředí (CHCl₃, MeCN) za přítomnosti báze (K₂CO₃, DIPEA). Opět je potřeba získat deesterifikovanou formu, čehož se docílí kyselou hydrolyzou (reflux v CF₃COOH). Prakticky stejným způsobem se dá zavést karboxylová skupina za pomoci ethylbromacetátu. Výhoda tohoto postupu spočívá ve stejných esterových skupinách jako má fosfát, díky čemuž by se mohla hydrolyza všech esterů provést pouze v jednom kroku kyselinou chlorovodíkovou. U ethylacetátového esteru se dá také uvažovat o využití bazické hydrolyzy, která by sice vedla k vzniku pouze fosfonátových monoesterů, avšak to by mohlo znamenat zisk dalšího potenciálního ligandu.

Při využití *cis*-1,4-dibenzylového chrání je vhodné nejprve zavést na kruh cyklenu fosfonátové skupiny před karboxylovými, které by mohly po debenzylaci vytvořit laktam a značně tak znepríjemnit, nebo dokonce znemožnit, následné kroky syntézy. Při acylačních reakcích s ethylbromacetátem a *tert*-butylbromacetátem také existuje riziko vzniku kvarternizovaného produktu na jednom nebo i více atomech dusíku, což by také značně znepríjemnilo další postup v syntéze.

Odstranění chránících benzylových skupin se obvykle provádí reduktivní debenzylací vodíkem za přítomnosti palladia jako katalyzátoru sorbovaném na aktivním uhlí. Obecně debenzylace probíhá lépe v roztocích kyselin

(např. AcOH, která vykazuje vysokou rozpustnost vodíku) a někdy je vhodný přísávek alkoholu (MeOH, EtOH).

Alternativní možností odstranění benzylových skupin je reakce s benzyloxykarbonylchloridem (Z-chloridem), který se naváže místo benzylu na příslušný atom dusíku. Jelikož je benzyloxy skupina lépe odstupující skupinou, přednostně je z tohoto atomu dusíku eliminován při přidavku čpavku. Z-skupina se následně odstraní hydrolýzou v ledové AcOH syčené HBr (cca 33%). Nevýhodou tohoto postupu je kromě značně zápachajících reagensů vznik totálně deesterifikovaných produktů, což neumožňuje provádět další reakce v nevodném prostředí.

Možné cesty syntézy cílové látky jsou přehledně zobrazeny ve *Schématech 4, 5 a 7*. Dále je uvedeno schéma syntézy fosfinových derivátů (*Schéma 6*).

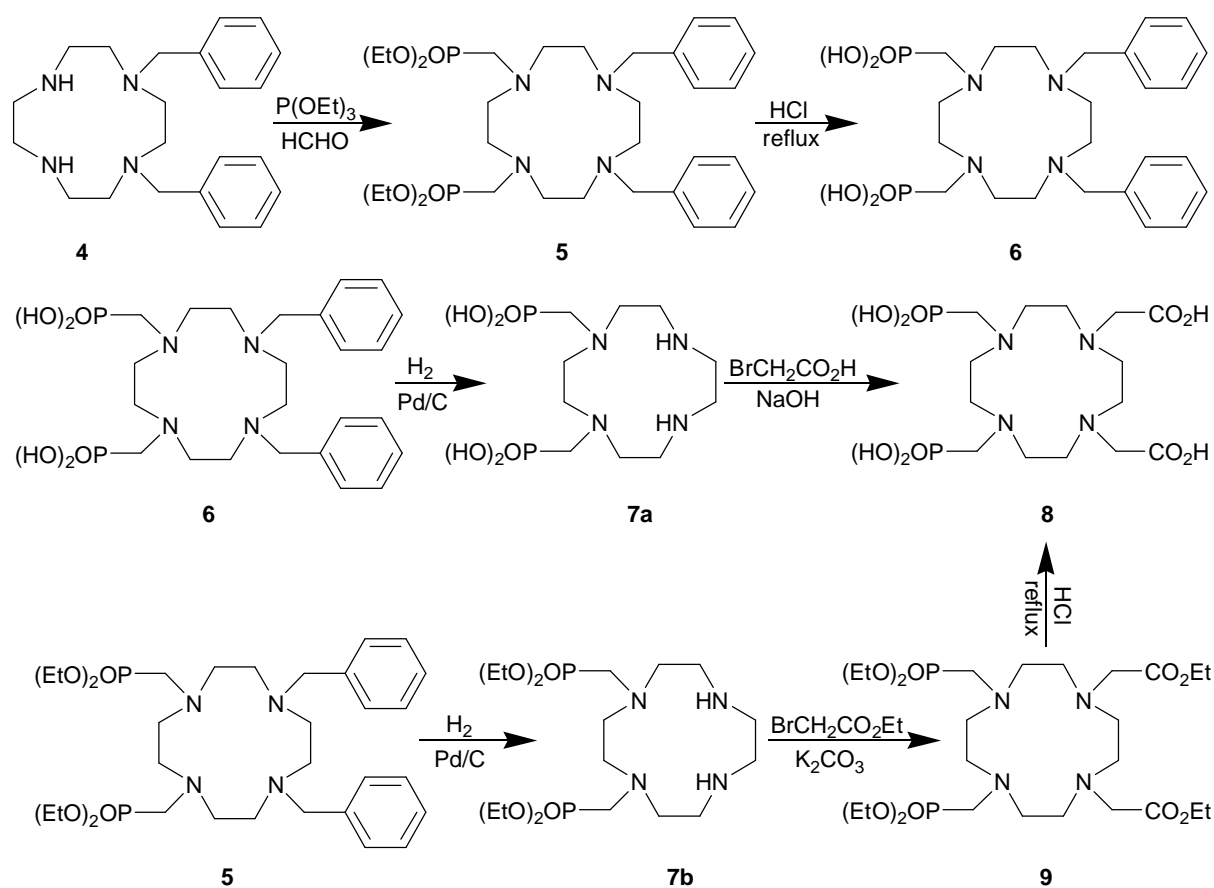


Schéma 4: Syntéza cílové látky 8 z *cis*-1,4-dibenzylcyklenu (4)

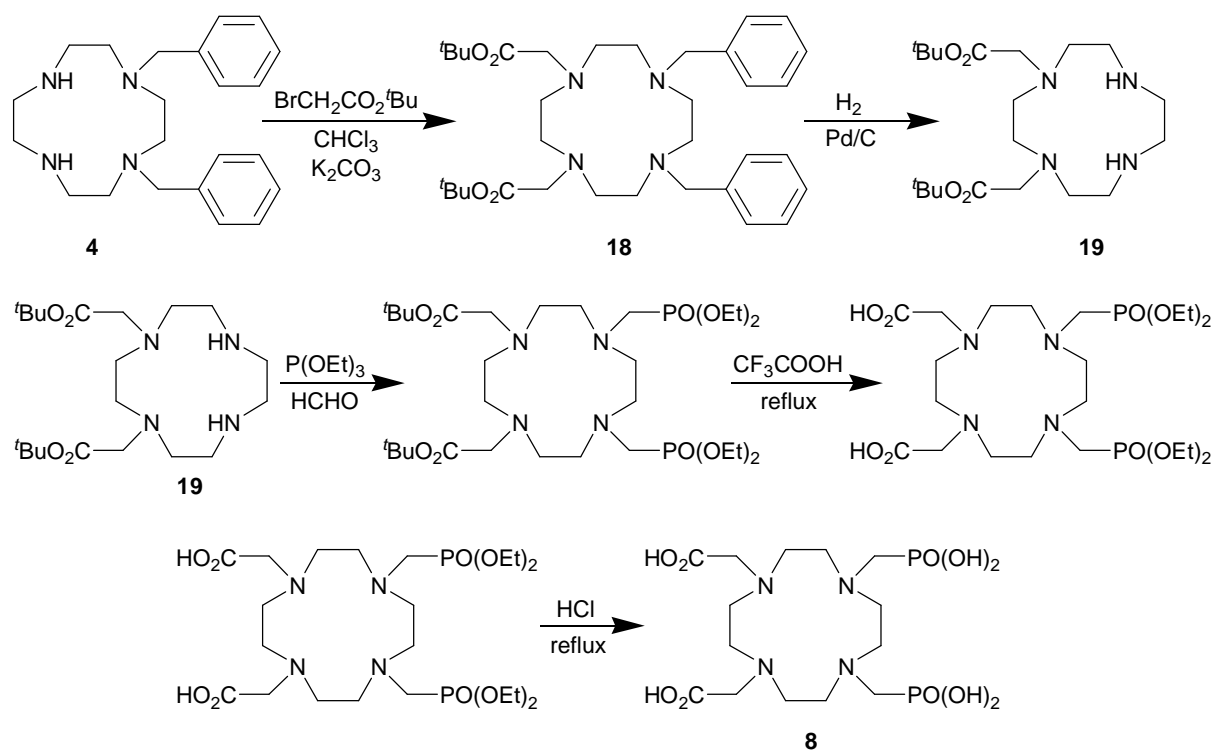


Schéma 5:
 Syntéza cílové látky **8** z cis-1,4-bis(terc-butoxykarbonylmethyl)cyklenu (**19**)
 připraveného z 1,4-dibenzylcyklenu (**4**)

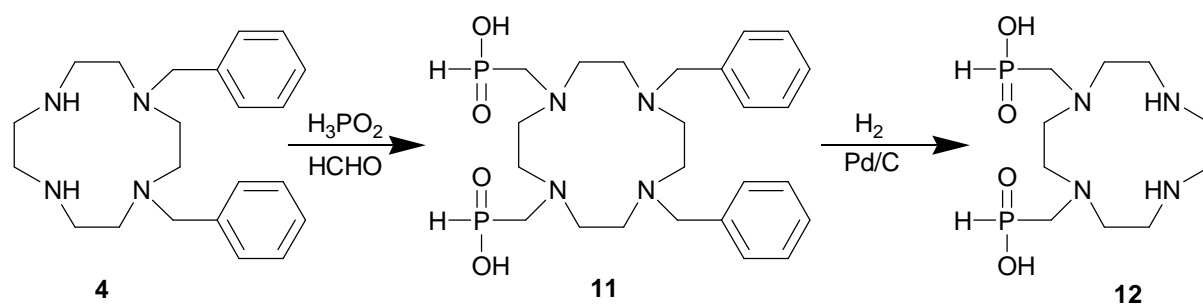


Schéma 6: Syntéza fosfinátových derivátů z 1,4-dibenzylcyklenu (**4**)

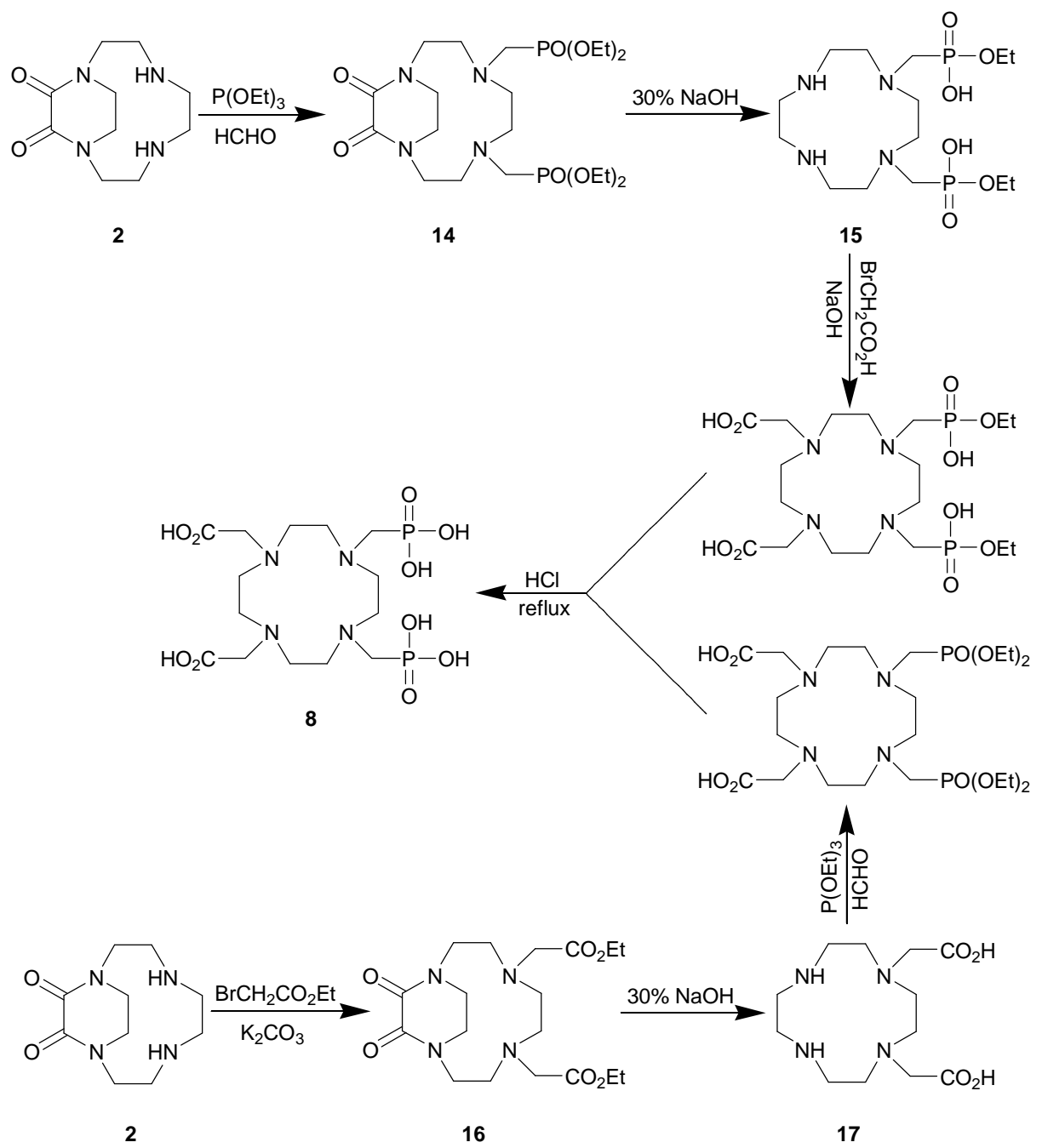


Schéma 7: Syntéza cílové látky **8** z oxalylcyclohexenu (**2**)

3. Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

Reagencie

33% HBr/AcOH	Sigma-Aldrich
benzylbromid, 96%	Acros Organics
cyklen, čistý	CheMatech
diethyloxalát, 99%	Fluka
ethylbromacetát	Acros Organics
triethylamin, <i>p. a.</i>	Penta
hexamethyldisilazan	Fluka
hydroxid sodný, čistý	Lach-Ner
kyselina bromoctová	Merck
kyselina fosforová	Fluka
kyselina chlorovodíková (36% vodný roztok)	Penta
kyselina octová, 99%	Penta
ninhydrin, 0,5% ethanolický roztok	Lachema
palladium (10% na aktivním uhlí)	Sigma-Aldrich
paraformaldehyd, 96%	Fluka
síran sodný, bezvodý	Lach-Ner
THF	Penta
TMSBr	Acros Organics
triethylfosfit, 95%	Fluka
uhličitan draselný, bezvodý	Lach-Ner
vodík, 3.0	Linde
Z-chlorid	Acros Organics

Rozpouštědla

acetonitril, <i>p. a.</i>	Penta
amoniak (25% vodný roztok)	Penta
chloroform, <i>p. a.</i>	Penta
dichlormethan, <i>p. a.</i>	Penta
dimethylformamid	Penta

ethanol, denaturovaný	Lihovar Kolín
ethanol, bezvodý, <i>p. a.</i>	Penta
isopropylamin, <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich
methanol, <i>p. a.</i>	Penta
toluen, <i>p. a.</i>	Penta
voda, deionizovaná	PřF UK

Deuterovaná rozpouštědla

D ₂ O (99,8% D)	Chemotrade
CDCl ₃ (99,8% D)	Sigma-Aldrich

Iontoměniče a sorbenty

silikagel, chromatografický (60-230 mesh)	Fluka
silný kationtový iontoměnič (Dowex 50, 100/200 mesh)	Fluka
slabý kationtový iontoměnič (Amberlite CG 50, 200/400)	Fluka

3.2 Metody charakterizace

Spektroskopie NMR

¹H, ¹³C a ³¹P NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian VNMRS 300 a Varian ^{UNITY}INOVA 400 na PřF UK. Pro měření byly použity 5mm NMR kyvety. Teplota při měření byla 25 °C, pokud není uvedeno jinak. Rezonanční frekvence a standardy pro referenci uvádí *Tabulka 1*. Hodnoty chemických posunů jsou uváděny v ppm u ¹H s přesností na dvě desetinná místa, u ¹³C a ³¹P s přesností na jedno desetinné místo. Při měření většiny ³¹P a ¹³C NMR spekter byl použit decoupling jader ¹H. Spektra byla většinou měřena v čistých deuterovaných rozpouštědlech (CDCl₃, D₂O), údaje pro konkrétní měření jsou uvedeny v postupech syntézy příslušných látek v syntetické části.

Tabulka 1: Měřená jádra, jejich rezonanční frekvence a standardy v NMR spektroskopii. (i) – interní, (e) – externí

Měřené jádro	Rezonanční frekvence (MHz)		Standardy
	Varian VNMRS 300	Varian ^{UNITY} /NOVA 400	
¹ H	299,94	399,94	^t BuOH (i) $\delta_{\text{H}} = 1,25$ ppm
¹³ C	75,4	100,6	^t BuOH (i) $\delta_{\text{C}} = 32,0$ ppm a 72,2 ppm
³¹ P	121,4	161,9	H ₃ PO ₄ (e) $\delta_{\text{P}} = 0,0$ ppm

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 s ESI (Electrospray Ionization) jako zdrojem iontů a IT (Ion Trap) analyzátozem. Získána byla spektra kladných (+) i záporných (–) iontů. Teoretické hodnoty molekulové hmotnosti (M) a teoretické hmotnosti molekulových iontů a fragmentů byly vypočítány programem *ChemDraw Ultra 8.0* (CambridgeSoft®). V závorkách za teoretickými hodnotami je u molekulových iontů uvedena intenzita podle izotopového zastoupení. V závorkách za interpretovanými signály je uvedena intenzita vůči nejintenzivnějšímu signálu.

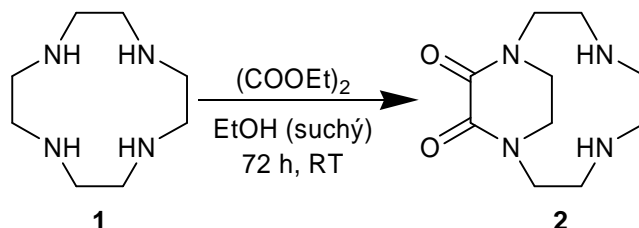
Tenkvrstevná chromatografie (TLC)

K tenkvrstevné chromatografii byly použity destičky typu *Silufol*[®] (*Kavalier*) se sorbentem Silpearl (širokoporézní silikagel), naneseným na hliníkové fólii, se škrobem jako pojivem, nebo destičky s vrstvou silikagelu impregnovaného fluorescenčním barvivem naneseným na hliníkové fólii (*silica gel 60 F₂₅₄, Merck*). Příslušné mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých látek individuálně, stejně jako činidla, kterými byly vyvolávány. Pro UV detekci byla použita lampa s vlnovými délkami 254 a 366 nm emitovaného záření.

3.3 Syntetická část

3.3.1 1,4-oxalylycyklen (2)

1,4-oxalylycyklen (2) byl připraven podle syntézy popsané v literatuře.^[40]



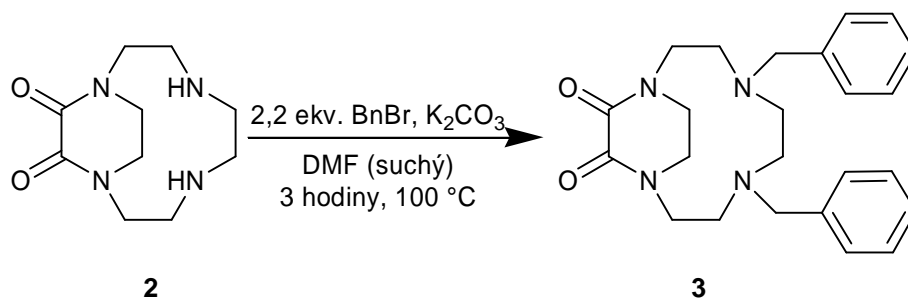
V baňce bylo rozpuštěno 4,00 g (23,3 mmol) cyklu (1) ve 100 ml bezvodého EtOH. K roztoku bylo přidáno 3,40 g (23,3 mmol) diethyloxalátu. Reakční směs byla míchána 72 h za RT. Průběh reakce byl kontrolován TLC (IPA:CHCl₃ 1:5, detekce ninhydrin, cyklen (1) – výrazná skvrna na startu, produkt 2 – postupně narůstající skvrna s $R_f = 0,4$). Poté byla reakční směs odpařena na RVO do sucha. Produkt 2 byl přečištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, 250 cm³, IPA:CHCl₃ 1:5, $R_f = 0,4$). První frakce o objemu 100 ml byla jímána jako předkap. Druhá 500ml frakce již obsahovala většinu produktu. Zbytek produktu byl zachycen v třetí 100ml frakci. Průběh chromatografie byl kontrolován TLC (viz výše). Frakce obsahující produkt byly odpařeny a po rozpuštění v EtOH spojeny. Produkt byl třikrát odpařen s EtOH pro odstranění IPA. Produkt 2 ve formě bílého prášku byl zvážen a byly z něj odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 5,16 g (98%)

TLC, NMR a MS charakterizace produktu odpovídá publikovaným datům.^[40]

3.3.2 1,4-dibenzyl-7,10-oxalylycyklen (3)

1,4-dibenzyl-7,10-oxalylycyklen (3) byl připraven podle syntézy popsané v literatuře.^[40]



V baňce bylo rozpuštěno 5,00 g (22,1 mmol) látky 2 ve 100 ml suchého DMF.

Roztok byl zahřát na 100 °C a bylo k němu přidáno 6,70 g (48,6 mmol) K₂CO₃. Dále bylo přidáno 8,32 g (48,6 mmol) benzylbromidu. Reakční směs byla míchána při 100 °C přibližně 3 hodiny. Průběh reakce byl kontrolován TLC (PA:CHCl₃ 1:15, detekce ninhydrin, **2** – skvrna s R_f = 0,1; produkt **3** – postupně narůstající skvrna s R_f = 0,6). Po vymizení skvrny výchozí látky **2** (cca 3 hodiny) byla reakční směs odpařena na RVO, rozpuštěna do CH₂Cl₂ a zfiltrována přes S4 fritu. Produkt **3** ve formě bílo-žlutého prášku byl přečištěn krystalizací z horkého toluenu. Po dni stání byl produkt ve formě bílého mikrokrytalického prášku zfiltrován a sušen v exsikátoru nad P₂O₅. Produkt **3** byl zvážen a byly z něj odebrány vzorky na charakterizaci.

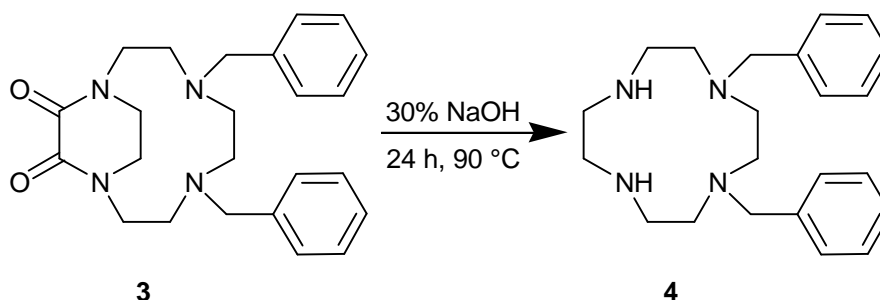
Výtěžek: 8,50 g (95%)

TLC, NMR a MS charakterizace produktu odpovídá publikovaným datům.^[40]

3.3.3 1,4-dibenzylcyklen (**4**)

Postup 1:

1,4-dibenzylcyklen (**4**) byl připraven modifikací syntézy popsané v literatuře.^[40]



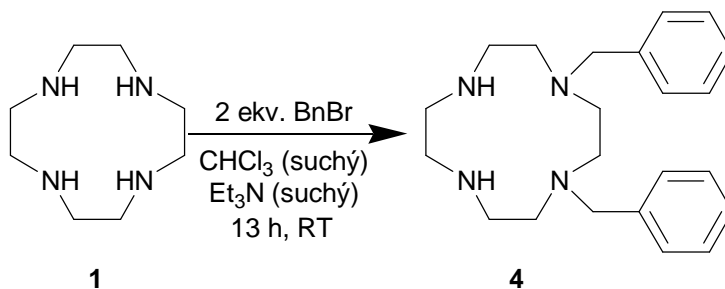
V baňce bylo rozpuštěno 8,00 g (19,7 mmol) látky **3** v 25 ml EtOH. Poté bylo přidáno 17,80 g (445 mmol) NaOH v 25 ml H₂O. Směs byla nechána míchat 24 hodin při 90 °C. Po odpaření do viskózního oleje na RVO byl odparek rozpuštěn do 100 ml H₂O a třikrát vytřepán 100 ml CHCl₃. Chloroformové fáze byly spojeny a odpařeny na RVO. Z produktu ve formě bezbarvého oleje byly odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 5,86 g (84%)

NMR a MS charakterizace produktu odpovídá publikovaným datům.^[40, 41]

Postup 2:

1,4-dibenzylcyklen (**4**) byl připraven podle syntézy popsané v literatuře.^[41]

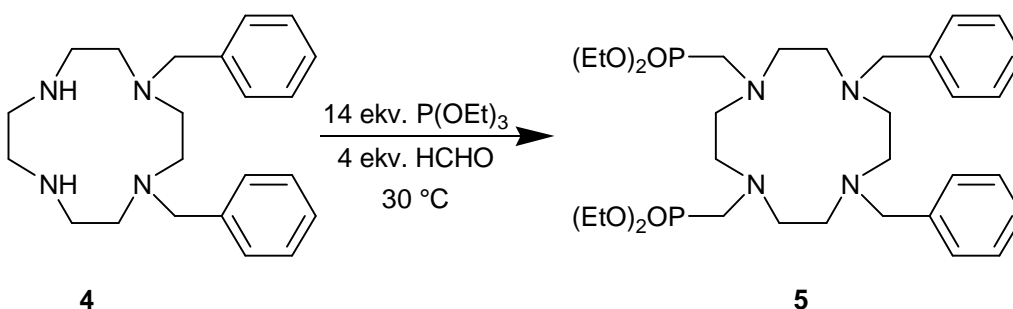


V baňce bylo rozpuštěno 2,00 g (11,6 mmol) cyklu (**1**) v 200 ml suchého CHCl_3 . K roztoku bylo přidáno 11,6 g (116 mmol) suchého Et_3N . Poté bylo do roztoku během jedné hodiny přikapáno 4,00 g (23,4 mmol) benzylbromidu rozpuštěného v 50 ml suchého CHCl_3 pod Ar atmosférou. Reakční směs byla nechána reagovat 13 h, poté byla vytřepána dvakrát 100 ml H_2O , bylo k ní přidáno Na_2SO_4 a směs byla nechána míchat 30 minut. Po filtraci přes S4 fritu a odpaření na RVO byla směs dělena sloupcovou chromatografií (silikagel, 300 cm^3 , $\text{NH}_3:\text{EtOH}$ 1:10, produkt **4** $R_f = 0,4$). Byly jímány frakce o objemu 100 ml. Podle TLC analýzy byly frakce obsahující produkt spojeny a odpařeny na RVO. Z produktu ve formě bezbarvého oleje byly odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 1,41 g (35%)

NMR a MS charakterizace produktu odpovídá publikovaným datům.^[40,41]

3.3.4 1,4-dibenzyl-7,10-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (**5**)



V baňce bylo rozpuštěno 3,30 g (9,38 mmol) látky **4** v 25 ml triethylfosfitu (23,0 g; 140 mmol). Poté bylo přidáno 1,32 g (37,5 mmol) paraformaldehydu. Reakční směs byla zahřáta na 50 °C. Průběh reakce byl sledován TLC ($\text{NH}_3:\text{EtOH}$ 1:10, detekce UV, ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **4** – skvrna s $R_f = 0,4$; produkt **5** – postupně narůstající skvrna s $R_f = 0,8$). Po vymizení skvrny výchozí látky

(cca 24 hodin) byla reakční směs rozpuštěna v EtOH a nanesena na silný kationtový iontoměnič v H⁺ cyklu (600 cm³) promytý EtOH. Iontoměnič byl promyt EtOH (700 ml), aby se oddělil triethylfosfit, EtOH:H₂O 1:1 (700 ml), NH₃:EtOH 1:5 (1000 ml) a nakonec regenerován HCl:H₂O 1:1 (400 ml). Z frakcí byly odebrány vzorky na TLC (NH₃:EtOH 1:10, detekce UV, ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **5** – skvrna s R_f = 0,8). Produkt se nacházel ve frakcích s amoniakální fází, které byly spojeny a odpařeny na RVO. Z produktu **5** ve formě nažloutlého oleje byly po zvážení odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 4,70 g

Charakterizace:

NMR (CDCl₃): ¹H δ 1,29 (CH₃, 12H, t, ³J_{HH} = 7,20 Hz); 2,60-2,78 (N-CH₂-CH₂-N, 8H, br); 2,80-3,00 (N-CH₂-CH₂-N, N-CH₂-P, 10H, br); 3,48 (N-CH₂-Ph, 4H, s); 4,01 (O-CH₂-CH₃, 8H, p, ³J_{HH} ~ ⁴J_{PH} = 7,20 Hz); 7,19-7,30 (Arom, 10H, m)

¹³C {¹H} δ 16,5 (CH₃, d, ³J_{PC} = 5,50 Hz); 50,0 (N-C-P, d, ¹J_{PC} = 153,20 Hz); 52,2; 52,3; 53,5; 53,6 (N-C-C-N); 60,1 (N-C-Ph, s); 61,6 (O-CH₂-CH₃, d, ²J_{PC} = 7,16 Hz); 126,7 (1C, Arom.); 128,0 (2C, Arom.); 129,1 (2C, Arom.); 139,6 (1C, Arom., kvartérní)

³¹P {¹H} δ 26,1 (s)

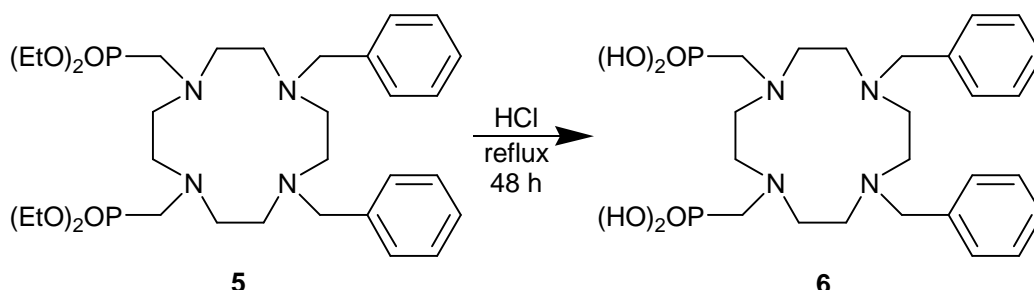
³¹P δ 26,1 (p, ²J_{PH} ~ ³J_{PH} = 7,20 Hz)

MS nalezené: (+) 653,3 (100%); 654,3 (39%)

MS teoretické: (+) [M+H⁺]⁺ 653,4 (100%); 653,4 (36%)

3.3.5 1,4-dibenzyl-7,10-bis(fosfonomethyl)cyklen (**6**)

Postup 1:

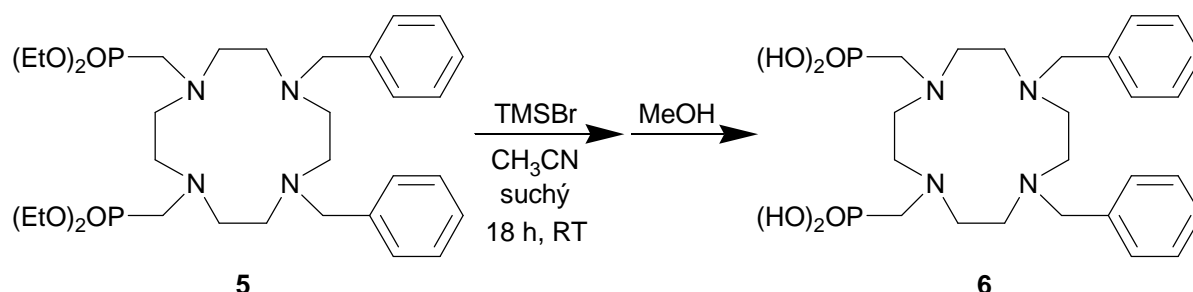


V baňce bylo rozpuštěno 0,220 g (0,330 mmol) látky **5** v 5 ml EtOH s 5 ml HCl a refluxováno 48 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (NH₃:EtOH 1:10, detekce UV, ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **5** – skvrna s R_f = 0,8; produkt

6 – skvrna s $R_f = 0,1$). Poté byla směs odpařena na RVO do sucha a byly odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 0,180 g

Postup 2:



V baňce bylo rozpuštěno 2,30 g (3,53 mmol) látky **5** v 40 ml CH_3CN . K roztoku bylo přidáno 10,8 g TMSBr. Směs byla ponechána míchat 18 hodin. Poté bylo ke směsi přidáno 20 ml MeOH a směs byla následně odpařena na RVO. Odpaření s přidavkem 20 ml MeOH bylo třikrát zopakováno. Dokončení reakce bylo kontrolováno pomocí TLC ($\text{NH}_3:\text{EtOH}$ 1:10, detekce UV, ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **5** – skvrna s $R_f = 0,8$ nenalezena; produkt **6** – skvrna s $R_f = 0,1$). Produkt byl přečištěn na silném kationtovém iontoměnič v H^+ cyklu (300 cm^3) promytém H_2O . Iontoměnič byl promyt H_2O (1000 ml), $\text{NH}_3:\text{EtOH}$ 1:5 (700 ml) a nakonec regenerován $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (250 ml). NH_3 fáze obsahující produkt byly spojeny a po odpaření na RVO byly z produktu ve formě nažloutlého prášku odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 1,80 g

Charakterizace:

NMR (D_2O): ^1H δ 2,95-3,40 (N- CH_2 - CH_2 -N, N- CH_2 -P, 20H, br); 3,88 (N- CH_2 -Ph, 4H, s); 7,20-7,40 (Arom., 10H, m)

^{13}C δ 49,3; 51,7 (N-C-C-N); 52,8 (N-C-P, d, $^1J_{\text{PC}} = 153,80 \text{ Hz}$); 52,9; 53,9 (N-C-C-N); 60,1 (N-C-Ph, s); 131,9 (2C, Arom.); 132,3 (1C, Arom.); 132,9 (1C, Arom., kvartérní); 133,5 (2C, Arom.)

^{31}P { ^1H } δ 16,9 (bs)

^{31}P δ 16,9 (br)

MS nalezené: (-) 444,9 (5%); 539,0 (100%); 540,0 (24%)

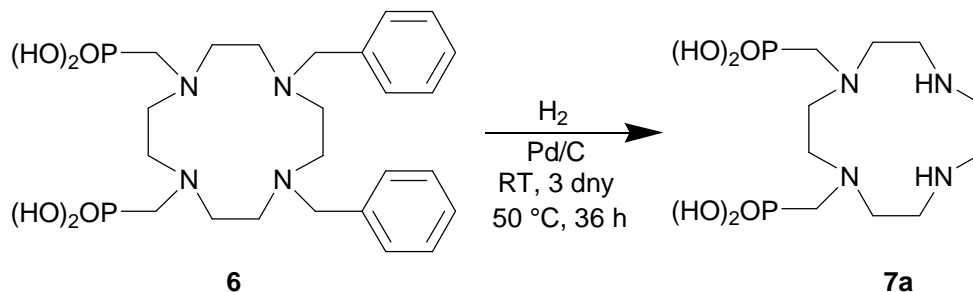
(+) 447,0 (52%); 541,1 (36%); 563,1 (100%); 579,1 (68%)

MS teoretické: (-) $[\text{M}-\text{CH}_2\text{PO}(\text{OH})_2+\text{H}^+]^+$ 445,2; $[\text{M}-\text{H}^+]^-$ 539,2 (100%); 540,2 (28%)

(+) $[M-CH_2PO(OH)_2+H^+]^+$ 447,3; $[M+H^+]^+$ 541,2 (100%);
 $[M+Na^+]^+$ 563,2; $[M+K^+]^+$ 579,2

3.3.6 1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen (7a)

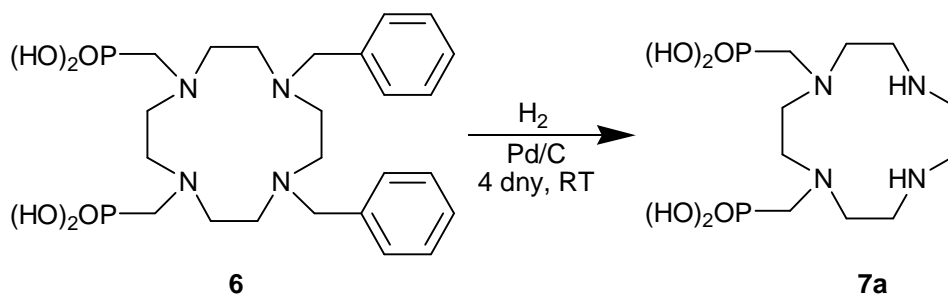
Postup 1:



V baňce bylo rozpuštěno 0,140 g (0,389 mmol) látky **6** v 10 ml 50% AcOH. K roztoku bylo přidáno 0,020 g Pd adsorbovaného na aktivním uhlí. K baňce byl připojen balónek s asi 3 dm³ H₂. Směs byla nechána míchat za RT 3 dny a průběžně kontrolována TLC (NH₃:EtOH 1:5, detekce UV, ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **6** – skvrna s $R_f = 0,7$; produkt **7a** – skvrna s $R_f = 0,2$). Poté byla směs přefiltrována přes filtrační papír a odpařena na RVO do sucha. Z odparku byly odebrány vzorky na NMR, kde byly nalezeny signály v aromatické oblasti v ¹H spektru, proto byla směs opět rozpuštěna v 10 ml 50% AcOH a 5 ml EtOH. K roztoku bylo přidáno 0,100 g Pd adsorbovaného na aktivním uhlí. K baňce byl připojen balónek s asi 3 dm³ H₂. Směs byla nechána míchat při 50 °C 36 hodin a průběžně kontrolována TLC (viz výše). Poté byla směs přefiltrována přes filtrační papír, odpařena na RVO. Z látky **7a** ve formě nažloutlého prášku byly odebrány vzorky na NMR a MS.

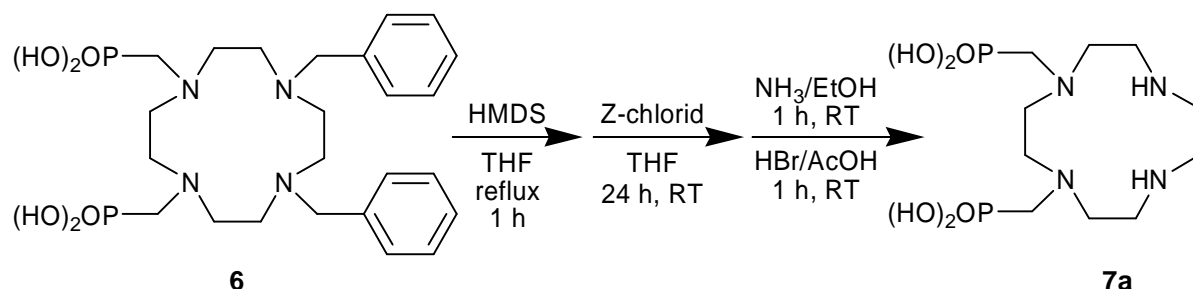
Výtěžek: 0,080 g

Postup 2:



V baňce bylo rozpuštěno 1,80 g (5,00 mmol) látky **6** (připravené *postupem 2*) v 50 ml 50% AcOH. K roztoku bylo přidáno 0,870 g Pd adsorbovaného na aktivním

uhlí. K baňce byl připojen balónek s asi 4 dm³ H₂. Směs byla míchána za RT 4 dny a průběžně kontrolována TLC (NH₃:EtOH 1:5, detekce UV, ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **6** – skvrna s R_f = 0,7; produkt **7a** – matná skvrna s R_f = 0,2). Poté byla směs zahřívána na 50 °C, při kterých byla míchána 1,5 dne. Po kontrole TLC (viz výše) a NMR byla přefiltrována přes filtrační papír a odpařena na RVO. Hydrogenační debenzylace téměř neprobíhala.



Látka **6** byla poté odpařena s 20 ml toluenu a 10 ml suchého THF. Následně byla látka **6** suspendována do 40 ml suchého THF a 20 ml HMDS. Směs byla 1 hodinu refluxována. Poté byla odpařena do sucha, opět rozpuštěna do 40 ml suchého THF a bylo přidáno 5,00 g Z-chloridu. Směs byla nechána míchat 24 hodin. Poté bylo přidáno 5 ml koncentrovaného NH₃ v 5 ml EtOH na hydrolýzu silyl esterů a přebytku Z-chloridu. Po 1 hodině míchání byla směs odpařena na RVO, rozpuštěna v ledové AcOH syčené HBr (cca 33%) a nechána míchat 1 hodinu. Poté byla směs odpařena na RVO, rozpuštěna v 30 ml H₂O a třikrát vytřepána 20 ml CHCl₃ pro odstranění nepolárních nečistot. Produkt byl přečištěn na silném kationtovém iontoměniči v H⁺ cyklu (300 cm³) promytém H₂O. Iontoměnič byl promyt H₂O (1000 ml), NH₃:EtOH 1:5 (700 ml) a nakonec regenerován HCl:H₂O 1:1 (250 ml). NH₃ fáze obsahující produkt byly spojeny a po odpaření na RVO byl produkt dále čištěn na slabém kationtovém iontoměniči v H⁺ cyklu (300 cm³) promytém H₂O. Produkt byl eluován H₂O (1500 ml). Frakce byly jímány po 300 ml, po eluci produktu byl iontoměnič regenerován HCl:H₂O 1:1 (250 ml). Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny na RVO. Z produktu **7a** ve formě nažloutlé pevné látky byly odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 1,04 g

Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 3,00-3,18 (N-CH₂-CH₂-N, 12H, m); 3,24 (N-CH₂-P, 4H, d, ²J_{PH} = 7,80 Hz); 3,30 (N-CH₂-CH₂-N, 4H, s)

¹³C δ 44,4; 45,1 (C-NH-C-C-NH-C); 52,7 (N-C-P, d, ¹J_{PC} = 144,80 Hz); 53,8; 53,9

(C–N–C–P)

$^{31}\text{P} \{^1\text{H}\} \delta$ 16,9 (bs)

$^{31}\text{P} \delta$ 16,9 (br)

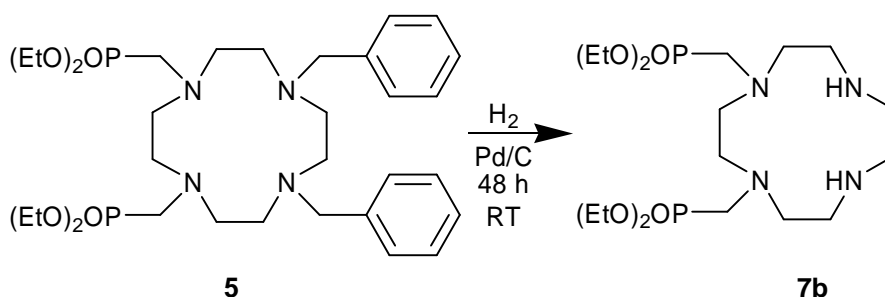
MS nalezené: (–) 358,7 (100%); 359,7 (12%)

(+) 360,8 (100%); 398,8 (28%)

MS teoretické: (–) $[\text{M}-\text{H}^+]^-$ 359,1 (100%); 360,1 (13%)

(+) $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ 361,1 (100%); 362,1 (13%); $[\text{M}+\text{K}^+]^+$ 399,1

3.3.7 1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (7b)



V baňce bylo rozpuštěno 1,32 g (0,202 mmol) látky **5** v 5 ml EtOH a 5 ml 50% AcOH. K roztoku bylo přidáno 0,600 g Pd adsorbovaného na aktivním uhlím. K baňce byl připojen balónek s asi 3 dm³ H₂, který byl po 1 dni znovu naplněn. Průběh reakce byl kontrolován TLC (NH₃:EtOH 1:10, detekce UV, ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **5** – skvrna s $R_f = 0,8$; produkt **7b** – skvrna s $R_f = 0,4$). Po 2 dnech míchání za RT byla směs přefiltrována přes filtrační papír a odpařena. Po zvážení byly z produktu ve formě nažloutlého oleje odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 0,880 g (95%)

Charakterizace:

NMR (D₂O): $^1\text{H} \delta$ 1,27 (CH₃, 12H, t, $^3J_{\text{HH}} = 6,90$ Hz); 2,86-3,35 (N–CH₂–CH₂–N, N–CH₂–P, 20H, br); 4,15 (O–CH₂–CH₃, 8H, p, $^3J_{\text{HH}} = 7,50$ Hz, $^3J_{\text{PH}} = 7,50$ Hz)

$^{31}\text{P} \{^1\text{H}\} \delta$ 29,7 (s)

$^{31}\text{P} \delta$ 29,7 (p, $^2J_{\text{PH}} = 7,50$ Hz, $^3J_{\text{PH}} = 7,50$ Hz)

$^{13}\text{C} \{^1\text{H}\} \delta$ 18,2 (CH₃, d, $^3J_{\text{PC}} = 5,50$ Hz); 45,0; 49,1; 51,1; 52,3 (N–CH₂–CH₂–N, s); 53,2 (N–CH₂–P, d, $^1J_{\text{PC}} = 146,40$ Hz); 61,6 (O–CH₂–CH₃, d, $^2J_{\text{PC}} = 7,20$ Hz)

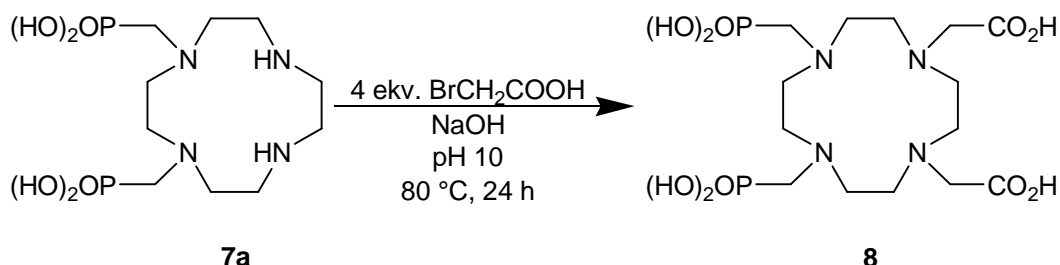
MS nalezené: (+) 473,1 (100%); 474,1 (20%)

MS teoretické: (+) $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ 473,3 (100%); 474,3 (22%)

3.3.8 1,4-bis(fosfonomethyl)-7,10-bis(karboxymethyl)cyklen (8)

(pokus o přípravu)

Postup 1:



V baňce bylo rozpuštěno 0,500 g (1,39 mmol) látky **7a** (připravené *postupem* 2) v 5 ml H₂O. K roztoku bylo přidáno 0,770 g (5,56 mmol) bromoctové kyseliny a na špičku špachtle fenolftaleinu. Směs byla zahřáta na 80 °C. Ke směsi byl v průběhu reakce přikapáván 10% roztok NaOH do slabého růžového zbarvení, po cca 3 hodinách se pH reakční směsi ustálilo na hodnotě 10 a nebylo již dále nutné přikapávat 10% NaOH. Po 24 hodinách byla reakční směs nanášena na silný kationtový iontoměnič v H⁺ cyklu (400 cm³), který byl promyt H₂O. Po eluci H₂O (500 ml) a NH₃ (700 ml) byla provedena kontrola TLC (IPAV 7:3:3, detekce ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **8** – snad skvrna s R_f = 0,1; dále byly nalezeny skvrny s R_f = 0,3 a 0,7) a NMR z NH₃ frakcí. NMR se ukázalo jako neprůkazné, jelikož se v ³¹P spektru objevilo mnoho signálů. Proto byly všechny frakce, jak H₂O tak NH₃ spojeny a nechány hydrolyzovat v 50 ml 19% HCl při 100 °C, kvůli podezření na možnou esterifikaci fosfonátových skupin. Po odpaření byla směs nanášena na silný kationtový iontoměnič (viz výše). Z NH₃ frakcí, které se jevíly dle TLC (viz výše) jako čisté byly odebrány vzorky na NMR, které neprokázaly prakticky žádné zlepšení oproti stavu před hydrolyzou. Látku **8** se nepodařilo tímto postupem připravit.

Výtěžek: 0 g

Charakterizace:

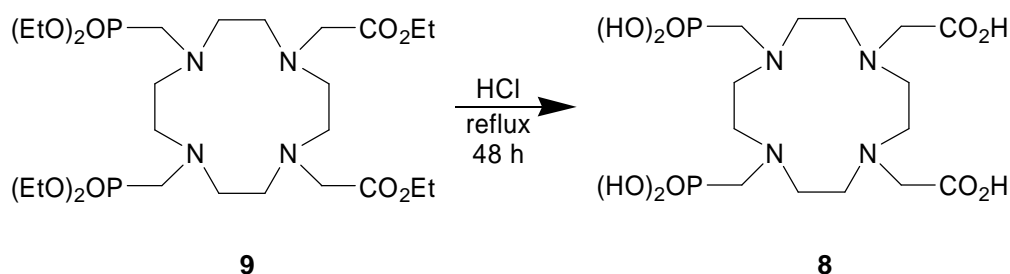
NMR (D₂O): ³¹P {¹H} δ 8,0 (20P, s); 14,1 (12P, br); 19,7 (18P, s); 21,2 (25P, s); 23,4 (24P, s)

³¹P δ 8,0 (t, J = 11,00 Hz); 14,1 (br); 19,7 (t, J = 10,40 Hz); 21,2 (br); 23,4 (br)

MS nalezené: (–) 507,0 (100%); 454,8 (40%)

MS teoretické: (–) [M+H⁺]⁺ 475,1 (100%); 476,1 (16%)

Postup 2:



V baňce bylo rozpuštěno 0,970 g (1,51 mmol) látky **9** v 20 ml 19% HCl a refluxováno 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí ^{31}P a ^1H NMR. Podle ^{31}P spekter se nejevila reakce úplně dokončená, nicméně v ^1H spektru nebyly nalezeny žádné signály ethylesterů. Provedena byla i analýza TLC (IPAV 7:3:3, detekce ninhydrin, roztok octanu měďnatého **8** – snad skvrna s $R_f = 0,1$; dále byly nalezeny skvrny s $R_f = 0,4$ a $0,6$). Poté byla směs odpařena na RVO do sucha a dále byla přečištěna na silném kationtovém iontoměniči v H^+ cyklu (400 cm^3), který byl promyt H_2O . Po eluci H_2O (500 ml) a NH_3 (700 ml) byla provedena kontrola TLC (viz výše). Bylo zjištěno, že jedna látka má na iontoměniči větší retenci, proto byla směs na regenerovaný iontoměnič nanášena znovu a byly jímány frakce o objemu 150 ml, které byly analyzovány TLC (viz výše). Došlo k oddělení látky s větší retencí (pravděpodobně sloučenina obsahující fosfinátovou skupinu podle ^1H i ^{31}P NMR spekter) a z TLC čistých frakcí byly odebrány vzorky na charakterizaci, kde se opět ukázalo, že v ^{31}P NMR spektru je směs více látek. Se směsí již nebylo dále pracováno.

Při zpracování výše uvedené kyselé hydrolyzy jiné šarže látky **9** (1,03 g; 1,60 mmol) bylo po odpaření reakční směsi na RVO využito dělení sloupcovou chromatografií s gradientovou elucí (silikagel; 200 cm^3 ; isopropanol – 0,7l – 1. frakce; MeOH – 0,7l – 2. frakce; IPAV 7:3:3 – 0,6l – 3. a 4. frakce). Průběh chromatografie byl kontrolován TLC (viz výše). V 1. a 2. frakci nebyla nalezena žádná skvrna barvící se Cu, pouze látky s vysokým R_f viditelné pod UV. V 3. a 4. frakci byly látky s $R_f = 0,2$. Frakce 3 byla dále nanášena na slabý kationtový iontoměnič v H^+ cyklu (200 cm^3), který byl promyt H_2O . Frakce byly jímány po 100 ml a analyzovány TLC (viz výše). Z TLC čistých frakcí obsahujících hmotu (1. a 2. frakce) byly odebrány vzorky na NMR. Opět se ukázalo, že se jedná o směs látek, dále již nebylo s dělením

pokračováno, neboť s každým čistícím krokem byl zaznamenán cca 30% úbytek hmoty. Látku **8** se nepodařilo tímto postupem připravit.

Výtěžek: 0 g

Charakterizace:

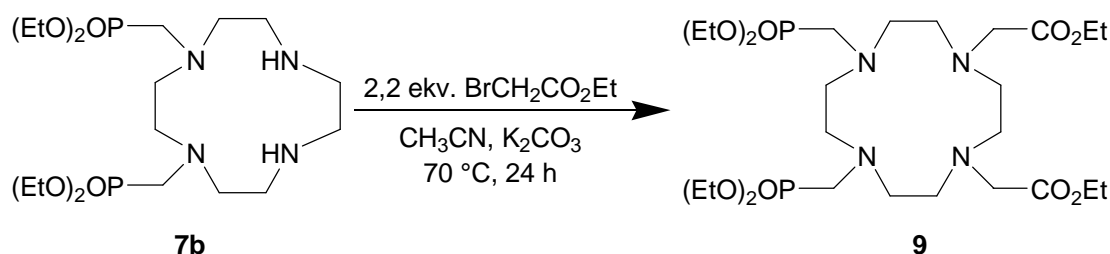
NMR (D₂O): ³¹P {¹H} δ 12,4 (br); 13,0-14,0 (br); 17,5-21,0 (br); 25,6 (s); 26,1 (s)

³¹P δ 12,4 (11P, br); 13,0-14,0 (10P, br); 17,5-21,0 (60P, br); 22,9-24,0 (15P, br)

MS nalezené: (-) 512,9 (100%); 518,9 (50%); 534,9 (25%)

MS teoretické: (-) [M-H]⁻ 475,1 (100%); 476,1 (16%)

3.3.9 1,4-bis(diethylfosfonomethyl)-7,10-bis(etoxykarbonylmethyl)-cyklen (9)



V baňce bylo rozpuštěno 1,90 g (4,02 mmol) látky **7b** v 25 ml CH₃CN. K roztoku bylo přidáno 1,22 g (8,86 mmol) K₂CO₃ a 1,46 g (8,85 mmol) BrCH₂CO₂Et. Po 15 hodinách míchání při 70 °C byla reakční směs přefiltrována přes S4 fritu a odpařena na RVO. Poté byla třikrát vytřepána mezi 100 ml CHCl₃ a 100 ml H₂O. Chloroformové fáze byly spojeny a odpařeny na RVO. Směs byla dále dělena sloupcovou chromatografií (silikagel; 300 cm³; EtOH – 700 ml; NH₃:EtOH 1:10 – 700 ml). Byly jímány frakce o objemu asi 70 ml a analyzovány TLC (NH₃:EtOH 1:10, detekce UV, ninhydrin, roztok octanu měďnatého, produkt **9** – skvrna s R_f = 0,3). Z produktu ve formě nažloutlého oleje byly odebrány vzorky na charakterizaci. Podle MS i NMR spekter byla získána směs produktu **9** (asi 60 % podle ³¹P NMR) a zřejmě 1-fosfonomethyl-4,7,10-triskarboxymethylcyklenem.

Výtěžek: 1,91 g

Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 1,20 (CH₃-CH₂-O-P, 6H, t, ³J_{HH} = 7,20 Hz); 1,28 (CH₃-CH₂-O-C, 12H, t, ³J_{HH} = 3,60 Hz); 2,50-2,95 (N-CH₂-CH₂-N, 14H, br); 2,95-3,45 (N-CH₂-CH₂-N, N-CH₂-P, N-CH₂-C-O, 10H, br); 4,12 (12H, CH₃-CH₂-O, h, ³J_{HH} = 3,60 Hz, ³J_{PH} = 7,20 Hz)

^{31}P { ^1H } δ 30,6 (60P, s); 31,1 (40P, s)

^{31}P δ 30,5 (p, $^2J_{\text{PH}} = 7,20$ Hz, $^3J_{\text{PH}} = 7,20$ Hz); 31,1 (p, $^2J_{\text{PH}} = 7,20$ Hz, $^3J_{\text{PH}} = 7,20$ Hz)

MS nalezené: (+) 559,2 (20%); 581,3 (6%); 603,3 (68%); 645,3 (59%);
667,3 (100%)

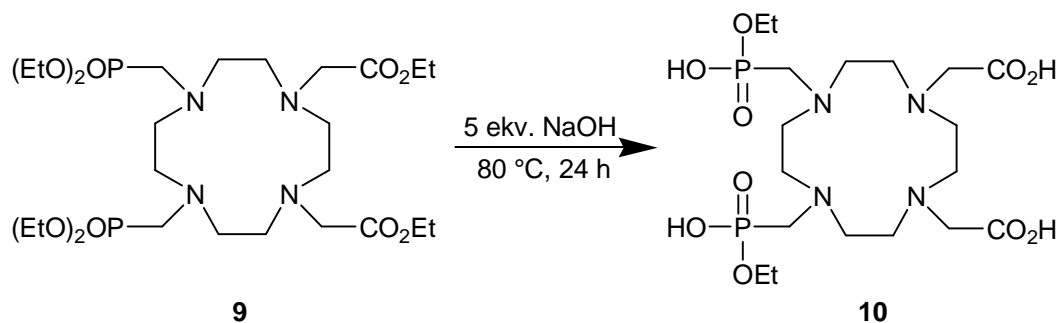
MS teoretické: (+) $[\text{M}-\text{CH}_2\text{COOEt}+\text{H}^+]^+$ 559,3;

$[\text{1-fosfonomethyl-4,7,10-triskarboxymethylcyklen}+\text{H}^+]^+$ 581,3

$[\text{1-fosfonomethyl-4,7,10-triskarboxymethylcyklen}+\text{Na}^+]^+$ 603,3;

$[\text{M}+\text{H}^+]^+$ 645,3 (100%); 646,3 (31%); $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$ 667,3;

3.3.10 1,4-bis(monoethylfosfonomethyl)-7,10-bis(karboxymethyl)- cyklen (10)



V baňce bylo rozpuštěno 1,40 g (2,17 mmol) látky **9** (cca 60% čistota) v 10 ml H_2O . K roztoku bylo přidáno 0,435 g (10,9 mmol) NaOH. Směs byla zahřáta na $80\text{ }^\circ\text{C}$ a průběžně kontrolována univerzálním pH papírkem, zda je pH vyšší než 12. Směs byla nechána míchat 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován TLC ($\text{NH}_3:\text{EtOH}$ 1:5, detekce UV, ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **9** skvrna s $R_f = 0,8$; produkt **10** skvrna s $R_f = 0,2$). Poté byla směs zfiltrována přes sloupec silikagelu (200 cm^3 , $\text{NH}_3:\text{EtOH}$ 1:5, 700 ml). Frakce byly jímány po 200 ml. Z frakce obsahující dle TLC produkt **10** byly po odpaření a zvážení produktu ve formě pevné bílé látky odebrány vzorky na charakterizaci, z které vyplynulo, že látku **10** se nepodařilo tímto postupem připravit.

Výtěžek: 0 g

Charakterizace:

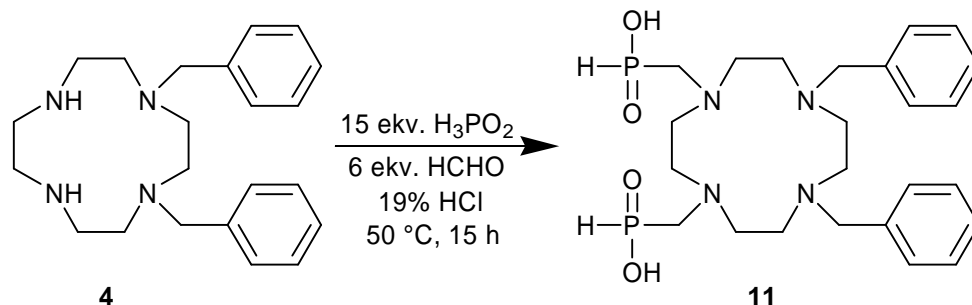
NMR (CDCl_3): ^1H δ 1,17 (CH_3 , 9H, t, $^3J_{\text{HH}} = 7,80$ Hz); 2,90-3,80 ($\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{P}$, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOEt}$, 32H, br); 3,90 ($\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, 4H, p, $^3J_{\text{PH}} \sim ^3J_{\text{HH}} = 7,80$ Hz)

^{31}P { ^1H } δ 24,9 (42P, s); 20 (40P, s); 12,4 (17P, s)

MS nalezené: (–) 504,9 (100%); 280,8 (70%); 252,7 (70%)

MS teoretické: (-) $[M-H]^+$ 531,2 (100%); 532,2 (22%)

3.3.11 1,4-dibenzyl-7,10-bis(fosfinomethyl)cyklen (11)



V baňce bylo rozpuštěno 0,640 g (1,82 mmol) látky **4** v 5 ml 19% HCl a 5 ml EtOH. Poté bylo přidáno 0,32 g (10,6 mmol) paraformaldehydu a 1,88 g (28,4 mmol) H_3PO_2 . Reakční směs byla zahřáta na 50 °C a nechána reagovat 15 hodin. Poté byla reakční směs odpařena na RVO a dělena na silném kationtovém iontoměnič v H^+ cyklu (250 cm^3) promytém H_2O . Iontoměnič byl promyt H_2O (1000 ml), $NH_3:EtOH$ 1:5 (700 ml) a nakonec regenerován $HCl:H_2O$ 1:1 (250 ml). Analýza jímaných frakcí byla provedena pomocí TLC ($NH_3:EtOH$ 1:5, detekce UV, ninhydrin, roztok octanu měďnatého, produkt **11** skvrna s $R_f = 0,5$). NH_3 fáze obsahující produkt byly spojeny a po odpaření na RVO byly z produktu **11** ve formě bílého mikrokrytalického prášku odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 0,770 g (84 %)

Charakterizace:

NMR (D_2O): 1H δ 2,60-3,22 (N- CH_2-CH_2-N , N- CH_2-P , 20H, m); 3,74 (Ph- CH_2-N , 4H, s); 7,02 (P-H, 2H, d $^1J_{PH} = 226,00$ Hz); 7,12-7,40 (Arom., 10H, m)

^{13}C $\{^1H\}$ δ 50,6; 52,2 (N-C-C-N, s); 52,9 (C-N-C-P, d, $^2J_{PC} = 4,45$ Hz); 54,4 (N-C-C-N, s); 56,0 (N-C-P, d, $^1J_{PC} = 92,90$ Hz); 59,8 (N-C-Ph); 131,5 (2C, Arom.); 131,6 (1C, Arom.); 133,3 (2C, Arom.); 134,6 (1C, Arom., kvartérní)

^{31}P $\{^1H\}$ δ 19,6 (br)

^{31}P δ 19,6 (d, br, $^1J_{PH} = 226,00$ Hz)

MS nalezené: (-) 507,0 (100%); 507,9 (30%)

(+) 509,1 (48%); 531,1 (100%); 553,1 (94%)

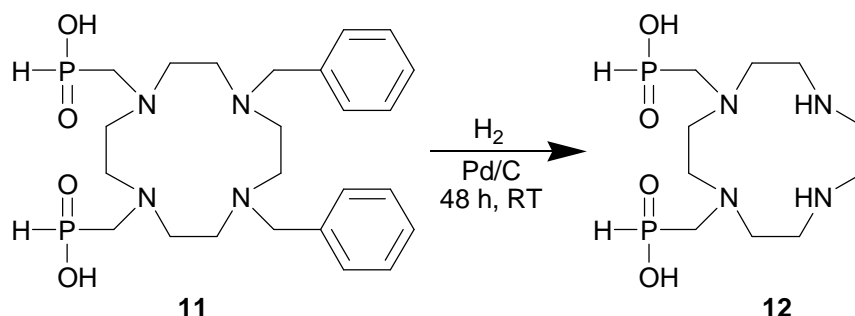
MS teoretické: (+) $[M+H]^+$ 509,2 (100%); 510,2 (28%); $[M+Na]^+$ 531,2;

$[M-H+Na+Na]^+$ 553,2

(-) $[M-H]^+$ 507,2 (100%); 508,2 (28%)

3.3.12 1,4-bis(fosfinomethyl)cyklen (12)

(pokus o přípravu)



V baňce bylo rozpuštěno 0,206 g (0,406 mmol) látky **5** v 5 ml MeOH a 5 ml 50% AcOH. K roztoku bylo přidáno 0,037 g Pd adsorbovaného na aktivním uhlím. K baňce byl připojen balónek s asi 3 dm³ H₂, který byl po 1 dni znovu naplněn. Reakce byla kontrolována TLC (NH₃:EtOH 1:20, detekce UV, ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **11** skvrna s R_f = 0,3, produkt **12** skvrna s R_f = 0,1). Po 2 dnech míchání za RT byla směs přefiltrována přes filtrační papír a odpařena. Po zvážení byly z produktu ve formě nažloutlého oleje odebrány vzorky na charakterizaci, která prokázala odstoupení benzylových skupin, ale i rozklad produktu, nebo substrátu. Látka **12** nebyla tímto postupem připravena.

Výtěžek: 0 g

Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ – nebyly nalezeny žádné signály v aromatické oblasti, přítomné signály však nebylo možné interpretovat

³¹P {¹H} δ 10,3 (52P, s); 12,0 (42P, s)

³¹P δ 10,3 (47P, br); 12,0 (45P, s)

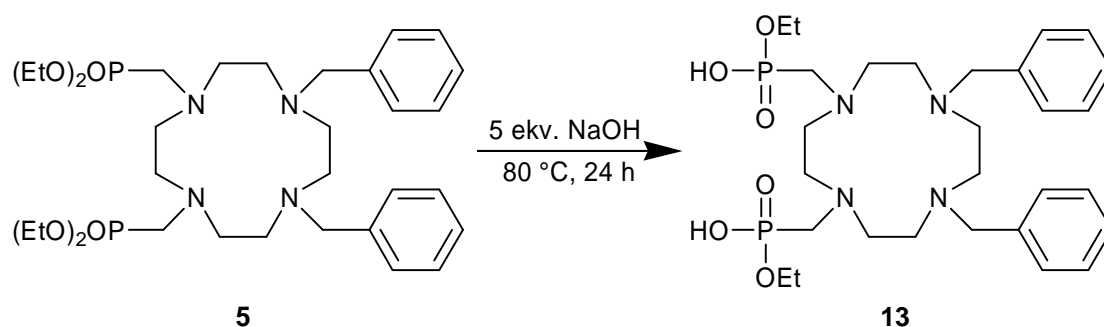
MS nalezené: (–) 254,8 (100%); 278,7 (60%)

(+) 200,8 (89%); 214,8 (100%)

MS teoretické: (–) [M+H⁺]⁺ 328,1 (100%); 329,1 (13%)

(+) [M–H⁺][–] 329,2 (100%); 330,2 (11%)

3.3.13 1,4-dibenzyl-7,10-bis(monoethylfosfonomethyl)cyklen (13)



V baňce bylo rozpuštěno 0,200 g (0,31 mmol) látky **5** v 5 ml EtOH a 5 ml H₂O. K roztoku bylo přidáno 0,062 g (1,53 mmol) NaOH. Směs byla zahřáta na 80 °C a průběžně kontrolována univerzálním pH papírkem, zda je pH vyšší než 12. Směs byla nechána míchat 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován TLC (NH₃:EtOH 1:5, detekce UV, ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **5** skvrna s $R_f = 0,8$; produkt **13** skvrna s $R_f = 0,6$). Poté byla směs zfiltrována přes sloupec silikagelu (200 cm³, NH₃:EtOH 1:5). Z jediné frakce o objemu 0,5 l byly po odpaření a zvažení produktu ve formě nažloutlého oleje odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 0,160 g

Charakterizace:

NMR (CDCl₃): ¹H δ 1,22 (CH₃, 6H, t, ³J_{HH} = 6,90 Hz); 2,40-3,40 (N-CH₂-CH₂-N, N-CH₂-P, N-CH₂-Ph, 24H, br); 3,71 (O-CH₂-CH₃, 4H, p, ³J_{PH} ~ ³J_{HH} = 6,90 Hz); 6,95-7,22 (Arom., 10H, br)

³¹P {¹H} δ 14,9 (s)

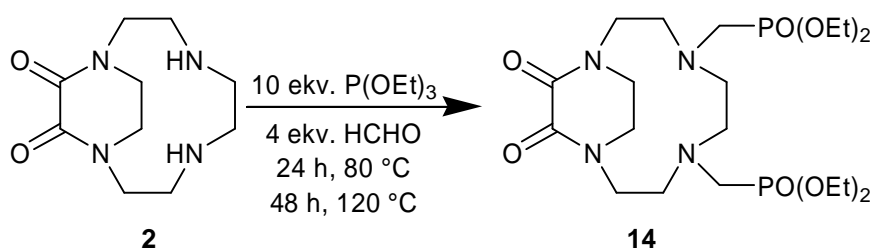
MS nalezené: (-) 595,1 (100%); 596,1 (30%)

(+) 597,3 (100%); 598,3 (33%) [M+H⁺]⁺; 619,2 (60%);
635,2 (22%)

MS teoretické: (-) [M-H⁺]⁻ 595,3 (100%); 596,3 (33%)

(+) [M+H⁺]⁺ 597,3 (100%); 598,3 (33%); [M+Na⁺]⁺ 619,3;
[M+K⁺]⁺ 635,3

3.3.14 1,4-bis(diethylfosfonomethyl)oxalylcyklen (14)



V baňce byl rozpuštěn 1,00 g (4,42 mmol) látky **2** v 25 ml triethylfosfitu (23,0 g; 140 mmol). Poté bylo přidáno 0,550 g (18,0 mmol) paraformaldehydu. Reakční směs byla zahřáta na 80 °C a nechána míchat 24 hodin. Průběh reakce byl sledován TLC (IPA:EtOH 1:10, detekce UV, ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **2** – skvrna s $R_f = 0,2$; produkt **14** – postupně narůstající skvrna s $R_f = 0,8$). Po 24 hodinách se na TLC téměř nevyskytovala skvrna produktu, proto byla zvýšena teplota na 120 °C a reakce byla nechána míchat dalších 48 hodin. Podle TLC vymizela skvrna výchozí látky. Reakční směs byla dělena sloupcovou chromatografií (silikagel, 300 cm³, MeOH). Frakce byly jímány po 70 ml. Z frakce obsahující produkt **14** byly po zvážení odebrány vzorky na charakterizaci. Produkt měl podobu bílého prášku. U ostatních nečistých frakcí byl učiněn nový pokus o separaci sloupcovou chromatografií, ta však opět nevedla k čistým látkám.

Výtěžek: 0,100 g

Charakterizace:

NMR (CDCl₃): ¹H δ 1,26 (CH₃, 12H, dt, ³J_{HH} = 7,20 Hz, ⁴J_{PH} = 0,60 Hz); 2,55-2,78 (N-CH₂-CH₂-N, 10H, br, m); 3,00-3,22 (N-CH₂-P, 4H, br, m); 3,45 (N-CH₂-CH₂-N, 2H, m); 3,70 (N-CH₂-CH₂-N, 2H, br); 4,04 (O-CH₂-CH₃, 8H, p, ³J_{HH} ~ ³J_{PH} = 7,20 Hz); 4,25 (N-CH₂-CH₂-N, 2H, br)

³¹P {¹H} δ 26,4 (s)

³¹P δ 26,4 (br)

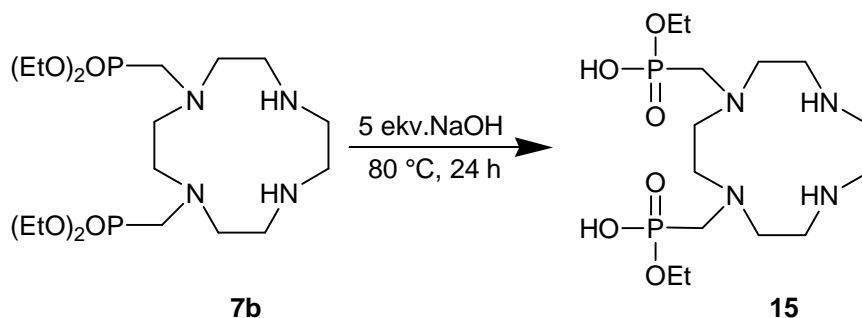
MS nalezené: (+) 549,2 (100%); 550,2 (22%)

MS teoretické: (+) [M+H⁺]⁺ 527,2 (100%); 528,2 (24%);

[M+Na⁺]⁺ 549,2 (100%); 550,2 (24%)

3.3.15 1,4-bis(monoethylfosfonomethyl)cyklen (15)

Postup 1:



V baňce bylo rozpuštěno 1,30 g (2,02 mmol) látky **7b** v 5 ml EtOH a 5 ml H₂O. K roztoku bylo přidáno 0,404 g (10,1 mmol) NaOH. Směs byla zahřáta na 80 °C a průběžně kontrolována univerzálním pH papírkem, zda je pH vyšší než 12. Směs byla nechána míchat 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován TLC (NH₃:EtOH 1:5, detekce UV, ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **7b** skvrna s $R_f = 0,6$, produkt **15** skvrna s $R_f = 0,3$). Poté byla směs dělena sloupcovou chromatografií (silikagel, 200 cm³, NH₃:EtOH 1:5). Frakce byly jímány po 70 ml. Frakce obsahující produkt byly spojeny. Po odpaření a zvážení produktu **15** ve formě nažloutlého oleje byly odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 1,02 g

Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 1,15 (CH₃, 6H, t, ³J_{HH} = 7,20 Hz); 2,95-3,05 (N-CH₂-CH₂-N, 7H, br); 3,05-3,28 (N-CH₂-CH₂-N, N-CH₂-P, 13H, br); 3,88 (O-CH₂-CH₃, 4H, p, ³J_{PH} ~ ³J_{HH} = 7,20 Hz)

¹³C {¹H} δ 18,5 (CH₃, d, ³J_{PC} = 5,00 Hz); 44,5; 45,8 (C-NH-C-C-NH-C); 51,4 (N-C-P, d, ¹J_{PC} = 144,30 Hz); 53,2; 54,3 (C-N-C-P); 63,4 (CH₂-CH₃, d, ²J_{PC} = 6,03 Hz)

³¹P {¹H} δ 17,7 (s)

³¹P δ 17,7 (br)

MS nalezené: (-) 414,9 (100%); 415,8 (17%)

(+) 439,0 (31%); 461,0 (37%) [M+Na+Na]⁺;

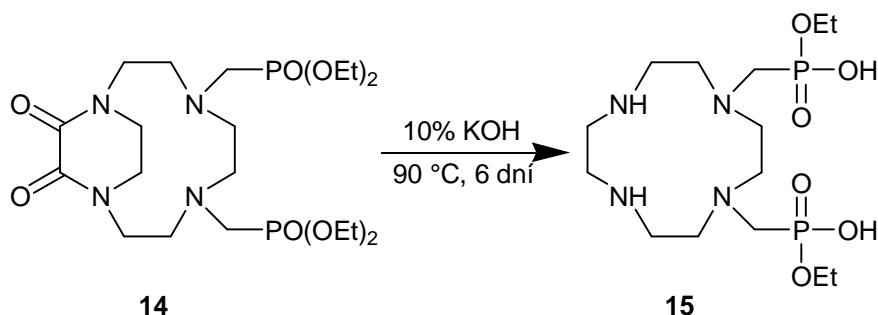
477,0 (100%) [M+Na+K]⁺

MS teoretické: (-) [M-H]⁻ 417,2 (100%); 418,2 (17%);

(+) [M+H]⁺ 416,2 (100%); 417,2 (17%); [M+Na]⁺ 439,2;

[M-H+Na+K]⁺ 477,1

Postup 2:



V baňce bylo rozpuštěno 0,10 g (0,190 mmol) látky **14** v 5 ml EtOH a 5 ml H₂O. K roztoku bylo přidáno 0,60 g (1,07 mmol) KOH. Směs byla zahřívána na 90 °C a průběžně kontrolována TLC (NH₃:EtOH 1:5, detekce UV, ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **14** skvrna s $R_f = 0,9$; produkt **15** skvrna s $R_f = 0,3$). Po třech dnech bylo do reakce přidáno 0,400 g (7,14 mmol) KOH, jelikož podle TLC téměř neprobíhala. Po dalších třech dnech míchání byla směs odpařena a nanesena na silný kationtový iontoměnič v H⁺ cyklu (150 cm³) promytý H₂O. Iontoměnič byl promyt H₂O (200 ml), NH₃:EtOH 1:5 (300 ml) a nakonec regenerován HCl:H₂O 1:1 (200 ml). Analýza jímaných frakcí byla provedena pomocí TLC (viz výše), která nepotvrdila výskyt produktu. Jak ve vodných, tak v NH₃ fázích se nacházela látka nerozpustná v H₂O i EtOH. Bylo naměřeno pouze ³¹P NMR spektrum v nedeuterovaném rozpouštědle.

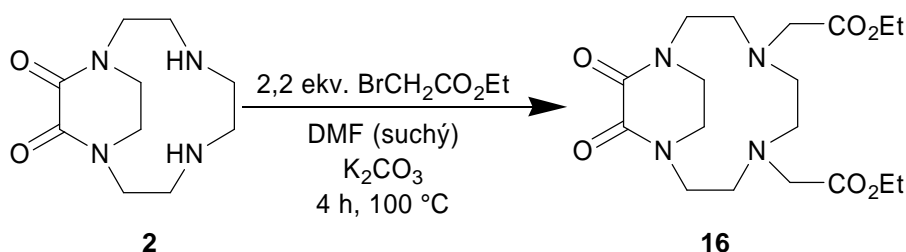
Výtěžek: 0 g

Charakterizace:

NMR ³¹P {¹H} δ 23,9 (s); 24,0 (s); 24,2 (s)

³¹P δ 24,0 (br)

3.3.16 1,4-bis(etoxykarbonylmethyl)-7,10-oxalylcyclohexan (16)



V baňce bylo rozpuštěno 1,00 g (4,02 mmol) látky **2** v 50 ml suchého DMF. K roztoku bylo přidáno 6,00 g (40,2 mmol) K₂CO₃ a 1,48 g (8,96 mmol) BrCH₂CO₂Et.

Průběh reakce byl sledován TLC (IPA:EtOH 1:10, detekce UV, ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **2** – skvrna s $R_f = 0,2$; produkt **16** – postupně narůstající skvrna s $R_f = 0,8$). Po 5 hodinách míchání při 100 °C vymizela skvrna látky **2** a reakční směs byla přefiltrována přes S4 fritu a odpařena na RVO. Poté byla třikrát vytřepána mezi CHCl_3 a H_2O . Chloroformové fáze byly spojeny a odpařeny na RVO. Směs byla dále dělena sloupcovou chromatografií (silikagel; 200 cm^3 ; MeOH – 0,8l). Byly jímány frakce o objemu asi 60 ml a analyzovány TLC (MeOH, detekce UV, ninhydrin, roztok octanu měďnatého, produkt **16** skvrna s $R_f = 0,5$). Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny na RVO. Z produktu ve formě bílého prášku byly odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 1,40 g (79 %)

Charakterizace:

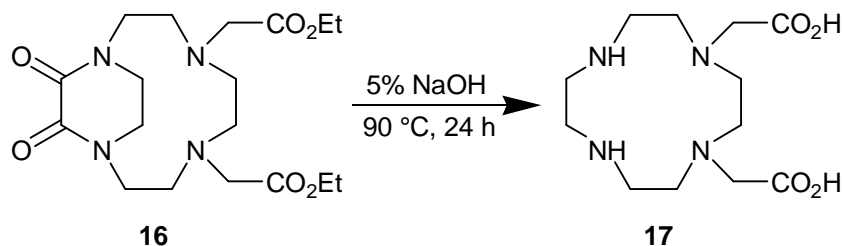
NMR (D_2O): ^1H δ 1,20 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$, 6H, t, $^3J_{\text{HH}} = 7,20$ Hz); 2,45-2,90 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, 10H, br); 2,95-3,40 ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, $\text{N-CH}_2\text{-C-O}$, 10H, br); 4,12 (4H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$, q, $^3J_{\text{HH}} = 7,20$ Hz)

MS nalezené: (+) 399,0 (27%) ; 421,0 (100%)

MS teoretické: (+) $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ 399,2 (100%); 400,2 (22%); $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$ 421,2

3.3.17 1,4-bis(etoxykarbonylmethyl)cyklen (**17**)

(pokus o přípravu)



V baňce bylo rozpuštěno 1,20 g (0,190 mmol) látky **16** v 25 ml EtOH a roztoku 1,50 g (37,5 mmol) NaOH v 25 ml H_2O . Směs byla zahřáta na 90 °C a průběžně kontrolována TLC (IPA:EtOH 1:10, detekce UV, ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **16** skvrna s $R_f = 0,5$, produkt **17** skvrna s $R_f = 0,1$). Po 24 hodinách byla směs odpařena a nanesena na silný kationtový iontoměnič v H^+ cyklu (200 cm^3) promytý H_2O . Iontoměnič byl promyt H_2O (400 ml), NH_3 :EtOH 1:5 (400 ml) a nakonec regenerován HCl: H_2O 1:1 (250 ml). Analýza jímáných frakcí byla provedena pomocí TLC (viz výše), která značila směs látek v NH_3 fázi. NH_3 fáze byla dále dělena

sloupcovou chromatografií (silikagel, 200 cm³, IPA 12:3:5 – 0,5 l, 7:3:3 – 0,5 l). Frakce byly jímány po 60 ml. Z frakcí se při stání na stole vylučovala bílá sraženina, která byla odfiltrována. Sraženina ve formě mikrokrytalického bílého prášku byla nerozpustná v polárních i nepolárních rozpouštědlech. TLC nebylo účinné v potvrzení výskytu produktu v jednotlivých frakcích. Pokus o naměření NMR spekter se nezdařil, údajná hmota v kyvetě neposkytovala téměř žádný signál. MS spektra sice vykazovala signály produktu, nicméně vždy se jednalo o jeden signál mezi více neinterpretovatelnými. Látku **17** se tímto postupem nepodařilo připravit.

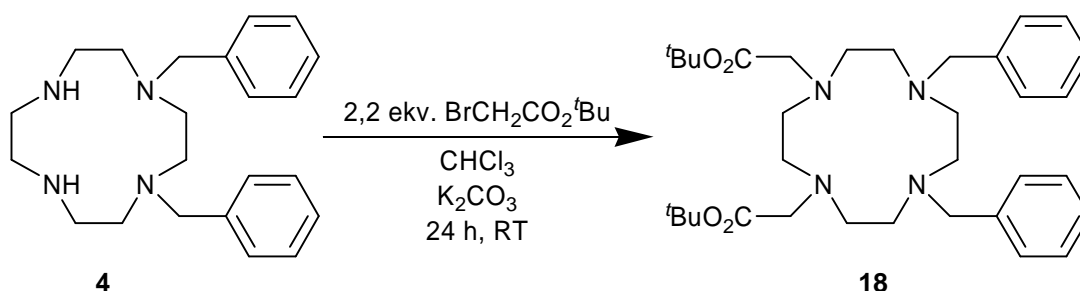
Výtěžek: 0 g

Charakterizace:

MS nalezené: (+) 289,2 (50%); 311,2 (25%)

MS teoretické: (+) [M+H]⁺ 289,2 (100%); 290,2 (15%); [M+Na]⁺ 311,2

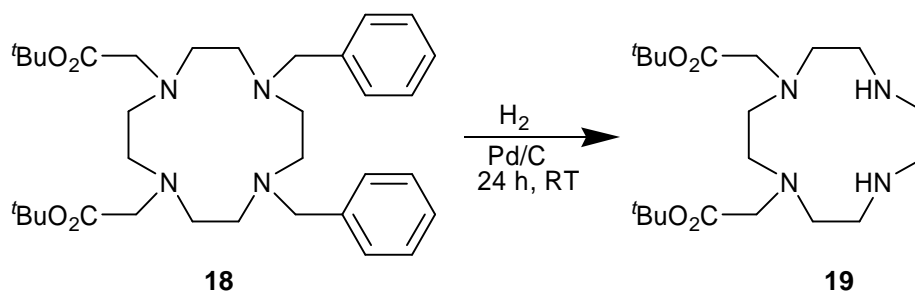
3.3.18 1,4-dibenzyl-7,10-bis(terc-butoxykarbonylmethyl)cyklen (**18**)



V baňce bylo rozpuštěno 2,00 g (5,68 mmol) látky **4** v 100 ml CHCl₃. K roztoku bylo přidáno 7,85 g (57,0 mmol) K₂CO₃ a 2,44 g (12,5 mmol) BrCH₂CO₂^tBu. Průběh reakce byl sledován TLC (NH₃:MeOH 1:20, detekce UV, ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **4** – skvrna s R_f = 0,1; produkt **18** – postupně narůstající skvrna s R_f = 0,7). Po 24 hodinách vymizela skvrna výchozí látky, směs byla přefiltrována přes S4 fritu a odpařena na RVO. Poté byla třikrát vytřepána mezi 100 ml CHCl₃ a 100 ml H₂O. Chloroformové fáze byly spojeny a odpařeny na RVO. Směs byla dále dělena sloupcovou chromatografií (silikagel; 200 cm³; NH₃:MeOH 1:20 – 0,8l). Byly jímány frakce o objemu asi 60 ml a analyzovány TLC (viz výše). Frakce se stejným R_f byly spojeny, odpařeny na RVO a byly z nich odebrány vzorky na analýzu NMR a MS. NMR spektrum se nejevilo jako průkazné. V MS spektru se nacházel pouze signál odpovídající kvarternizaci produktu.

Výtěžek: 1,80 g

3.3.19 1,4-bis(*tert*-butoxykarbonylmethyl)cyklen (**19**)



V baňce bylo rozpuštěno 1,80 g (3,10 mmol) látky **18** v 25 ml EtOH a 25 ml 50% AcOH. K roztoku bylo přidáno 1,11 g Pd adsorbovaného na aktivním uhlím. K baňce byl připojen balónek s asi 3 dm³ H₂. Reakce byla kontrolována TLC (NH₃:EtOH 1:20, detekce UV, ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **18** skvrna s $R_f = 0,6$; produkt **19** skvrna s $R_f = 0,2$). Po 24 hodinách míchání za RT byla směs přefiltrována přes filtrační papír a odpařena. Po zvážení byly z produktu ve formě nažloutlého oleje odebrány vzorky na charakterizaci. Podle MS spektra byla potvrzena debenzylace, ale také přítomnost trisubstituovaného cyklu, tedy tris(*tert*-butoxykarbonylmethyl)cyklenu.

Výtěžek: 1,24 g

Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ – nebyly nalezeny žádné signály v aromatické oblasti, přítomné signály však nebylo možné interpretovat

nalezené: (+) 515,3 (100%); 629,3 (50%)

MS teoretické: (+) [M+H⁺]⁺ 401,3 (100%); 402,3 (24%); [M+CH₂CO₂^tBu+H⁺]⁺ 516,4;
[M+CH₂CO₂^tBu+CH₂CO₂^tBu+H⁺]⁺ 632,5

4. Výsledky a diskuze

4.1 Chránění

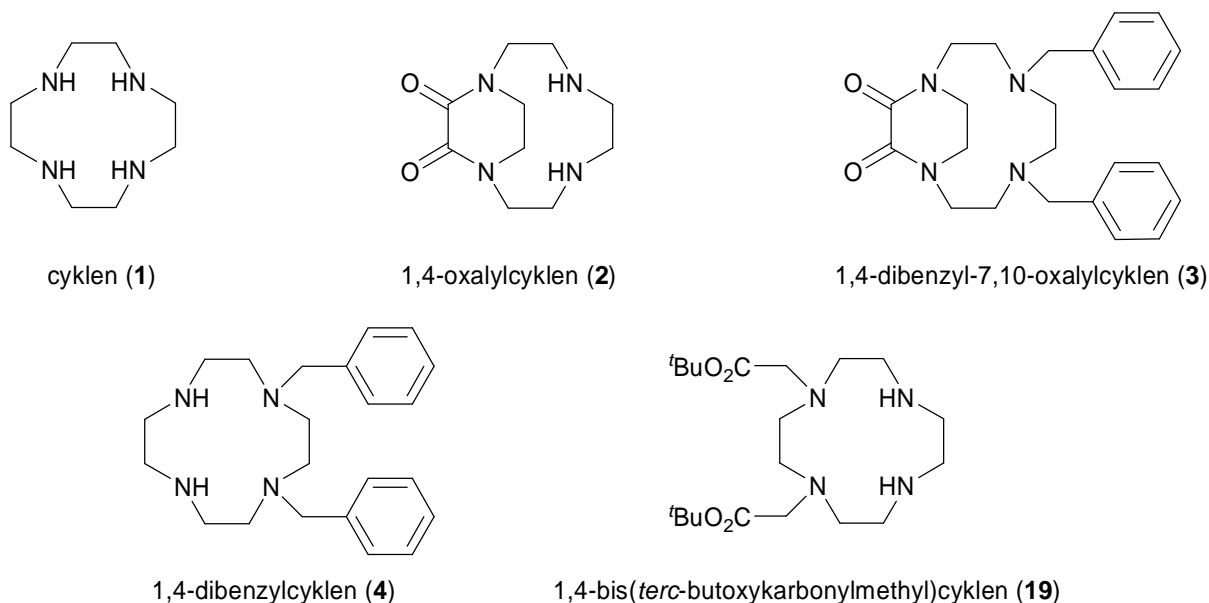
Vzhledem k potížím, které provázely syntézu 1,4-dibenzylcyklenu (**4**) z oxalylycyklenu (**2**) již při bakalářské práci (BP)^[43], byly hledány jiné cesty vedoucí k cyklenu (**1**) chráněnému v polohách 1 a 4.

Jako jedna z nejpřímějších a zároveň rychlých metod se jevila syntéza 1,4-dibenzylcyklenu (**4**) z cyklenu (**1**), která by podle literatury měla dosahovat 78% výtěžku.^[41] I přesto, že byla vždy použita čerstvě sušená rozpouštědla a reagenty, nikdy se nepovedlo dosáhnout vyššího výtěžku než 40 %. Množství vedlejších produktů vznikajících při reakci a následné nesnadné chromatografické dělení mohou být příčinou, proč došlo k takovému poklesu výtěžku oproti avizované hodnotě, zvláště pokud je bráno v úvahu i větší množství reaktantů vstupujících do reakce kvůli přípravě látky **4** ve větším množství, aby mohla být použita v následných syntézách. Kvůli výše zmíněným nevýhodám bylo od tohoto postupu upuštěno.

Přímá syntéza 1,4-bis(*tert*-butoxykarbonylmethyl)cyklenu (**19**)^[42], publikovaná stejnými autory jako přímá syntéza 1,4-dibenzylcyklenu (**4**), byla ze stejných důvodů jako přímá syntéza 1,4-dibenzylcyklenu (**4**) zamítnuta.

Jako další možné řešení chránění cyklenu (**1**) v polohách 1,4 se nabízelo vynechání zavedení benzylové skupiny na oxalylycyklen (**2**). Výchozí chráněnou látkou byl v tomto případě oxalylycyklen (**2**). O syntéze vycházející z oxalylycyklenu (**2**), a proč od ní bylo také upuštěno, bude pojednáno v další části.

Po výše zmíněných neúspěších následoval návrat k benzylovému chránění zaváděnému na kruh cyklenu (**1**) přes oxalylycyklen (**2**). Narozdíl od Bakalářské práce byly vynechány úpravy syntézy zjednodušující zpracování alkylační reakce. Jedinou modifikací od původního návodu^[40] bylo přidání EtOH při hydrolýze 1,4-dibenzylloxalylycyklenu (**3**), neboť 1,4-dibenzylloxalylycyklen (**3**) je látka v silně polárních rozpouštědlech, jakým je i v reakci použitý roztok NaOH, nerozpustná, což by mělo jistě vliv na dobu hydrolýzy nebo její výtěžek. Díky dodržení postupu a pomalému navyšování množství syntetizovaného 1,4-dibenzylcyklenu (**4**) byla připravena výchozí chráněná látka 1,4-dibenzylcyklen (**4**) v gramových množstvích a TLC, MS i NMR čistotě. Navíc postup přes oxalylycyklen (**2**) vylučuje vznik *trans*-regioizomeru (*trans*-1,7-dibenzylcyklenu).



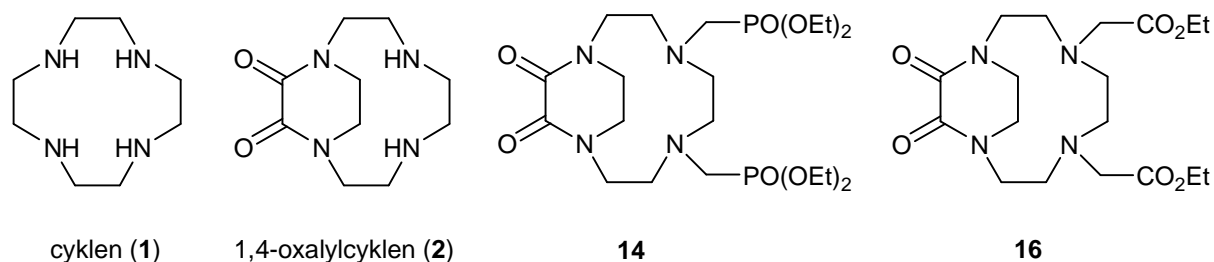
Obrázek 9
Sloučeniny zmíněné v kapitole 4.1

4.2 Oxalicyklenová cesta

Jak bylo zmíněno i v návrhu syntézy, oxalicyklen **2** by mohl sloužit jako výchozí chráněná látka pro cíle této práce. Ukázalo se, že pro alkylace ethylbromacetátem je to látka velmi vhodná a reaguje ochotně. Produkt **16** lze přečistit chromatograficky, navíc vykazuje vysoké výtěžky okolo 80 %. Bohužel obavy z problémů vyvstávajících při hydrolýze v roztoku silného hydroxidu, nutném pro odstranění oxalového můstku, se naplnily. Není jisté, zda při hydrolýze dochází k odstupování pendantů ze skeletu cyklenu (**1**), nebo zda dochází k laktamizaci, jelikož se ze směsi vzniklé hydrolýzou nepodařilo izolovat žádnou dostatečně čistou látku vhodnou pro charakterizaci.

Pokus o Mannichovu reakci oxalicyklenu **2** s triethylfosfitem a paraformaldehydem skončil sice úspěšnou izolací chtěného produktu **14**, nicméně v mizivém množství (cca 4% výtěžek), a dále na zřejmě nedělitelné směsi látek. I přesto byl učiněn pokus o hydrolýzu, avšak bez úspěchu.

Kvůli špatným výtěžkům Mannichovy reakce, nedělitelnosti jejich produktů a neinterpretovatelným výsledkům bazické hydrolýzy nebylo v postupu touto cestou dále pokračováno.



Obrázek 10
Sloučeniny zmíněné v kapitole 4.2

4.3 Dibenzylová cesta

4.3.1 Fosfonátové deriváty

Mannichova syntéza z 1,4-dibenzylcyklenu **4** byla vyzkoušena v malém množství již při práci na BP,^[43] zpracování difosfonátového produktu **5** na silném kationtovém iontoměničce se též osvědčilo. Syntéza ve větším množství, řádově gramech, probíhala bez větších obtíží, pouze s několika málo špatně dělitelnými vedlejšími produkty (cca 5% podle ³¹P NMR spekter).

Kyselá hydrolyza látky **5** probíhala pouze v malém množství, stejně jako následná debenzylace, i když ta až po přidavku neobvykle velkého množství katalyzátoru (cca 50 % hmotnosti substrátu) a zahřátí. V řádově gramovém množství bylo jako hydrolyzační činidlo využito TMSBr, což se velice dobře osvědčilo, jak čistotou produktu **6**, tak kratší reakční dobou. Pokus o hydrogenaci takto hydrolyzovaného bisfosfonátu **6** skončil po 6 dnech a zahřívání na 50 °C téměř nulovou konverzí i za přítomnosti 45 % hmotnosti substrátu Pd/C. Proto bylo přikročeno k odstranění benzylů reakcí se Z-chloridem s následným rozkladem čpavkem a hydrolyzou AcOH sycenou HBr. Opět došlo k úplné konverzi, a to za 1 den.

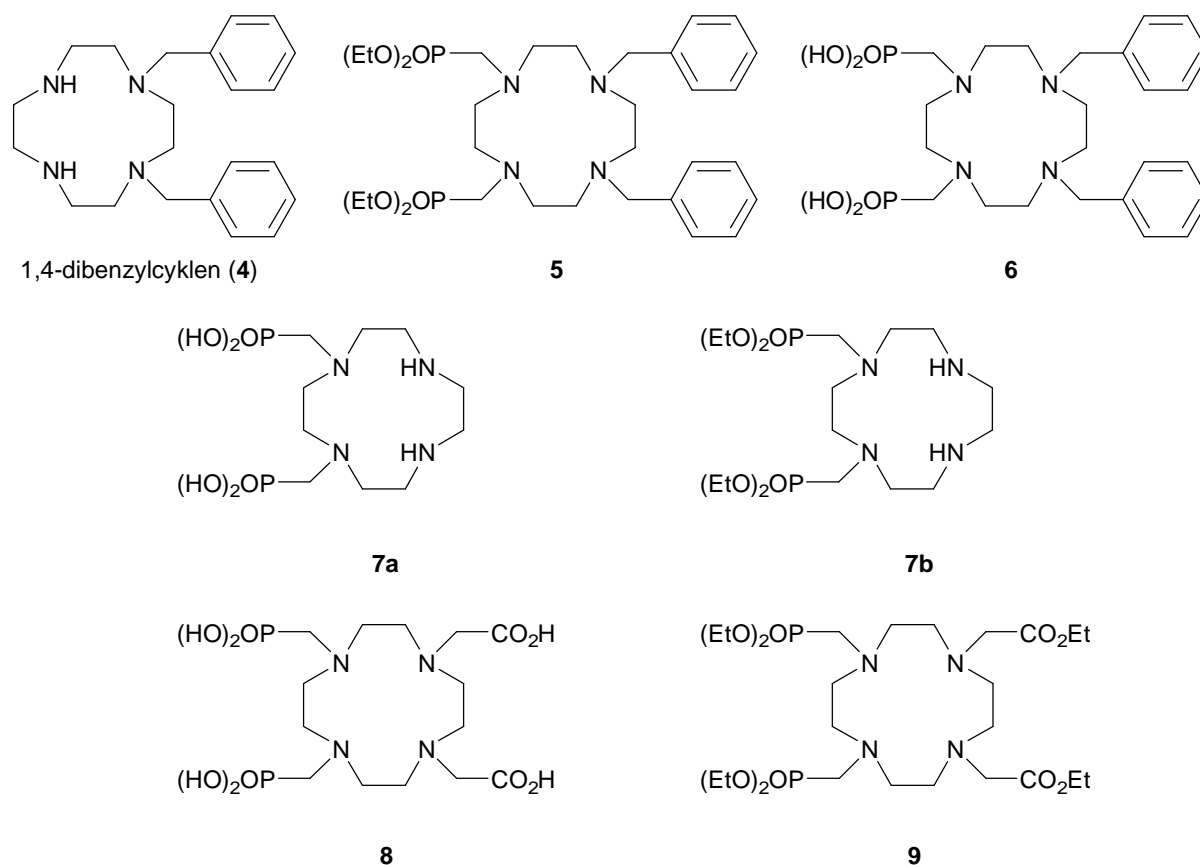
Zavedení karboxylové funkce na hydrolyzovaný debenzylovaný bisfosfonát **7a** bylo provedeno klasickou reakcí s bromoctovou kyselinou za přikapávání roztoku hydroxidu do pH 10. Po proběhnutí reakce se podle ¹H NMR spekter zdálo, že došlo k esterifikaci fosfonátových skupin díky přebytku bromoctové kyseliny, proto byla následně směs převedena do 19% HCl a nechána refluxovat. Zmíněný postup však nevedl k čistší reakční směsi. Bohužel kýžený produkt **8** se z reakční směsi nepodařilo izolovat ani ho v reakční směsi detekovat.

Narozdíl od hydrolyzovaného bisfosfonátu **6** se bisfosfonátový ester **5** hydrogenoval. Za RT a s přídávkem zhruba 60 % hmotnosti substrátu Pd/C (plné debenzylace bylo většinou dosaženo do 3 dnů). Debenzylovaný bisfosfonátový ester **7b** bylo u některých šarží nutno přečistit chromatograficky, neboť nečistoty vzniklé zřejmě již při Mannichově reakci se s dalšími reakcemi navyšovaly.

Na debenzylovaný bisfosfonátový ester **7b** byla zavedena karboxylová funkce pomocí reakce s ethylbromacetátem, její průběh byl sledován většinou pouze TLC a po vymizení skvrny výchozí látky byl produkt reakce **9** zpracován pouhým vytřepáním a okamžitě byl kysele hydrolyzován refluxováním v 19% HCl. Bohužel zpracování nevedlo k izolaci čisté látky **8**. V ^1H spektru však nebyly nalezeny signály ethylových skupin, což naznačuje, že k hydrolyze došlo, nicméně došlo zřejmě i k rozpadu chtěného produktu **8**.

Jelikož kyselá hydrolyzy nefungovaly, byly vyzkoušeny bazické hydrolyzy většinou v takovém molárním poměru, že na každou esterovou skupinu připadal jeden ekvivalent hydroxidu sodného a jeden ekvivalent byl přidáván navíc. Bazická hydrolyza připadala v úvahu jak u benzylového esteru bisfosfonátu **5**, tak debenzylovaného esteru bisfosfonátu **7b** a i esteru bisfosfonátu s ethylesterovými karboxylovými skupinami **9**. Tyto hydrolyzy většinou probíhaly s asi 80 % výtěžky a je pravděpodobné, že budou využity v budoucnu pro syntézu cílové látky.

Nabízí se ještě možnost po zavedení karboxylového pendantu na bisfosfonátový ester **7b** ethylbromacetátem za vzniku látky **9** hydrolyzovat ji TMSBr, pro odstranění ethylesterů fosfonátů, a následně využít bazické hydrolyzy k odstranění ethylesterů karboxylových funkcí. Bohužel tato varianta již z časových důvodů nebyla vyzkoušena.



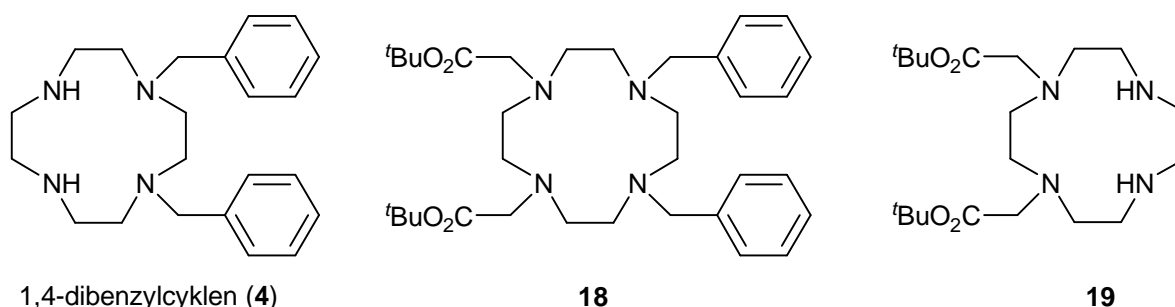
Obrázek 11

Sloučeniny zmíněné v kapitole 4.3.1 Fosfonátové deriváty

4.3.2 Karboxylové deriváty

Kromě zavedení fosfonátové skupiny na dibenzylcyklen **4** bylo také vyzkoušeno navázání karboxylové funkce, a to ve formě *tert*-butylesteru. Bohužel při průběhu reakce dibenzylcyklenu **4** s *tert*-butylbromacetátem nebylo dostupné měření MS, a proto nebyla už v raném stádiu odhalena probíhající kvarternizace produktu **18**. NMR spektra se v tomto ohledu jevila neprůkazná. Nicméně se surovou směsí látky **18** byla provedena hydrogenace, která proběhla zcela během 24 hodin, za vzniku látky **19** a následně i Mannichova reakce s triethylfosfitem a paraformaldehydem (není uvedena v experimentální části, z časových důvodů nebyla zpracována, pouze analyzována MS). O probíhající kvarternizaci svědčí změřená MS spektra. V MS spektru látek **18** i **19** byl nalezen majoritní signál s $M+tert\text{-butoxykarbonylmethylem}$. Dále podle MS spektra reakční směsi Mannichovy reakce, kde byl nalezen pouze signál monofosfonátového produktu, se dá soudit, že reakce na obou reakčních centrech (sekundární dusíkové atomy cyklenu po debenzylaci) neprobíhá buď ze sterických důvodů, nebo protože

kvarternizovaná látka **19** přesmykla po odchránění na 1,4,7-tris(*tert*-butoxykarbonylmethyl)cyklen.

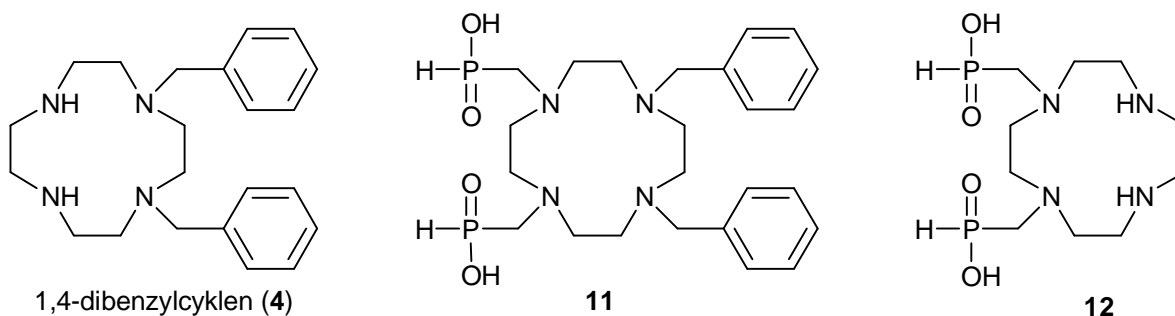


Obrázek 12

Sloučeniny zmíněné v kapitole 4.3.2 Karboxylové deriváty

4.3.3 Fosfinátové deriváty

Další funkční skupinou, která byla navázána na 1,4-dibenzylcyklen (**4**), byla fosfinová. Zavedena byla Mannichovou reakcí kyseliny fosforené, paraformaldehydu a 1,4-dibenzylcyklu (**4**) za přítomnosti 19% HCl. Po přečištění na silném kationtovém iontoměničce byla izolována látka **11** jako bílý mikrokryalický prášek ve velmi dobrém výtěžku 84 %. Následná debenzylace sice podle ^1H NMR spektra, kde nebyly nalezeny žádné signály v aromatické oblasti, proběhla, ovšem produkt **11** nebyl ve směsi detekován, což potvrdilo i MS.



Obrázek 13

Sloučeniny zmíněné v kapitole 4.3.3 Fosfinátové deriváty

5. Závěr

Prvním cílem práce byla optimalizace syntézy *cis*-1,4-dibenzylcyklenu, který je výchozí látkou pro syntézu 1,4-disubstituovaných derivátů. Optimalizace byla provedena v gramovém množství s vysokými výtěžky.

V gramovém množství byly připraveny i bisfosfonátové deriváty 1,4-dibenzylcyklenu (1,4-dibenzyl-7,10-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen, 1,4-dibenzyl-7,10-bis(monoethylfosfonomethyl)cyklen a 1,4-dibenzyl-7,10-bis(fosfonomethyl)cyklen). Dále byl připraven 1,4-dibenzyl-7,10-bis(fosfinomethyl)cyklen, bohužel jeho debenzylace se nezdařila.

Debenzylací byly získány 1,4-disubstituované fosfonátové deriváty (1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen, 1,4-bis(monoethylfosfonomethyl)cyklen a 1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen). 1,4-bis(monoethylfosfonomethyl)cyklen a 1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen budou studovány jako potenciální nosiče radioizotopů Cu^{II} pro aplikace v medicíně. Metodou potenciometrických titrací bude stanovena termodynamická stabilita a dále bude studována jejich kinetická stabilita.

Hlavním cílem práce byla příprava sloučeniny s dvěma fosfonátovými a dvěma karboxylovými funkcemi na kruhu cyklenu (1,4-bis(fosfonomethyl)-7,10-bis(karboxymethyl)cyklenu), která je potenciálním chelatantem pro aplikaci v MRI. Tento cíl práce se podařil splnit pouze z části. Byla připravena požadovaná látka v esterové formě. Vzhledem k neočekávaným problémům s deesterifikací se však tuto látku dosud nepodařilo připravit ve formě volné kyseliny.

Otázka, zda komplex 1,4-bis(fosfonomethyl)-7,10-bis(karboxymethyl)cyklenu (*cis*-DO2A2P) s Gd^{III} je schopen koordinovat molekulu vody, zůstává nezodpovězena. Nicméně, pokud se podaří optimalizovat podmínky hydrolýzy 1,4-bis(diethylfosfonomethyl)-7,10-bis(etoxykarbonylmethyl)cyklenu, např. jak bylo navrženo v diskuzi, měla by být cílová látka připravena a měly by být studovány její koordinační vlastnosti.

6. Seznam zkratek

2D	dvou dimenzionální
3D	tří dimenzionální
AAZTA	6-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepintetraoctová kyselina
Ac	acetyl
AcOH	kyselina octová
Bn	benzyl
BP	bakalářská práce
cyklen	1,4,7,10-tetraazacyklododekan
δ	chemický posun
DIPEA	ethyl-diisopropylamin
DMF	dimethylformamid
DO3A	1,4,7-tris(karboxymethyl)cyklen
DO3AP	4,7,10-tris(karboxymethyl)-1-fosfonomethylcyklen
DOTA	1,4,7,10-tetrakis(karboxymethyl)cyklen
DOTP	1,4,7,10-tetrakis(fosfonomethyl)cyklen
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
DOTP ^R	1,4,7,10-tetrakis(R-fosfinomethyl)cyklen
Et	ethyl
EtOH	ethanol
ekv.	ekvivalent
h	hodina
HOPO	tris[(3-hydroxy-1-methyl-2-oxo-1,2-didehydropyridin-4-karboxyamido)ethyl]amin
iPA	isopropylamin
IPAV	směs isopropylalkoholu, amoniaku a vody
M	molekulová hmotnost
Me	methyl
MeOH	methanol
MRI	„Magnetic Resonance Imaging“
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
NMR	nukleární magnetická rezonance
Ph	fenyl

R_f	retenční faktor
RT	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
SBM	Solomon, Bloembergen, Morgan
t Bu	<i>tert</i> -butyl
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)
TMSBr	trimethylsilylbromid
Z-chlorid	benzyloxykarbonylchlorid

7. Seznam použité literatury

- [1] F. Bloch, *Phys. Rev.*, **1946**, 70, 460
- [2] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.*, **1946**, 69, 37
- [3] J. P. Hornak, <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/>, **2010**
- [4] V. Kuperman, *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Applications*, Academic Press, San Diego, CA., **2000**
- [5] Oficiální stránky: Bruker Biospin: <http://www.bruker-biospin.com>, **2010**;
Siemens: <http://www.medical.siemens.com>, **2010**;
Varian: <http://www.varianinc.com>, **2010**;
GE Health Care: <http://www.gehealthcare.com>, **2010**;
Philips Medical: <http://www.medical.philips.com/main>, **2010**
- [6] S. Mori, P. B. Barker, *The Anatomical Record (New Anat.)*, **1999**, 257, 102
- [7] C. Wu, M. W. Brechbiel, R. W. Kozak, O. Gansow, *Bioor. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 449
- [8] <http://www.fmri.org/fmri.htm>, **2008**
- [9] P. C. Lauterbur, M. H. M. Dias, A. Rudin, *Front. Biol. Energ.*, **1978**, 1, 752
- [10] W. P. Cacheris, S. C. Quay, S. M. Rocklage, *Magn. Reson. Imag.*, **1990**, 8, 467
- [11] Y-W. Jun, J-H. Lee, J. Cheon, *Nanobiotechnology II*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, 321
- [12] Převzato z J. Kotek, I. Lukeš, *Chemické listy*, **2010**, v tisku
- [13] A. E. Merbach, É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Chichester (Anglie), **2001**
- [14] E. Terreno, M. Botta, F. Fedeli, B. Mondino, L. Milone, S. Aime, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 4891
- [15] E. Terreno., M. Botta, B. Boniforte, C. Bracco, L. Milone, B. Mondino, F. Uggeri, S. Aime, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 5531
- [16] S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, P. Losi, A. Maiocchi, G. Palmisano, M. Sisti, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 7588
- [17] K. N. Raymond, V. C. Pierre, *Bioconjugate Chem.*, **2005** 16, 3
- [18] M. Seitz, M. D. Pluth, K. N. Raymond. *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 351
- [19] A. Borel, S. Laus, A. Ozarowski, C. Gateau, A. Nonat, M. Mazzanti, L. Helm,

-
- J. Phys. Chem. A*, **2007**, *111*, 5398
- [20] P. Fousková-Lebdušková, *PhD. Thesis*, Univerzita Karlova, Praha, **2006**
- [21] G. M. Nicolle, É. Tóth, K. P. Eisenwiener, H. R. Mäcke, A. E. Merbach, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**, *7*, 757
- [22] P. Caravan, N. J. Cloutier, M. T. Greenfield, S. A. McDermid, S. U. Dunham, J. W. M. Bulte, J. C. Amedio jr., R. J. Looby, R. M. Supkowski, W. DeW Horrocks jr., T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 3152
- [23] F. Kielar, L. Tei, E. Terreno, M. Botta, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 836
- [24] D. M. Corsi, L. Vander Elst, R. N. Muller, H. van Bekkum, J. A. Peters, *Chem Eur. J.*, **2001**, *7*, 64
- [25] E. Tóth, D. Pubanz, S. Vauthey, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **1996**, *2*, 1607
- [26] P. Lebdušková, A. Sour, L. Helm, É. Tóth, J. Kotek, I. Lukeš, A. E. Merbach, *Dalton Trans.*, **2006**, 3399
- [27] S. Aime, M. Botta, M. Fasano, M. P. M. Marques, C. F. G. C. Geraldles, D. Pubanz, A. E. Merbach, *Inorg. Chem.*, **1997**, *3*, 2059
- [28] J. Rudovský, P. Cígler, J. Kotek, P. Hermann, P. Vojtíšek, I. Lukeš, J. A. Peters, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 2373
- [29] P. Vojtíšek, P. Cígler, J. Kotek, J. Rudovský, P. Hermann, I. Lukeš, *Inorg. Chem.*, **2005**, *44*, 5591
- [30] J. Kotek, J. Rudovský, P. Hermann, I. Lukeš, *Inorg. Chem.*, **2006**, *45*, 3097
- [31] F. A. Dunand, S. Aime, A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 1506
- [32] S. Aime, A. S. Batsanov, M. Botta, R. S. Dickins, S. Falkner, C. E. Foster, A. Harrison, J. A. K. Howard, J. M. Moloney, T. J. Norman, D. Parker, J. A. G. Williams, *Dalton Trans.*, **1997**, 3623
- [33] J. Rohovec, P. Vojtíšek, P. Hermann, J. Mosinger, Z. Žák, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, **1999**, 3585
- [34] J. Rudovský, *PhD. Thesis*, Univerzita Karlova, Praha, **2006**
- [35] P. Lebdušková, P. Hermann, L. Helm, *Dalton Trans.*, **2007**, *4*, 493
- [36] F. K. Kálmán, Z. Baranyai, I. Tóth, I. Bányai, R. Király, E. Brücher, S. Aime, X. Sun, A. D. Sherry, Z. Kovács, *Inorganic chemistry*, **2008**, *47*, 3851
- [37] R. Delgado, V. Félix, L. P. Lima, D. W. Price, *Dalton Trans.*, **2007**, 2734
- [38] Z. Kovacs, A. D. Sherry, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 185

-
- [39] A. Dadabhoy, S. Faulkner, P. G. Sammes, *Perkin Trans. 2*, **2002**, 348
- [40] F. Bellouard, F. Chuburu, N. Kervarec, L. Toupet, S. Triki, Y. Le Mest, H. Handel, *Perkin Trans. 1*, **1999**, 3499
- [41] C. Li, W. Wong, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 5595
- [42] C. Li, W. Wong, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 2956
- [43] J. Bárta, *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova, Praha, **2008**