

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Chemie  
Chemie v přírodních vědách



**Pavλίna Křečková**

Bis(fosfináty)  
Bis(phosphinates)

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Vojtěch Kubiček, Ph.D.

Praha, 2011.

## **Prohlášení**

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

V Praze dne 1. června 2011

.....

Pavčina Křečková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému příteli Davidovi, svým rodičům a rodině za jejich lásku, porozumění a podporu ve chvílích zoufalství a beznaděje. Svému školiteli Vojtovi bych chtěla poděkovat za čas, který věnoval přečtení všech mých pokusů při sepsání této práce a za rady, které mi v průběhu studia dal. Obrovský dík patří Sandrovi, který mi udělil mnoho laboratorně cenných rad a připomínek, jak tuto práci zdokonalit. Nakonec bych chtěla poděkovat Mgr. Jiřímu Schulzovi za ochotu oponovat tuto práci.

Název: Bis(fosfináty)

Řešitel: Pavlína Křečková

Ústav: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta

Školitel: RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

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

## **Abstrakt**

Byly připraveny čtyři geminální bis(fosfinové) kyseliny, které byly plně charakterizovány pomocí TLC, NMR, MS a EA. Připravené bis(fosfinové) kyseliny byly získány ve vysokých výtěžcích (cca 55 %). Stálost těchto sloučenin byla testována ve zvolených vodných rozpouštědlech pokrývajících celou škálu pH. Z provedených experimentů je patrné, že připravené sloučeniny nejsou neomezeně stálé. Sorpční experimenty ukázaly, že se bis(fosfinové) kyseliny zanedbatelně sorbují na hydroxyapatit, který je používán jako model kostní tkáně.

Klíčová slova: geminální, bis(fosfinát), sorpce, rozklad.

Title: Bis(phosphinates)

Autor: Pavlína Křečková

Department: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science

Supervisor: RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

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

## **Abstract**

Four geminal bis(phosphinate) acids were prepared and characterized by TLC, NMR, MS, EA. The compounds were acquired in high yields (over 55 %). Stability of these compounds was tested in chosen aqueous buffers, which covered a wide range of pH. The experiments showed that the prepared compounds are not fully stable. Performed experiments have shown negligible sorption of synthesized bis(phosphic) acids to hydroxyapatite, which was used as a model of bone tissue.

Keywords: geminal, bis(phosphinate), decomposition, sorption.

## Obsah

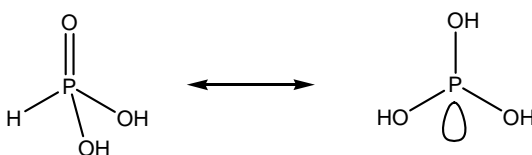
1.	Úvod.....	1
1.1	Geminální bis(fosfonáty) .....	2
1.2	Acidobazické vlastnosti bis(fosfonátů).....	3
1.3	Koordinační vlastnosti bis(fosfonátů) v roztoku.....	4
1.4	Biologické vlastnosti bis(fosfonátů) .....	4
1.5	Použití bis(fosfonátů) v lékařství .....	7
1.6	Dosavadní výzkum prováděný na bis(fosfonátech) a bis(fosfinátech) .....	8
1.7	Cíl práce .....	10
2.	Experimentální část.....	11
2.1	Použité chemikálie .....	11
2.2	Metody charakterizace .....	11
2.3	Syntéza.....	13
2.3.1	PhOHBPIn.....	13
2.3.2	BnOHBPIn .....	15
2.3.3	MeOHBPIn .....	17
2.3.4	MeOHBPhPin .....	19
2.4	Studie rozkladu připravených sloučenin.....	21
2.4.1	Příprava vzorků.....	21
2.5	Sorpce na hydroxyapatit .....	22
3.	Výsledky a diskuze .....	23
3.1	Syntéza a vlastnosti připravených sloučenin .....	23
3.1.1	Charakterizace.....	24
3.2	Stabilita ve vodném prostředí .....	25
3.3	Sorpce .....	30
4.	Závěr .....	32

## Seznam zkratek

AcCl	acetylchlorid
ADP	adenosin di(fosfát)
ATP	adenosin tri(fosfát)
BnCOCl	fenylacetylchlorid
BTSP	bis(trimethylsilyloxy)fosfin
BzCl	benzylchlorid
EA	elementární analýza
ETA	ethanolamin
EtOH	ethanol
H <sub>4</sub> hedp	kyselina 1-hydroxyethan-1,1-diyl-bis(fosfonová)
H <sub>4</sub> mdp	kyselina methylen-bis(fosfonová)
H <sub>4</sub> meth	kyselina aminomethylen-bis(fosfonová)
H <sub>4</sub> pam	kyselina 3-amino-1-hydroxypropan-1,1-diyl-bis(fosfonová)
H <sub>4</sub> ale	kyselina 4-amino-1-hydroxybutan-1,1-diyl-bis(fosfonová)
HMDS	hexamethyldisilazan
MCA	kyselina chloroctová
Me	methyl
MRI	tomografie magnetické rezonance
MS	hmotnostní spektroskopie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PET	pozitronová emisní tomografie
PhPO <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	kyselina fenylfosfinová
RT	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
SPECT	jednofotonová emisní tomografie
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-Vis	ultrafialová a viditelná oblast světla

# 1. ÚVOD

Největší skupinou organických sloučenin fosforu jsou deriváty kyselin. Kyseliny obsahující atom fosforu vykazují značné rozdíly oproti kyselinám s jinými prvky.<sup>1</sup> Atom fosforu se v kyselinách a jejich derivátech obvykle vyskytuje v tetraedrickém uspořádání. Tetraedrické okolí fosforu je preferováno i v případě nízkého oxidačního čísla (+III), kdy dochází k izomerii mezi tetragonálním a trigonálním okolím centrálního atomu fosforu (Obr. 1.1.).

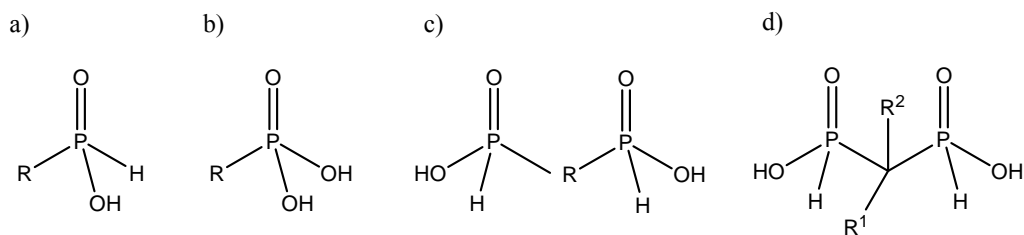


Obr. 1.1 Izomerie kyseliny fosforité.

Dalším rozdílem je, že atom fosforu upřednostňuje tvorbu vazby P=O díky její vysoké stabilitě. Energie nutná na rozštěpení této vazby se pohybuje v rozmezí 538–584 kJ/mol.

Organofosforové kyseliny se dají rozdělit do dvou skupin a to na kyseliny fosfonové (obecného vzorce  $RPO_3H_2$ ) a kyseliny fosfinové (obecného vzorce  $HP(R)O_2(OH)$ ). Kyselina fosfonová je odvozena od kyseliny fosforité, kde je atom vodíku vázaný na atom fosforu formálně nahrazen alkylem nebo arylem. Druhou skupinou organofosforových kyselin jsou kyseliny fosfinové, které jsou odvozeny od kyseliny fosforné. Vznikají formálním nahrazením jednoho nebo dvou atomů vodíku přímo vázaných na atom fosforu alkylem nebo arylem. Obsahuje-li molekula dvě fosfinové skupiny, jedná se o kyselinu bis(fosfinovou). Jsou-li obě fosfinové skupiny navázány na stejný atom uhlíku ( $\alpha$  uhlík), jedná se o geminální kyseliny bis(fosfinové) (obecného vzorce  $R_2C(PO_2H_2)_2$ ). Obdobně lze definovat i kyseliny bis(fosfonové) a geminální kyseliny bis(fosfonové).<sup>1</sup> Struktury zmíněných organofosforových kyselin jsou na Obr. 1.2.





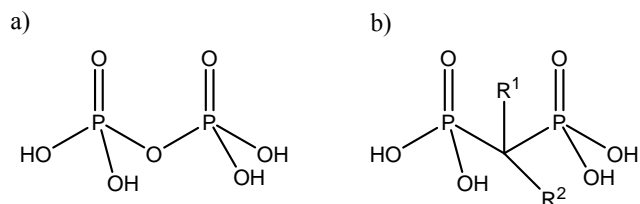
Obr. 1.2 Obecná kyselina fosfinová (a), kyselina fosfonová (b), kyselina bis(fosfinová) (c), geminální bis(fosfinová) kyselina (d);  $\text{R} \sim \text{R}^1 \sim \text{R}^2 =$  alkyl nebo aryl.

Derivátů fosfinových i fosfonových kyselin bylo připraveno velké množství. Některé z nich mají velmi zajímavé uplatnění v průmyslu, zemědělství, chemii, lékařství a v dalších oblastech lidské činnosti. Nejznámější z aplikací těchto látek jsou:

- insekticidy a herbicidy,
- látky používané v lékařství (protinádorové látky, antivirotika, antibakteriální přípravky, kontrastní látky a látky používané pro léčbu nemocí, při kterých dochází k úbytku nebo patologickým změnám kostních tkání),
- zhášecí látky pro plasty a textilní tkaniny,
- selektivní extrakce iontů kovů z rud, které jsou na dané ionty relativně chudé, například uran,
- zpracování vyhořelého jaderného paliva,
- inhibitory koroze.<sup>1,2,3</sup>

## 1.1 Geminální bis(fosfonáty)

Geminální bis(fosfonáty) jsou formálními analogy pyrofosfátu (Obr. 1.3), kde je můstkový atom kyslíku ( $\text{P}-\text{O}-\text{P}$ ) nahrazen atomem uhlíku ( $\text{P}-\text{C}-\text{P}$ ). Jedná se tedy o sloučeniny obsahující dvě fosfonové skupiny spojené methylenovým můstkem obecného vzorce  $\text{R}^1\text{R}^2\text{C}(\text{PO}_3\text{H}_2)_2$ , kde  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^2$  jsou libovolné substituenty.



Obr. 1.3 Struktura pyrofosfátu (a) a geminálního bis(fosfonátu) (b).  $\text{R}^1, \text{R}^2 =$  alkyl nebo aryl.

Názvosloví geminálních bis(fosfonátů) není zcela jednoznačné. Název bis(fosfonát) je používán pro sloučeniny, které jsou esterifikovány, ale i pro volné bis(fosfonové) kyseliny.

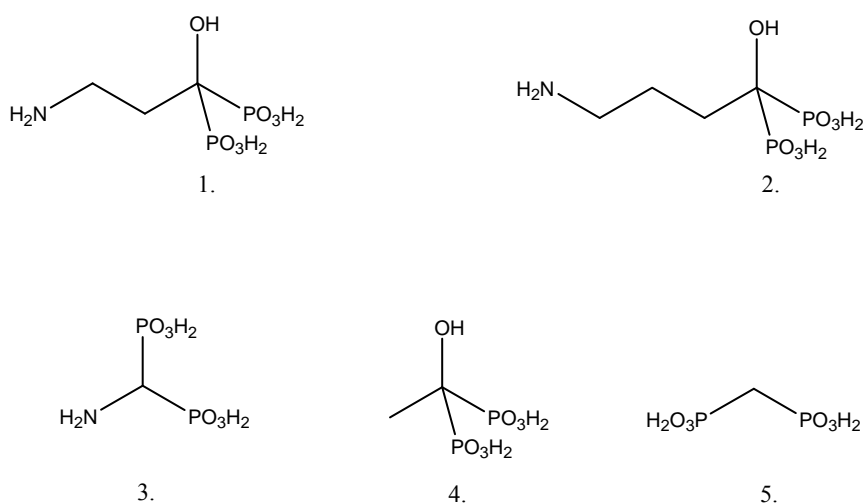
Tato práce je zaměřena pouze na geminální bis(fosfináty) a bis(fosfonáty), termín „geminální“ bude proto v následujícím textu pro jednoduchost vynechán.

## 1.2 Acidobazické vlastnosti bis(fosfonátů)

Fosfonová kyselina je slabá kyselina, která vykazuje dva disociační stupně charakterizované disociačními konstantami  $pK_1 \leq 2$  a  $pK_2 \approx 5-6$ . Bis(fosfonová) kyselina má dva disociační stupně v kyselé oblasti, jeden disociační stupeň v neutrální oblasti a jeden v bazické oblasti (Tab. 1.1).<sup>4</sup> Zvolíme-li vhodné substituenty na  $\alpha$  atomu uhlíku (Obr. 1.4), můžeme tím ovlivnit acidobazické vlastnosti dané sloučeniny. Navážeme-li do postranního řetězce například aminoskupinu, vznikne zde silně bazické protonizační místo, čímž se sníží hodnota ostatních disociačních konstant.

Tab. 1.1 Disociační konstanty vybraných bis(fosfonových) kyselin.

Bis(fosfonová) kyselina	H <sub>4</sub> mdp <sup>4</sup>	H <sub>4</sub> hedp <sup>4</sup>	H <sub>4</sub> meth <sup>5</sup>	H <sub>4</sub> pam <sup>5</sup>	H <sub>4</sub> ale <sup>5</sup>
pK <sub>1</sub>	1,6	1,7	–	–	–
pK <sub>2</sub>	2,77	2,6	1,4	2,55	2,72
pK <sub>3</sub>	6,83	6,88	5,18	5,83	8,73
pK <sub>4</sub>	10,2	10,90	8,85	9,9	10,5
pK <sub>5</sub>	–	–	11,03	10,8	11,6



Obr. 1.4 Vybrané bis(fosfonové) kyseliny, 1. = pamidronát (H<sub>4</sub>pam), 2. = aledronát (H<sub>4</sub>ale), 3. = H<sub>4</sub>meth, 4. = etidronát (H<sub>4</sub>hedp), 5. = H<sub>4</sub>mdp.

### 1.3 Koordinační vlastnosti bis(fosfonátů) v roztoku

Bis(fosfonáty) vytváří díky relativně krátké vzdálenosti fosfonových skupin termodynamicky stabilní komplexy s různými ionty kovů. Díky sterickému uspořádání fosfonových skupin vzniká přednostně bidentátní komplexační místo. Fosfonová skupina má navíc tendenci tvořit stabilní protonizované komplexy a to i při relativně vysoké hodnotě pH. Podíváme-li se na koordinaci kovu s bis(fosfonátem) obecně, zjistíme, že koordinace druhého ligandu při tvorbě bis-komplexů probíhá hůře, protože při ní dochází k velké elektrostatické interakci mezi záporně nabitými fosfonovými skupinami okolo centrálního atomu. Bis(fosfonáty) tvoří protonizované komplexy:  $[MH_2L]$ ,  $[MHL]^-$ ,  $[ML]^{2-}$  a dinukleární formy komplexů  $[M_2L]$ .<sup>8,13,14</sup> Bylo zjištěno, že se zvyšujícím se počtem uhlíků mezi dvěma fosfonovými kyselinami se výrazně snižuje schopnost dané látky koordinovat se. Bis(fosfonáty) díky relativně velkému obsahu kyslíkových atomů mohou vytvářet můstky a tvořit tak polymerní struktury, které způsobují obtížnou rozpustnost mnoha komplexů.

### 1.4 Biologické vlastnosti bis(fosfonátů)

Fyziologická funkce pyrofosfátu byla zkoumána již v polovině dvacátého století.<sup>6</sup> Pyrofosfát hraje důležitou roli při regulaci množství vápenatých iontů v těle. Zatímco pyrofosfát obsahuje vazbu P—O—P, která je snadno hydrolyzovatelná, bis(fosfonát) obsahuje vazbu P—C—P, která je hydrolyticky stálá. Výhodou bis(fosfonátů) oproti pyrofosfátu tedy je, že bis(fosfonát) je metabolicky stabilní. Bis(fosfonáty) se velmi pevně vážou na kostní tkáň. Adsorbuje-li se bis(fosfonát) na kostní tkáň, zamezuje rozpouštění kostní tkáně a ovlivňuje funkci všech kostních buněk, které ovlivňují degradaci nebo růst kostí. Velká afinita bis(fosfonátů) ke kalcifikovaným tkáním, jejichž základem je hydroxyapatit\*, je vysvětlována tvorbou „kostního háčku“, kdy bis(fosfonát) proniká do struktury hydroxyapatitu chemisorpcí na povrchu kostí.<sup>7,8,9</sup> Mechanismus působení se vysvětluje tím, že bis(fosfonáty) působí na osteoklasty (buňky zodpovědné za resorpci kostní tkáně) pomocí buněčných mechanismů na molekulové a tkáňové úrovni tak,<sup>10,11</sup> že inhibují jejich tvorbu, rozrušují jejich soudržnost s kostní matricí a zkracují střední dobu života osteoklastu.<sup>12,13</sup> Bis(fosfonáty) můžeme na základě molekulárního mechanismu působení rozdělit do dvou skupin:

---

\* Hydroxyapatit je směsný hydroxid–fosforečnan vápenatý o přibližném složení  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ .

- obsahují atom dusíku v postranním řetězci (amino(bisfosfonáty)),
- neobsahují atom dusíku v postranním řetězci.

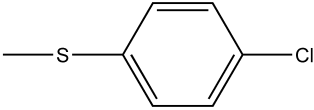
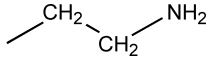
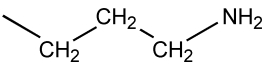
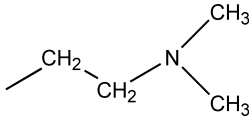
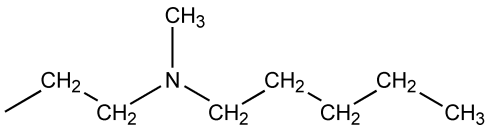
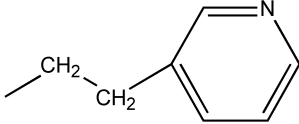
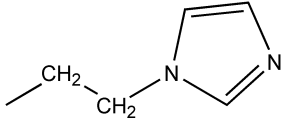
Oba typy bis(fosfonátů) způsobují apoptózu kostních buněk, každý však pomocí jiných mechanismů. Bis(fosfonáty) obsahující dusík inhibují intracelulární mevalonové cesty syntézy cholesterolu tím, že blokují enzym farnesyldifosfátsyntázu.<sup>14</sup> Bis(fosfonáty) neobsahující dusík způsobují apoptózu pomocí cytotoxických metabolitů analogických ATP, které obsahují nehydrolyzovatelnou P—C—P vazbu.<sup>15</sup>

Dále můžeme léčiva založená na bis(fosfonátech) rozdělit podle antiresorpční účinnosti do tří generací (Tab. 1.2):

- Bis(fosfonáty) první generace obsahují v postranním řetězci na  $\alpha$  uhlíku pouze jednotlivé atomy jako hydroxyl nebo jednoduché alkyly (Medronát, Etidronát, Clodronát, Tiludronát) a obecně vykazují poměrně nízké antiresorpční vlastnosti.
- Druhá generace obsahuje v postranních alkylových řetězcích primární aminoskupinu (Pamidronát, Aledronát) a je 10–100 krát účinnější než první generace bis(fosfonátů).
- Třetí generace, která má nejlepší resorpční vlastnosti, obsahuje v postranním řetězci terciální aminovou skupinu, ve které je na dusíkovém atomu alkylový substituent nebo dusíkový atom v heterocyklickém kruhu. Třetí generace bis(fosfonátů) jednak inhibuje mevalonovou cestu a zároveň blokuje mitochondriální ADP/ATP translokázu.

Tab. 1.2 Rozdělení bis(fosfonátů) do jednotlivých skupin.

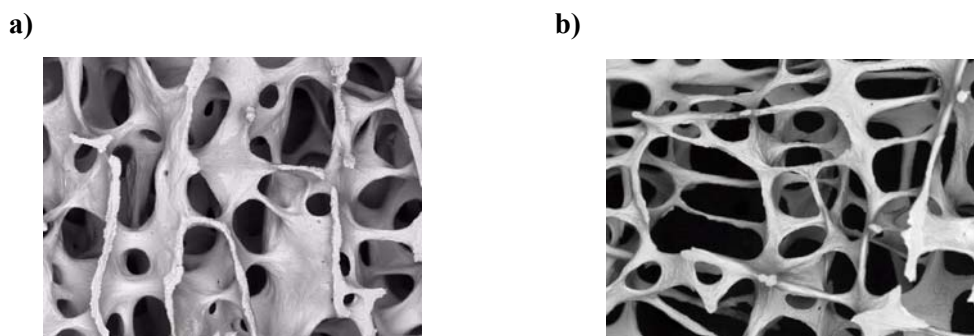
Komerční název	—R <sup>1</sup>	—R <sup>2</sup>	Generace
Medronate	—H	—H	1.
Clodronate	—Cl	—Cl	1.
Etidronate	—OH	—CH <sub>3</sub>	1.

Komerční název	—R <sup>1</sup>	—R <sup>2</sup>	Generace
Tiludronate	—H		1.
Pamidronate	—OH		2.
Aledronate	—OH		2.
Olpadronate	—OH		3.
Ibandronate	—OH		3.
Risedronate	—OH		3.
Zoledronate	—OH		3.

Účinnost bis(fosfonátů) při použití v lékařství je důležitým parametrem, protože vysoké dávky relativně neúčinného bis(fosfonátu) snižují resorpci kostní tkáně a výrazně tím narušují mineralizaci kostí. Vhodnou volbou substituentů R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup> je možné snížit afinitu bis(fosfonátů) ke kalcifikovaným tkáním.<sup>16</sup> Bis(fosfonáty) jsou dlouhodobě akumulovány v kostní tkáni, nezpůsobují však výraznější vedlejší účinky.

## 1.5 Použití bis(fosfonátů) v lékařství

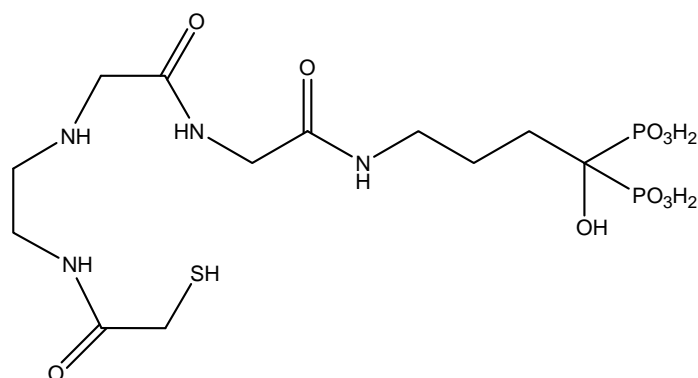
Bis(fosfonáty), které v postraním řetězci obsahují atom dusíku, jsou díky své účinnosti používány jako medikamenty pro léčbu osteoporózy, poruch metabolismu vápníku a Pagetovy nemoci.<sup>10,17,18</sup> Obecně se bis(fosfonáty) používají, dochází-li k úbytku kostní tkáně (Obr. 1.5).



Obr. 1.5 zdravá kost (a), kost poškozená osteoporózou (b).<sup>19</sup>

Kromě inhibice kostní resorpce mají bis(fosfonáty) i protinádorové vlastnosti, kterých je využíváno k léčbě kostních metastáz. Po aplikaci bis(fosfonátů) se ovlivní mikroprostředí kostní dřeně, čímž se zhorší podmínky pro růst nádorových buněk, protože se omezí vývoj a růst nových krevních cév, které jsou nezbytné pro zásobování nádorové buňky. Bis(fosfonáty) částečně tlumí bolest, inhibují chorobný růst kostní tkáně a mají přímý cytostatický a proapoptický efekt na nádorové buňky. V kombinaci s cytostatikou mají bis(fosfonáty) protinádorový efekt.<sup>20</sup>

Dalším použitím bis(fosfonátů) v lékařství jsou zobrazovací diagnostické metody kostních tkání za použití SPECT, kde se využívají bis(fosfonátové) komplexy s radionuklidy. Nejčastěji používaným radionuklidem je <sup>99m</sup>Tc. Dalším příkladem je <sup>186</sup>Re, který je komplexován MAG3-HBP (Obr. 1.6). Důvodem, proč bis(fosfonáty) v zobrazovacích metodách našly uplatnění, je, že se specificky vážou v místech, kde dochází k patologickým změnám kostní tkáně.<sup>17</sup> Výhodou takto zobrazovaných kostních nádorů je snadná syntetická dostupnost zobrazovacích látek. Toho, že se bis(fosfonáty) vážou na tkáně v místech, kde dochází ke zvýšené kalcifikaci, lze také využít pro diagnózu u onemocnění jako je rakovina prsu, cirhóza jater nebo mozková mrtvice, tj. v místech, kde dochází k abnormální kalcifikaci měkkých tkání.<sup>21</sup>



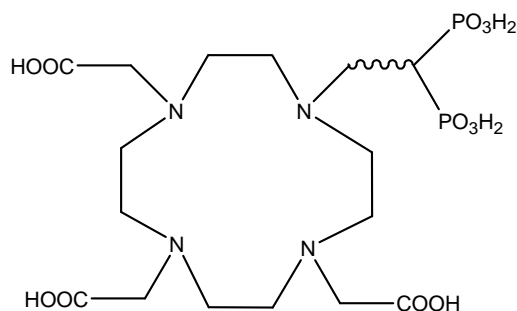
Obr. 1.6 MAG3-HBP, který je používán pro komplexaci <sup>186</sup>Re.

V současné době se bis(fosfonáty) intenzivně studují jako možné vhodné nosiče léčiv a dalších látek, které mají specificky působit v blízkosti kostní tkáně. Studovaly se lineární polymery, které jsou rozpustné ve vodě a obsahují bis(fosfonové) skupiny jako adresy do daného místa v organismu. V „obálce“ by léčivo drželo díky kovalentním interakcím mezi léčivem a nosičem.<sup>13</sup> Dalším příkladem může být lipozom, který by měl v dutině uschované léčivo<sup>22</sup> nebo bis(fosfonát), který by v postranním řetězci obsahoval derivatizovaný fulleren, který by sloužil jako „klec“ pro vhodný radionuklid.<sup>23</sup>

## 1.6 Dosavadní výzkum prováděný na bis(fosfonátech) a bis(fosfinátech)

V naší pracovní skupině byly ze široka studovány polydentáttní ligandy obsahující fosfonáty a fosfináty a jejich možné aplikace v zobrazovacích metodách. Bylo zjištěno, že přítomnost zbytku kyseliny fosforečné významně zvyšuje rychlost komplexace.<sup>24</sup>

V průběhu několika posledních let byly publikovány články o komplexaci ligandů bis(fosfonátů), které v postranním řetězci obsahovaly makrocyclickou sloučeninu typu DOTA (Obr. 1.7).<sup>25</sup> V organismu se tyto látky vlivem přítomnosti bis(fosfonové) funkční skupiny váží na kostní tkáň. Makrocyclický kruh umožňuje použití kationtu kovu, který je ve volné formě silně toxický a akumuloval by se v tkáních. Proto byly takovéto komplexy studovány jako kontrastní látky pro vizualizaci kostních tkání pomocí medicínských zobrazovacích metod (MRI, PET, SPECT).



Obr. 1.7 Bis(fosfonát), který v postranním řetězci obsahuje makrocyclickou sloučeninu typu DOTA.

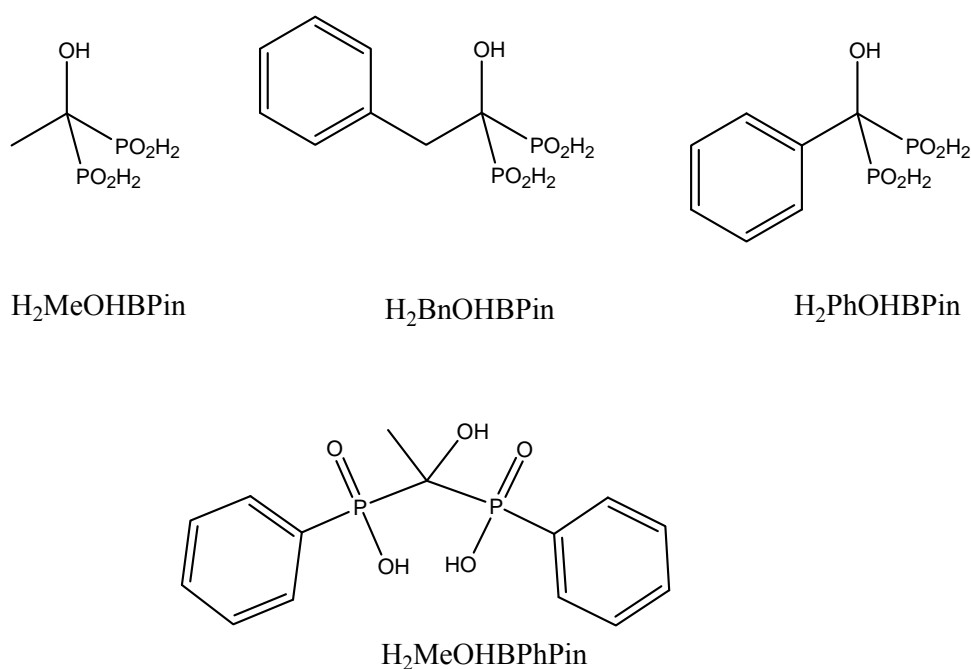
Ukázalo se, že přítomnost bis(fosfonátové) chelatovné skupiny v těsné blízkosti makrocyclické kavity zvyšuje rychlost komplexace a umožňuje tak provádět komplexace při vyšších hodnotách pH.

Limitací použití bis(fosfonátů) v zobrazovacích metodách je již zmíněná afinita ke kalcifikovaným tkáním, protože tato léčiva jsou použitelná výhradně v oblasti kostních tkání. Další nevýhodou je dlouhodobá akumulace léčiva v organismu. Řešením tohoto problému by mohlo být použití geminálních bis(fosfinátů), které mají podobné vlastnosti jako bis(fosfonáty), ale neváží se v místech kostních tkání a místech, kde dochází ke zvýšené kalcifikaci měkkých tkání.<sup>17</sup>



## 1.7 Cíl práce

Bis(fosfináty) představují v literatuře doposud relativně neprozkoumanou skupinu sloučenin. Známé jsou pouze některé možnosti přípravy.<sup>26, 27</sup> Bis(fosfináty) byly vybrány kvůli podobnosti k bis(fosfonátům). Cílem práce je připravit vybrané bis(fosfinové) deriváty (Obr. 1.8) a zjistit jejich základní chemické vlastnosti a stabilitu připravených sloučenin ve vodném prostředí. Dalším cílem práce je potvrdit předpokládanou nízkou afinitu zkoumaných látek k hydroxyapatitu, který slouží jako model kostní tkáně.



Obr. 1.8. Studované sloučeniny<sup>†</sup>.

---

<sup>†</sup> V této práci budou připravené sloučeniny označovány zkratkami nebo slovně – MeOHBPIn (methylový derivát), BnOHBPIn (benzylový derivát), PhOHBPIn (fenylový derivát) a MeOHBPhPin.

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie

Při syntéze zvolených sloučenin byly použity komerčně dostupné chemikálie od firem LACHEMA, SIGMA-ALDRICH a rozpouštědla od firmy PENTA-LACHEMA. Při přípravě byl použit fosforan amonný rekrystalizován z horké vody a sušený v evakuovaném exsikátoru nad  $P_2O_5$ . Bezvodý  $CH_2Cl_2$  byl získán destilací s  $P_2O_5$ .

### 2.2 Metody charakterizace

#### *NMR spektroskopie*

NMR spektra  $^{31}P$ ,  $^1H$  a  $^{13}C$  byla měřena na spektrometrech Varian UNITY INOVA 400 a Varian VNMRS 300 na PŘF UK. Vzorky byly měřeny v 5 mm skleněných kyvetách při teplotě 25 °C. Rezonanční frekvence jsou uvedeny v Tab. 2.1. Hodnoty chemických posunů jsou uváděny v ppm, pro  $^1H$  s přesností na dvě desetinná místa a u  $^{13}C$  a  $^{31}P$  s přesností na jedno desetinné místo. Hodnoty interakčních konstant jsou uvedeny s přesností na jedno desetinné místo u  $^1H$ ; u  $^{13}C$  a  $^{31}P$  jsou zaokrouhleny na celá čísla.

Tab. 2.1 Rezonanční frekvence měřených jader v NMR spektroskopii.

Jádro	VNMRS 300	UNITY INOVA 400
	rezonanční frekvence [MHz]	
$^1H$	299,94	399,94
$^{13}C$	75,4	100,6
$^{31}P$	121,4	161,9

#### *Hmotnostní spektrometrie*

K měření byl použit spektrometr Bruker ESQUIRE 3000. Vzorky byly ionizovány pomocí ESI (Elektrospray Ionization). Vzniklé ionty byly analyzovány pomocí IT (Ion Trap). Měřeními byla získána spektra záporných iontů. V charakterizaci jsou uvedeny intenzivní signály, které se podařilo interpretovat.

### *Tenkvrstvá chromatografie (TLC)*

Chromatografie na tenké vrstvě byla provedena na hliníkových destičkách s vrstvou silikagelu impregnovaného fluorescenčním barvivem (Merck 1,0554 F<sub>254</sub>). Jako mobilní fáze byla použita čerstvě připravená směs MeCN–MeOH–NH<sub>4</sub>OH v poměru 3:1:2. Detekční metodou bylo ponoření chromatogramu do směsi „fosfomolybdenové soluce“ (Tab. 2.2.). Chromatogram byl vyvolán zahřátím proudem horkého vzduchu z horkovzdušné pistole.

Tab. 2.2. Složení „fosfomolybdenové soluce“.

Sloučenina	Množství
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	12 g (9,7 mmol)
Ce(SO) <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,5 g (1,6 mmol)
10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250 ml

### *Spektroskopie UV-Vis*

UV-Vis spektra byla měřena přístrojem Unicam UV300 s deuteriovou a wolframovou lampou jako zdrojem záření. Vzorčky byly měřeny v 10 mm kyvetách z křemenného skla. Jako reference byla použita destilovaná voda. Získaná data byla zpracována v programu Vision32.

### *Elementární analýza*

Obsah vodíku a uhlíku byl stanoven elementární analýzou servisním pracovištěm Ústavu makromolekulární chemie AV ČR. Výsledky analýzy jsou v charakterizaci jednotlivých sloučenin uváděny ve tvaru „teoreticky vypočtená hodnota EA (analýzou stanovená hodnota EA)“, hodnoty jsou uvedeny v hmotnostních procentech.

### *Charakterizace sorpčních vlastností*

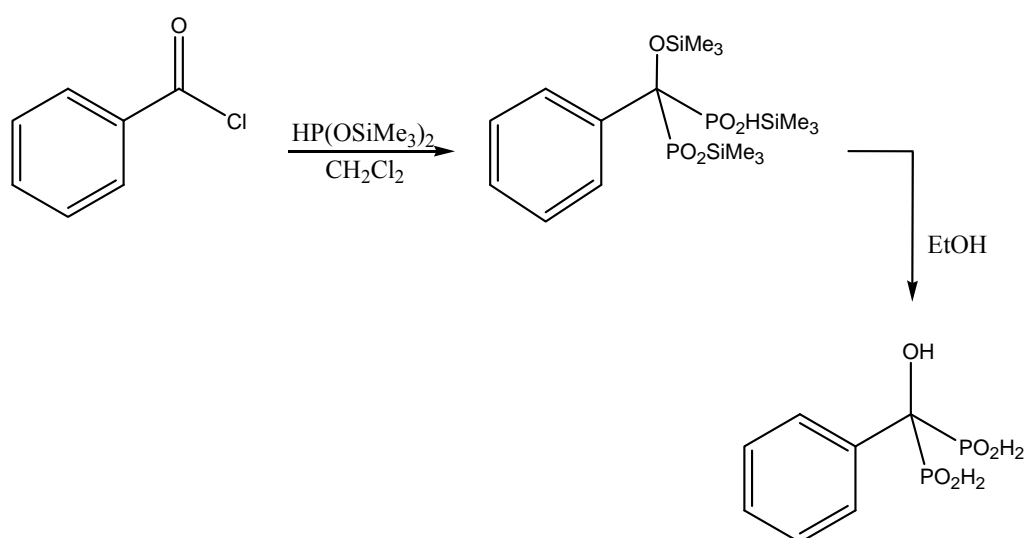
Výsledky sorpčních experimentů byly porovnány s teoreticky vypočtenými hodnotami, které by byly získány při stejném sorpčním experimentu provedém na bis(fosfonátech). Pro popis adsorpce bis(fosfonátu) na povrch hydroxyapatitu byla použita Langmuirova-Freundlichova adsorpční izoterma:

$$K^n = \frac{X}{c^n \cdot (X_m - X)}, \quad (2.1)$$

kde  $K$  je afinitní konstanta [ $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ],  $X$  je množství nasorbovaného bis(fosfonátu) [ $\text{mol} \cdot \text{g}$ ],  $X_m$  je maximální adsorpční kapacita [ $\text{mol} \cdot \text{g}$ ],  $c$  je zbytková koncentrace bis(fosfonátu) v roztoku [ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ],  $n$  je koeficient popisující distribuce sorpční energie ( $n = 1$  odpovídá Langmuirově izotermě,  $0 < n < 1$  odpovídá Langmuir-Freundlichově izotermě). Oba modely popisují stav, kdy je na povrchu rovnoměrná distribuce volných míst dostupných pro adsorpci. Langmuirův model předpokládá, že po adsorbování bis(fosfonátu) na hydroxyapatit nedochází k interakci mezi jednotlivými adsorbovanými molekulami. Langmuir-Freundlichův model předpokládá, že na povrchu hydroxyapatitu dochází k elektrostatické interakci mezi fosfonovými skupinami a není zde preferováno přistoupení další bis(fosfonátové) skupiny k již adsorbovanému bis(fosfonátu). Při simulaci dat byla použita Langmuirova izoterma, která poskytuje dostatečnou aproximaci.

## 2.3 Syntéza

### 2.3.1 PhOHBPIn



Obr. 2.1 Syntéza PhOHBPIn.

Do 1000 ml tříhrdlé baňky (opatřené magnetickým míchadlem, zaváděcí trubičkou s kohoutem napojeným na přívod argonu a chladičem, na který byla nasazena další zaváděcí trubička s kohoutem napojeným na membránovou vývěvu) byl vložen  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$  (20,0 g; 240 mmol) a poslední hrdlo bylo uzavřeno zátkou. Aparatura byla třikrát sekurována argonem. Poté byla zaváděcí trubička na chladiči vyměněna za bub-

lačku a zátka za septum, obojí v silném protiproudu argonu. Přes septum byl pomocí injekční stříkačky přidán HMDS (100 ml; 480 mmol), proud argonu byl upraven tak, aby skrze bublačku procházely 2–3 bubliny za 5 sekund. Reakční směs byla poté zahřívána 12 hodin v olejové lázni při teplotě 100–110 °C za intenzivního vývoje NH<sub>3</sub>. Po ukončení reakce byl zesílen proud argonu a aparatura byla ochlazena na RT. K roztoku byl přes septum přidán bezvodý CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml). Obsah baňky byl vychlazen na –40 °C (suchý led s EtOH) a za stálého chlazení byl přes septum přidán roztok BzCl (4,0 g; 28,5 mmol) v bezvodém CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml). Po přidání tohoto roztoku byla aparatura ponechána volně ohřát na RT. Reakční směs byla míchána dalších 12 hodin pod argonovou atmosférou. Reakční směs zežloutla a vyloučila se sraženina NH<sub>4</sub>Cl. Poté byl proud argonu značně zesílen a reakční směs byla pomocí kanyly převedena do baňky s EtOH (400 ml), přičemž se vyloučil produkt ve formě bílé sraženiny. Sraženina byla odfiltrována na fritě S3 a promyta EtOH. Surový produkt byl rozpuštěn v malém množství vody a přečištěn sloupcovou chromatografií (DOWEX 50, H<sup>+</sup> cyklus, H<sub>2</sub>O–EtOH 1:1). Frakce obsahující produkt byly odpařeny do sucha a poté dvakrát odpařeny s EtOH. Viskozní odparek byl za mírného zahřátí rozpuštěn v THF (50 ml). Vzniklý roztok byl za intenzivního míchání nakapán do CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 ml). Po přidání hexanu (150 ml) se vytvořila opalescence a vzniklá směs byla ponechána krystalizovat. Vzniklá sraženina byla po 24 hodinách odfiltrována na fritě S3, promyta CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a dosušena ve vakuovaném exsikátoru nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Produkt H<sub>2</sub>PhOHBPIn·H<sub>2</sub>O byl získán jako bílý prášek (4,0 g; 57 %, vztaženo na BzCl).

#### *Charakterizace PhOHBPIn:*

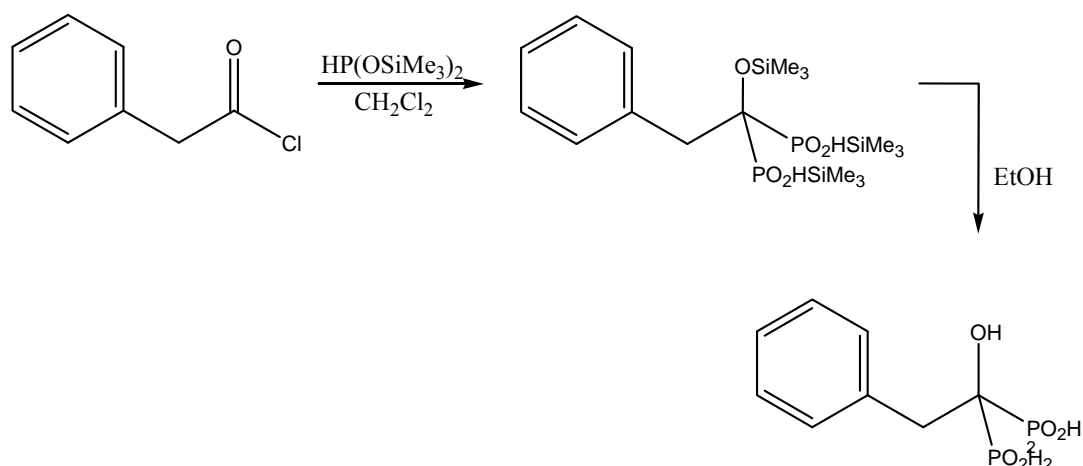
NMR (D<sub>2</sub>O): <sup>1</sup>H δ 7,12 (P–H, 2H, d, <sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 574,0 Hz); 7,43–7,61 (arom., 5H); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} δ 76,8 (C–O, t, <sup>1</sup>J<sub>PC</sub> = 97 Hz); 126,0–133,8 (arom.); <sup>31</sup>P δ 32,0 (dd, <sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 574 Hz, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 31 Hz).

MS: (–) 530,7 (2M+Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>–3H<sup>+</sup>)<sup>–</sup>; 546,6 (2M+2K<sup>+</sup>–3H<sup>+</sup>)<sup>–</sup>.

TLC (MeCN–MeOH–NH<sub>4</sub>OH 3:1:2): R<sub>f</sub> = 0,4.

EA (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>P<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O; M<sub>R</sub> = 254,1): C 33,1 (33,0); H 4,7 (4,5).

### 2.3.2 BnOHBPin



Obr. 2.2 Syntéza BnOHBPin.

Do 1000 ml tříhrdlé baňky (opatřené magnetickým míchadlem, zaváděcí trubičkou s kohoutem napojeným na přívod argonu a chladičem, na který byla nasazena další zaváděcí trubička s kohoutem napojeným na membránovou vývěvu) byl vložen  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$  (21,6 g; 260 mmol) a poslední hrdlo bylo uzavřeno zátkou. Aparatura byla třikrát sekurována argonem. Poté zaváděcí trubička na chladiči byla vyměněna za bublačku a zátky za septum, obojí v silném protiproudu argonu. Přes septum byl pomocí injekční stříkačky přidán HMDS (100 ml; 480 mmol) a proud argonu byl upraven tak, aby skrze bublačku procházely 2–3 bubliny za 5 sekund. Reakční směs byla zahřívána 12 hodin v olejové lázni při teplotě 100–110 °C za intenzivního vývoje  $\text{NH}_3$ . Po ukončení reakce byl zesílen proud argonu a aparatura byla ochlazena na RT. K roztoku byl přes septum přidán bezvodý  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml) a roztok  $\text{BnCOCl}$  (4,45g; 28,5 mmol) v bezvodém  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml). Vzniklá bílá suspenze byla míchána 12 hodin při RT pod mírným proudem argonu. Poté byl proud argonu značně zesílen a reakční směs byla převedena do baňky s  $\text{EtOH}$  (400 ml), kde se po krátkém stání (20 minut) vytvořila opalescence a následně začal produkt krystalizovat. Sraženina byla po 24 hodinách odfiltrována na fritě S3, promyta  $\text{EtOH}$  a prosávána vzduchem. Surový produkt byl rozpuštěn v malém množství vody a přečištěn sloupcovou chromatografií (DOWEX 50,  $\text{H}^+$  cyklus,  $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{EtOH}$  1:1). Frakce obsahující produkt byly odpařeny do sucha a poté dvakrát odpařeny s  $\text{EtOH}$ . Viskozní odparek byl za mírného zahřátí rozpuštěn v THF (50 ml). Vzniklý roztok byl za intenzivního míchání nakapán do  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (250 ml), vytvořila se opalescence a vzniklá směs byla ponechána krystalizovat. Vzniklá sraženina byla po 24 hodinách odfiltrována na fritě S3, promyta  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

a dosušena ve vakuovaném exsikátoru nad  $P_2O_5$ . Produkt  $H_2BnOHBPIn \cdot 1/4H_2O$  byl získán jako bílý prášek (4,18 g; 57 %, vztaženo na  $BnCOCl$ ).

*Charakterizace BnOHBPIn:*

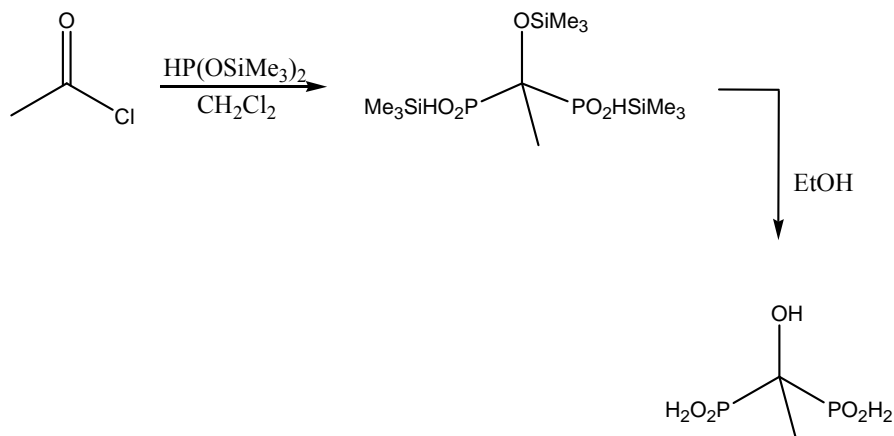
NMR ( $D_2O$ ):  $^1H$   $\delta$  3,27 ( $CH_2$ , t,  $^3J_{HP} = 13,2$  Hz); 6,87 (P—H, d, 2H,  $^1J_{PH} = 542,4$  Hz); 7,30–7,51 (arom., 5H);  $^{13}C$  { $^1H$ }  $\delta$  73,5 (C—O, t,  $^3J_{PC} = 99$  Hz); 35,83 ( $CH_2$ , s); 126,0 (arom., t,  $^3J_{CP} = 4$  Hz); 129,0 – 134,0 (arom.);  $^{31}P$   $\delta$  29,5 (ddt,  $^1J_{PH} = 566$  Hz,  $^3J_{PH} = 88$  Hz,  $^3J_{PH} = 31$  Hz.).

MS: (–) 248,5 ( $M-H^+$ )<sup>–</sup>; 522,7 ( $2M+K^+-2H^+$ )<sup>–</sup>; 558,7 ( $2M+K^++Na^+-3H^+$ )<sup>–</sup>.

TLC (MeCN–MeOH– $NH_4OH$  3:1:2):  $R_f = 0,4$ .

EA ( $C_8H_{12}O_5P_2 \cdot 1/4H_2O$ ;  $M_R = 254,5$ ): C 37,7 (37,9); H 4,95 (4,4).

### 2.3.3 MeOHBPIn



Obr. 2.3 Syntéza MeOHBPIn.

Do 1000 ml tříhrdlé baňky (opatřené magnetickým míchadlem, zaváděcí trubičkou s kohoutem napojeným na přívod argonu a chladičem, na který byla nasazena další zaváděcí trubička s kohoutem napojeným na membránovou vývěvu) byl vložen  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$  (21,6 g; 260 mmol) a poslední hrdlo bylo uzavřeno zátkou. Aparatura byla třikrát sekurována argonem. Poté byla zaváděcí trubička na chladiči vyměněna za bublačku a zátky za septum, obojí v silném protiproudu argonu. Přes septum byl pomocí injekční stříkačky přidán HMDS (100 ml; 480 mmol) a proud argonu byl upraven tak, aby skrze bublačku procházely 2–3 bubliny za 5 sekund. Reakční směs byla poté zahřívána 12 hodin v olejové lázni při teplotě 100–110 °C za intenzivního vývoje  $\text{NH}_3$ . Po ukončení reakce byl zesílen proud argonu a aparatura byla ochlazená na RT. K roztoku byl přes septum přidán roztok  $\text{AcCl}$  (4,0 g; 50 mmol) v bezvodém  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml), reakční směs vytvořila bílou suspenzi. Reakční směs byla míchána dalších 12 hodin pod mírným proudem argonu. Poté byl proud argonu značně zesílen a reakční směs byla pomocí kanyly převedena do baňky s  $\text{EtOH}$  (400 ml). Surový produkt byl odpařen do sucha, odparek byl rozpuštěn v malém množství vody a přečištěn sloupcovou chromatografií (DOWEX 50,  $\text{H}^+$  cyklus,  $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{EtOH}$  1:1). Frakce obsahující viskózní produkt byla odpařena s toluenem do sucha. Viskózní odparek byl rozpuštěn v THF (20 ml). Vzniklý roztok byl za intenzivního míchání nakapán do  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml) kde byl vysrážen jako viskózní olej. Po usazení surového produktu byl odlit supernatant, postup srážení byl třikrát zopakován. Poté byl surový produkt



rozpuštěn v 28% NH<sub>4</sub>OH (20 ml) a odpařen do sucha. Produkt (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MeOHBPIn·H<sub>2</sub>O byl získán jako viskozní olej (6,4 g; 55 %, vztaženo na AcCl).

*Charakterizace MeOHBPIn:*

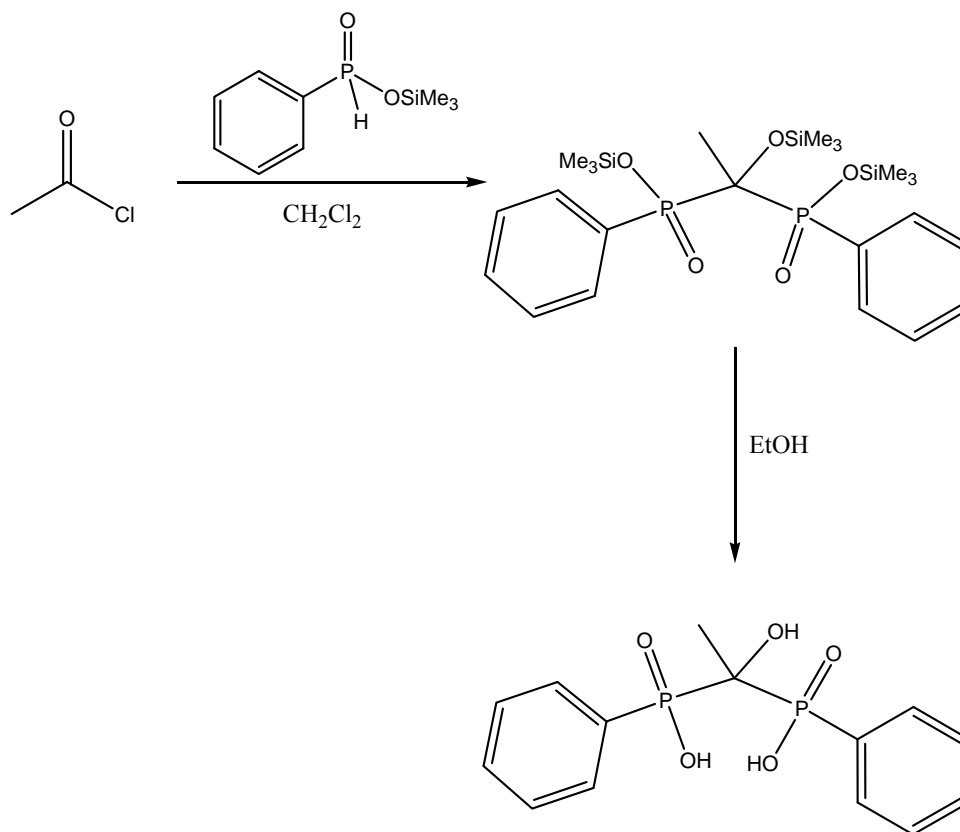
NMR (D<sub>2</sub>O): <sup>1</sup>H δ 1,34 (CH<sub>3</sub>, t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HP</sub> = 8,2 Hz); 6,87 (P—H, d, 2H, <sup>1</sup>J<sub>HP</sub> = 525,1 Hz); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} δ 16,8 (CH<sub>3</sub>, s); 73,7 (C—O, t, <sup>1</sup>J<sub>PC</sub> = 89 Hz); <sup>31</sup>P δ 25,8 (dm, <sup>1</sup>J<sub>HP</sub> = 695 Hz).

MS: (-) 172,5 (M—H<sup>+</sup>)<sup>-</sup>; 384, 4 (2M+K<sup>+</sup>-2H<sup>+</sup>)<sup>-</sup>; 558,6 (3M+K<sup>+</sup>-2H<sup>+</sup>)<sup>-</sup>; 732,7 (4M+K<sup>+</sup>-2H<sup>+</sup>)<sup>-</sup>.

TLC (MeCN—MeOH—NH<sub>4</sub>OH 3:1:2): R<sub>f</sub> = 0,3.

EA (C<sub>2</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>P<sub>2</sub>·(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O; M<sub>R</sub> = 226,0): C 10,6 (11,0); H 7,1 (7,6); N 12,4 (12,5).

### 2.3.4 MeOHBPhPin



Obr. 2.4 Syntéza MeOHBPhPin.

Do 100 ml tříhrdlé baňky (opatřené magnetickým míchadlem, zaváděcí trubičkou s kohoutem napojeným na přívod argonu a chladičem, na který byla nasazena zaváděcí trubička s kohoutem napojeným na membránovou vývěvu) byla vložena  $\text{PhPO}_2\text{H}_2$  (1,00 g; 4,60 mmol) a poslední hrdlo bylo uzavřeno zátkou. Aparatura byla třikrát sekurována argonem. Poté byla zaváděcí trubička na chladiči vyměněna za bublačku a zátky za septum, obojí v silném protiproudu argonu. Přes septum byl pomocí injekční stříkačky přidán HMDS (5 ml; 24,0 mmol) a proud argonu byl upraven tak, aby skrze bublačku procházely 2–3 bubliny za 5 sekund. Reakční směs poté byla zahřívána 12 hodin v olejové lázni při teplotě  $100\text{ }^\circ\text{C}$  za intenzivního vývoje  $\text{NH}_3$ . Po ukončení reakce byl zesílen proud argonu a aparatura byla ochlazená na RT. K roztoku byl přes septum přidán bezvodý  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) a roztok  $\text{AcCl}$  (0,26 g; 0,3 mmol) v bezvodém  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml). Vzniklá suspenze byla míchána dalších 12 hodin pod mírným proudem argonu. Poté byl do baňky přidán  $\text{EtOH}$  (20 ml). Surový produkt byl odpařen do sucha,

rozpuštěn v malém množství EtOH–H<sub>2</sub>O (1:1) a přečištěn sloupcovou chromatografií (DOWEX 50, H<sup>+</sup> cyklus, H<sub>2</sub>O–EtOH 1:1). Frakce obsahující produkt byla odpařena do sucha, pevná frakce byla rozpuštěna v horkém EtOH (15 ml), za horka odfiltrována s aktivním uhlím na fritě S4. Filtrát byl za intenzivního míchání nakapán do vody (250 ml). Sraženina byla odfiltrována na fritě S2, prosáta vzduchem a dosušena ve vakuovaném exsikátoru nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Produkt H<sub>2</sub>MeOHBPhPin byl získán jako šedý prášek (0,6 g; 56 %, vztaženo na AcCl).

*Charakterizace MeOHBPhPin:*

NMR (NaOD): <sup>1</sup>H δ 1,31 (CH<sub>3</sub>, t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HP</sub> = 14,4 Hz); 7,37–7,71 (arom., 5H); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} δ 21,9 (CH<sub>3</sub>, s); 77,0 (C—O, m); 127,5–132,8 (arom., s); 135,6 (C—P, d, <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 354 Hz); <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} δ 30,5 (s).

MS: (–) 324,6 (M–H<sup>+</sup>)<sup>–</sup>.

EA (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>P<sub>2</sub>; M<sub>R</sub> = 326,0): C 51,5 (50,5); H 4,9 (4,8).

## 2.4 Studie rozkladu připravených sloučenin

Rozklad připravených sloučenin byl studován pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie. Reakce byla provedena v prostředí pufrů. Vzorky byly inkubovány při  $80\text{ }^\circ\text{C}$  v uzavřených 5 mm NMR kyvetách zatažených parafilmem. Použité roztoky:

- $\text{HCl}$  ( $1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ );
- $\text{NaOH}$  ( $1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ );
- ETA pufr ( $1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), pH upraveno pomocí  $\text{HCl}$  na 9,6;
- MCA pufr ( $1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), pH upraveno pomocí  $\text{NaOH}$  na 2,7;
- TRIS pufr ( $1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), pH upraveno pomocí  $\text{NaOH}$  na 7,5.

### 2.4.1 Příprava vzorků

#### *PhOHBPIn*

Do vialek bylo naváženo 25,5 mg (11,0 mmol) přesně, navážky byly rozpuštěny v 0,7 ml jednotlivých roztoků. Po rozpuštění vzorku byl celý objem převeden do kyvety.

#### *BnOHBPIn*

Do vialek bylo naváženo 25,5 mg (16,0 mmol) přesně, navážka byla rozpuštěna v 0,7 ml jednotlivých roztoků. Vzorky v TRIS pufru a MCA pufru byly rozpuštěny za horka. Po rozpuštění vzorku byl celý objem převeden do kyvety.

#### *MeOHBPIn*

$\text{MeOHBPIn}$  byl získán ve formě oleje, proto byl připraven zásobní roztok této látky ( $0,20\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Zásobní roztok byl vždy smíchán s dvojnásobně koncentrovaným roztokem daného pufru v poměru 1:1.

#### *MeOHBPhPin*

Do vialky bylo odváženo 32,6 mg (10,0 mmol). Navážka byla rozpuštěna v 1 ml  $\text{NaOH}$ , ze vzniklého roztoku bylo do kyvety převedeno 0,7 ml. V ostatních roztocích se  $\text{MeOHBPhPin}$  nepodařila rozpustit ani za horka.

## 2.5 Sorpce na hydroxyapatit

### *Příprava zásobního roztoku*

Pro sorpce byl připraven  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  zásobní roztok BnOHBPIn. Bylo naváženo 127 mg (0,499 mmol) zvolené  $\text{H}_2\text{BnOHBPIn}\cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$ . Navážka byla rozpuštěna v 10 ml destilované vody. pH roztoku bylo pomocí 10% roztoku NaOH upraveno na 7,5. Bylo přidáno 5 ml TRIS pufru a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou na objem 50 ml.

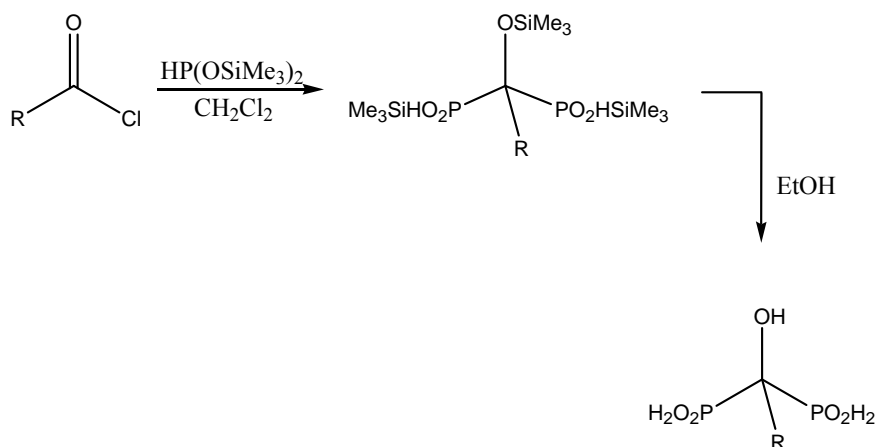
### *Příprava vzorků pro sorpce na hydroxyapatit*

Do vialek byl navážen hydroxyapatit (od 0,02 g do 0,2 g po 0,02g intervalech), bylo přidání 1,5 ml zásobního roztoku a 1,5 ml TRIS ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , pH 7,5). Dále byl připraven standard, který obsahoval 1,5 ml zásobního roztoku BnOHBPIn a 1,5 ml TRIS ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , pH 7,5). Vzorky byly tři dny při RT promíchávány otáčením celé nádoby. Vzorek byl zfiltrován přes mikrofiltr o velikosti pórů  $0,22 \mu\text{m}$ . Koncentrace analytu ve filtrátu byla stanovena pomocí UV–Vis spektroskopie při vlnové délce 200–350 nm.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Syntéza a vlastnosti připravených sloučenin

Při přípravě geminálních bis(fosfinových) kyselin se vždy jedná o dvoukrokovou reakci (Obr. 3.1), kdy v prvním kroku reaguje bis(trimethylsilyloxy)fosfin (připravený z fosforanu amonného a hexamethyldisilazanu *in situ*) s chloridem organické kyseliny v prostředí bezvodého dichlormethanu. V druhém kroku probíhá hydrolyza silylesterů alkoholem



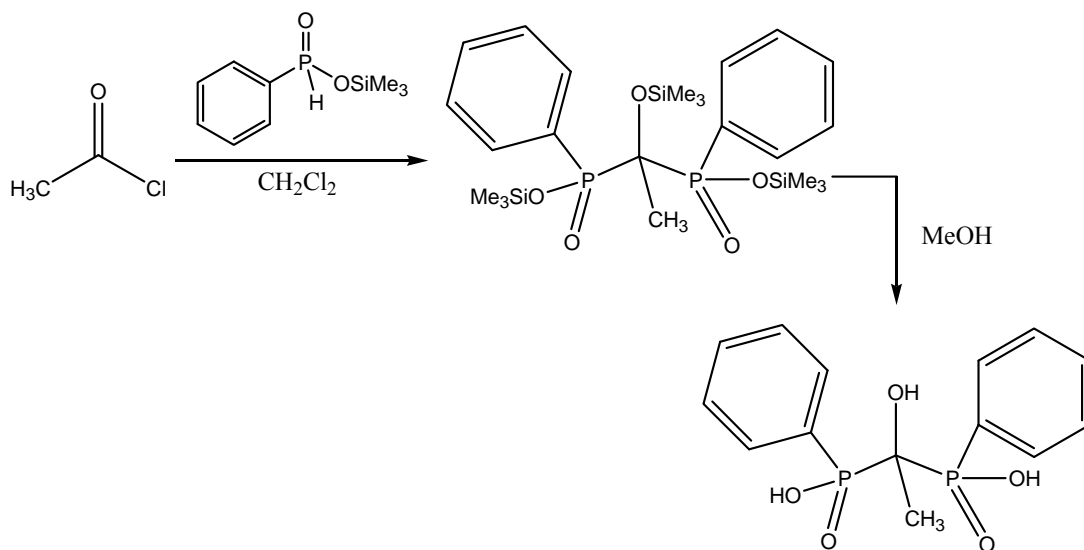
Obr. 3.1 Syntéza zvolených sloučenin, R = alkyl nebo aryl.

Obě reakce musí probíhat v inertní atmosféře, protože bis(trimethylsilyloxy)fosfin se snadno oxiduje (na vlhkém vzduchu je samozápalný) a silylestery fosfinových kyselin se snadno hydrolyzují. Při optimalizaci syntézy bylo zjištěno, že reakce chloridu organické kyseliny s bis(trimethylsilyloxy)fosfinem nemusí být chlazená (−40 °C). Při přípravě bis(trimethylsilyloxy)fosfinu se používá nadbytek fosforanu amonného, aby nedocházelo ke vzniku disubstituovaného produktu. Nezareagované množství fosforanu amonného musí být odstraněno krystalizací nebo selektivním srážením produktu. Produkt hydrolyzy byl vždy rozpuštěn v tetrahydrofuranu a srážen dichlormethanem. Dle <sup>31</sup>P NMR spektroskopie produkty syntézy vznikají téměř kvantitativně. Vzhledem k nutným čistícím operacím (odstranění chloridu amonného a ostatních iontů sloupcovou chromatografií) dochází k nižšímu výtěžku. Nízký výtěžek reakce (okolo 60 %) je kompenzován snadnou a rychlou syntézou, která vychází z dostupných komponent.

Získané látky jsou rozpustné ve vodě, alkoholech a etherech. V nepolárních rozpouštědlech, halogenovaných rozpouštědlech a uhlovodících jsou získané látky nerozpustné.

Syntéza MeOHBPhPin probíhá analogicky jako v případě geminálních bis(fosfinových) kyselin (Obr. 3.2.), jedná se o dvoukrokovou reakci, kdy v prvním kroku reaguje trimethylsilylester kyseliny fenylofosfinové (připravený z kyseliny fenylofosfinové a hexamethyldisilazanu *in situ*) s chloridem organické kyseliny v prostředí bezvodého dichlormethanu. V druhém kroku probíhá hydrolyza silylesterů methanolem.

Obě reakce musí probíhat v inertní atmosféře, protože silylestery fosfinových kyselin se snadno hydrolyzují. Díky přítomnosti hydrofobních fenylových skupin je sloučenina zcela nerozpustná ve vodě. V méně polárních rozpouštědlech je opět nerozpustná. Daná sloučenina je rozpustná pouze v alkoholech za horka.



Obr. 3.2 Syntéza MeOHBPhPin.

### 3.1.1 Charakterizace

Připravené látky byly charakterizovány pomocí  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie, hmotnostní spektroskopie a elementární analýzy.

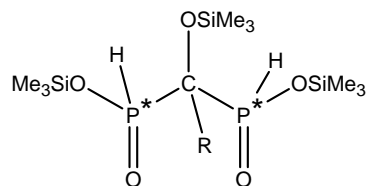
#### MS

Metoda ESI zobrazuje hlavně jednou nabité ionty. V případě bis(fosfinátu) zobrazuje aniony, protože bis(fosfinát) obsahuje dva velmi kyselé a tedy snadno odštěpitelné protony. Protože bis(fosfinát) nese dva záporné náboje, z elektrospreje se do vzorku uvolňují protony, sodné a draselné kationty z použitého skla, které kompen-

zují záporný náboj bis(fosfinátu) tak, aby byla molekula právě jednou záporně nabitá. Díky použití elektrospreje dochází ke vzniku objemných iontů obsahující kationty alkalických kovů.

### NMR

Meziproduktem je plně silylovaný bis(fosfinát) (Obr. 3.3.), který obsahuje dva chirální atomy fosforu. Můstkový atom uhlíku může být také chirální.



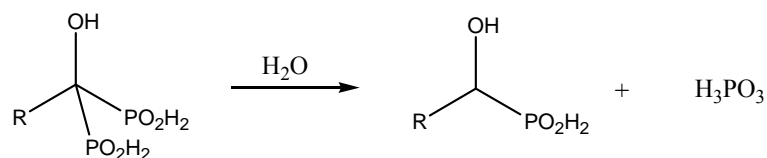
Obr. 3.3 Chirální meziprodukt vznikající při přípravě bis(H-fosfinových) kyselin,  
R = alkyl nebo aryl.

Chiralita meziproduktu se projevuje v  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech, z kterých bylo zjištěno, že po reakci získaná směs obsahuje několik diastereomerů. Pokud mají atomy fosforu odlišnou konfiguraci, methylová spojka je také chirální. Po hydrolyze chiralita mizí a v  $^{31}\text{P}$  NMR spektru získáme jeden signál produktu.

## 3.2 Stabilita ve vodném prostředí

Předběžné experimenty při pokusu esterifikovat fosfinátové skupiny ukázaly, že výchozí látky nejsou neomezeně stálé. Navíc podobnost bis(fosfinátů) k malonátům, které jsou hydrolyticky nestálé v kyselém prostředí, byla důvodem k otestování stability připravených sloučenin. Stabilita sloučenin byla testována ve vodných roztocích pokrývajících celou škálu pH. Vzorky byly inkubovány při 80 °C v 5mm uzavřených NMR kyvetách. Stabilita připravených sloučenin byla sledována pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie. Z intenzit jednotlivých signálů bylo určeno procentuální zastoupení výchozího bis(fosfinátu), vznikající kyseliny fosforité a mono(fosfinátu). Provedenou studií rozpadu připravených sloučenin bylo zjištěno, že nasyntetizované sloučeniny ve vodných prostředích nejsou neomezeně stálé a s různou rychlostí se rozpadají (Obr. 3.4).





Obr. 3.4 Rozpad bis(fosfinových)kyselin, R = alkyl nebo aryl.

Pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie byly sledovány jednotlivé rozpady. Ze získaných intenzit jednotlivých signálů kyseliny fosforité, fosforené, mono(fosfinátu) a bis(fosfinátu) bylo určeno poměrné zastoupení výchozí látky a vznikajících produktů. Z takto získaných dat byly vypracovány grafy procentuálního zastoupení v závislosti na čase, byly určeny poločasy rozpadu ( $\tau_{1/2}$ ) nebo stupně konverze ( $\alpha_{500}$ ) pro jednotlivé sloučeniny po 500 h. Získané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3.1. Data byla vyhodnocena pomocí programu Origin 8.

Tab. 3.1 Poločasy rozpadu nebo stupně konverze po 500 h pro testované sloučeniny, studie provedena při 80°C.

Sloučenina	Pufr				
	HCl	MCA	TRIS	ETA	NaOH
PhOHBPIn	5,6 h	43 h	7 %	15 %	5,4 h
BnOHBPIn	51 h	122 h	8 %	2 %	21 %
MeOHBPIn	286 h	22 %	0 %	0 %	20 %
MeOHBPhPin	-	-	-	-	0 %

V následujícím textu nebude diskutována sloučenina MeOHBPhPin, která je ve zvolených pufrch nerozpustná a v hydroxidu sodném se ani po dlouhé době nerozpadá.

#### *Stabilita v prostředí HCl (pH $\approx$ 0)*

Z provedené studie bylo zjištěno, že připravené sloučeniny jsou v roztoku HCl nestálé a rozpadají se na kyselinu fosforitou a mono(fosfinát). U vzorků MeOHBPIn a BnOHBPIn dochází ke vzniku malého množství kyseliny fosforené, u které není jasný mechanismus vzniku. Nejméně stabilní ze všech připravených sloučenin byl PhOHBPIn ( $\tau_{1/2} = 5,6$  h). O něco stabilnější než fenylový derivát byl benzylový derivát, který se rozpadal pozvolněji ( $\tau_{1/2} = 51$  h). Nejstabilnější z připravených sloučenin byla MeOHBPIn ( $\tau_{1/2} = 286$  h). Získaná data jsou graficky zpracována v Obr. 3.5.

### *Stabilita v MCA pufru (pH ≈ 2,7)*

V MCA pufru jsou připravené sloučeniny stálejší než v prostředí HCl, také zde probíhá rozpad na kyselinu fosforitou a mono(fosfinát). Z výsledků je patrné, že testované sloučeniny jsou v kyselém prostředí nestabilní. Vzhledem k tomu, že MCA je relativně slabá kyselina, je zde rozpad bis(fosfinátů) překvapivější než u HCl. Opět je zde sledovatelný stejný trend stability jako v prostředí HCl, kdy se nejrychleji rozpadá fenylový derivát. V porovnání s prostředím HCl se však fenylový derivát v MCA pufru rozpadá výrazně pomaleji ( $\tau_{1/2} = 43$  h). Benzylový derivát se rozpadá pomaleji než fenylový derivát ( $\tau_{1/2} = 122$  h). Jako nejstabilnější sloučenina v prostředí MCA pufru se ukázala MeOHBPIn, která se rozpadá pozvolně ( $\alpha_{500} = 22$  %). V porovnání s roztokem HCl v MCA pufru dochází pouze k nevýraznému rozpadu. Jednotlivé rozpady jsou graficky znázorněny v Obr. 3.6.

### *Stabilita v TRIS pufru (pH ≈ 7,5)*

V tomto pufru jsou dané sloučeniny stálé. Ukázalo se, že u MeOHBPIn v daném časovém intervalu, v kterém byl experiment proveden, nedochází k žádnému rozkladu. PhOHBPIn a BnOHBPIn se pozvolna rozpadají. BnOHBPIn ( $\alpha_{500} = 8$  %) je stabilnější než PhOHBPIn ( $\alpha_{500} = 7$  %). V porovnání s rozpady v prostředí ostatních roztoků se však testované látky rozpadají zanedbatelně.

### *Stabilita v prostředí NaOH (pH ≈ 14)*

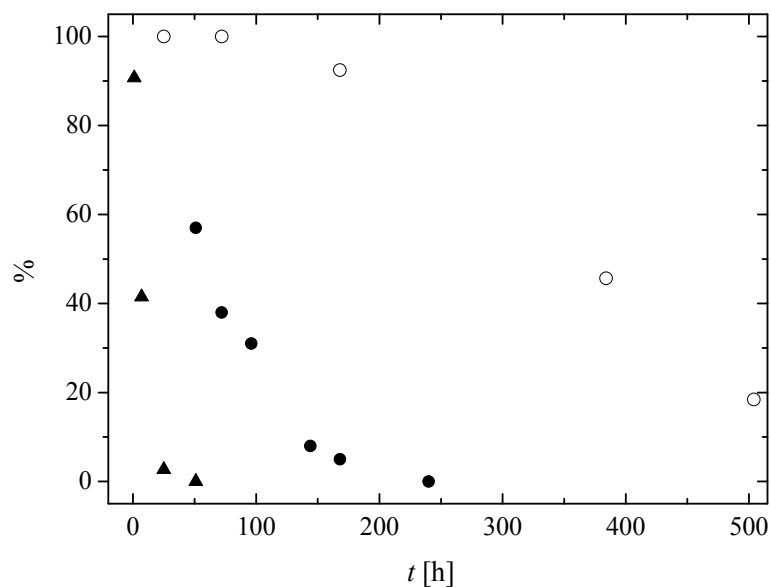
K nejrychlejšímu rozpadu v prostředí NaOH dochází u PhOHBPIn ( $\tau_{1/2} = 5,4$  h). V porovnání s fenylovým derivátem jsou methylový ( $\alpha_{500} = 20$  %) a benzylový derivát ( $\alpha_{500} = 21$  %) stálejší. Oproti trendu z předchozích roztoků je rozpad benzylového derivátu a methylového derivátu srovnatelný. Rozpad připravených sloučenin v prostředí NaOH je graficky znázorněn Obr. 3.7.

### *Stabilita v ETA pufru (pH ≈ 9,6)*

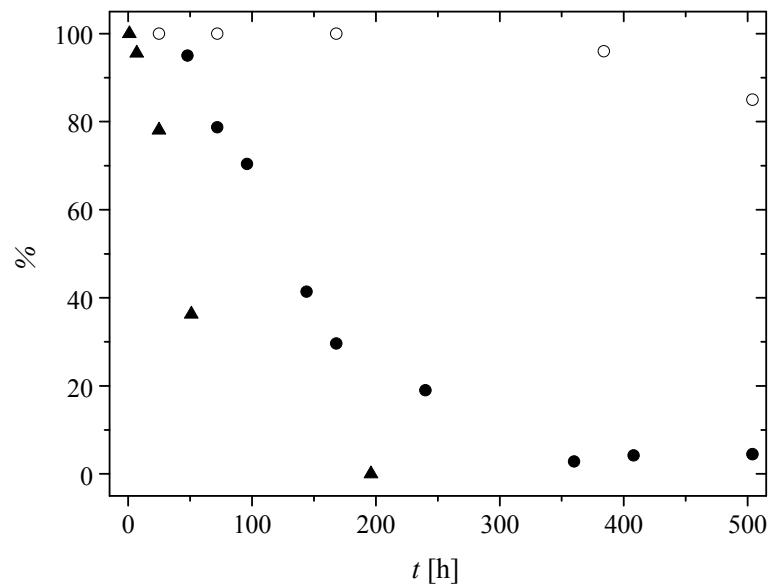
V ETA pufru je rozpad pomalejší než v prostředí NaOH. V průběhu experimentu u MeOHBPIn nedošlo k žádnému rozpadu. BnOHBPIn a PhOHBPIn jsou v tomto pufru také velice stabilní, ale velmi pomalu dochází k rozkladu (BnOHBPIn  $\alpha_{500} = 2$  %, PhOHBPIn  $\alpha_{500} = 15$  %). Je zde opět patrný trend, kdy nejstálejší je methylový derivát,

který se nerozkládá, benzylový derivát se rozkládá zcela zanedbatelně a fenylový derivát se rozpadá nejrychleji.

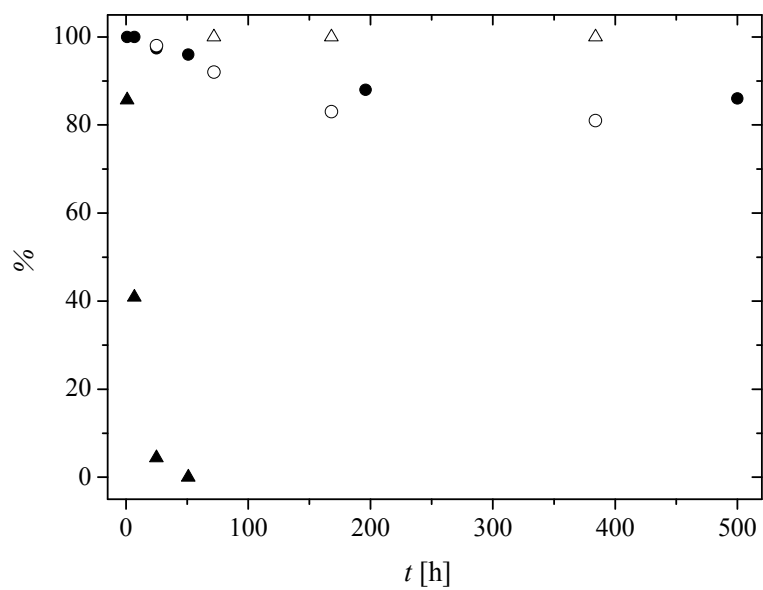
Ze získaných dat je patrné, že připravené sloučeniny nejsou stálé v kyselém prostředí. V prostředí kyseliny chlorovodíkové se sloučeniny rozpadají velice rychle, v kyselině chloroctové se látky rozpadají o něco pomaleji. V neutrálním a mírně zásaditém prostředí jsou připravené sloučeniny relativně stálé. V bazické oblasti pH nejsou testované sloučeniny neomezeně stálé, ale rozpad je zde pomalejší než v silně kyselé oblasti pH. Jednotlivá prostředí je možno seřadit dle vzrůstající stálosti zvolených bis(fosfinátů):  $\text{HCl} < \text{MCA} < \text{NaOH} < \text{TRIS} \sim \text{ETA}$ . Na testovaných sloučeninách je pozorovatelný trend stálosti, kdy nejstálejší je MeOHBPIn, o něco méně stabilní je BnOHBPIn a nejméně stálá je vždy PhOHBPIn



Obr. 3.5 Rozpad připravených sloučenin v prostředí HCl (80°C), (○ = MeOHBPIn, ● = BnOHBPIn, ▲ = PhOHBPIn).



Obr. 3.6 Rozpad připravených sloučenin v MCA pufru (80 °C), (○ = MeOHBPIn, ● = BnOHBPIn, ▲ = PhOHBPIn).

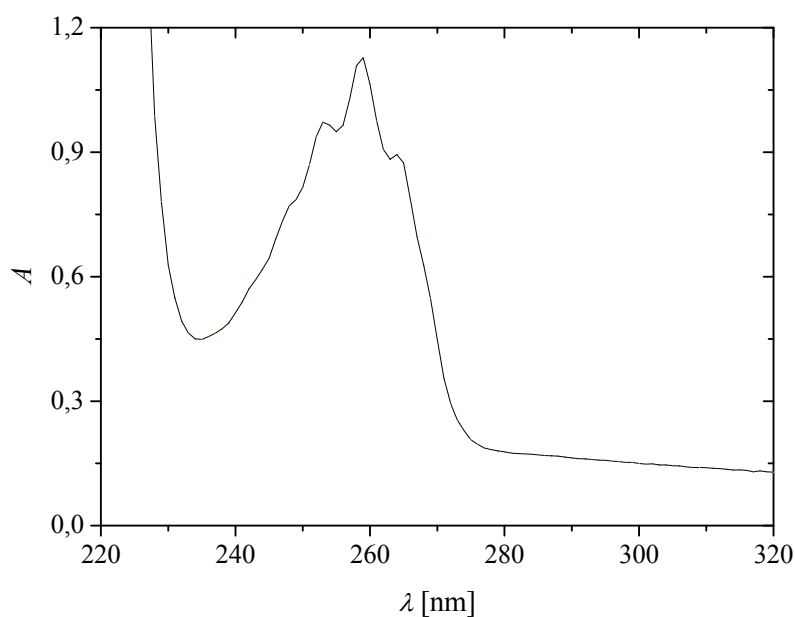


Obr. 3.7 Rozpad připravených sloučenin v prostředí NaOH (80 °C), (○ = MeOHBPIn, ● = BnOHBPIn, ▲ = PhOHBPIn, Δ = MeOHBPhPin).

### 3.3 Sorpce

Cílem sorpčního experimentu bylo potvrdit předpoklad, že se bis(fosfináty) nesorbují na hydroxyapatit jakožto model kostní tkáně. Zvolen byl BnOHBPIn, který je ve vodném prostředí dostatečně stálý a díky benzylové skupině je detekovatelný pomocí UV-Vis spektroskopie.

Sorpce byla provedena v prostředí pufru (TRIS  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , pH 7,5) s proměnným množstvím hydroxyapatitu. Vzorky byly tři dny promíchávány otáčením celé nádoby a inkubovány za laboratorní teploty. K určení množství sorbovaného bis(fosfinátu) na hydroxyapatit byla použita metoda UV-Vis spektroskopie. Tato metoda vyžaduje použití standardu, který měl stejné složení jako vzorky, ale neobsahoval hydroxyapatit. Spektra vzorků byla proměřena v rozsahu vlnových délek 200–350 nm. Z měření bylo získáno UV-Vis spektrum standardu (Obr. 3.8.) a UV-Vis spektra roztoků, které při inkubaci obsahovaly proměnné množství hydroxyapatitu.



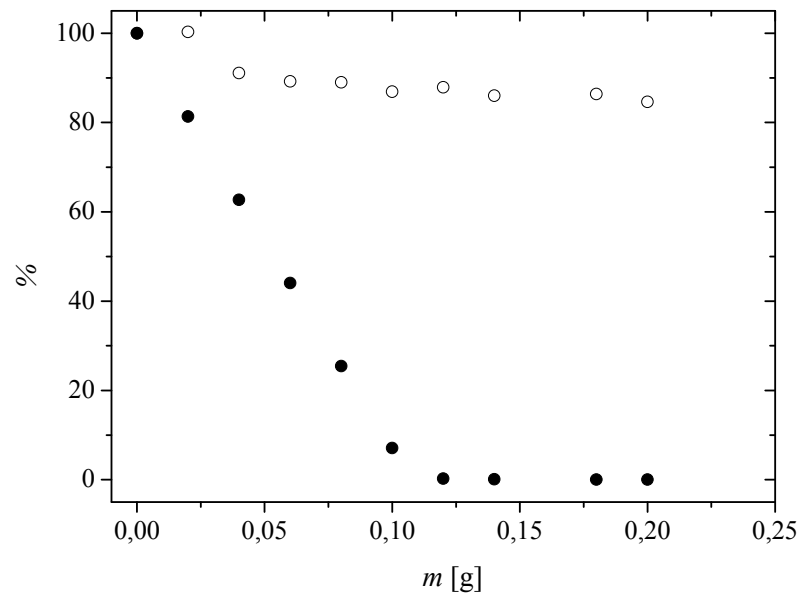
Obr. 3.8 UV-Vis spektrum standardu BnOHBPIn (5mM),  $\lambda_{1 \text{ max}} = 253 \text{ nm}$ ,  
 $\lambda_{2 \text{ max}} = 259 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{3 \text{ max}} = 265 \text{ nm}$ .

Z měření byly získány hodnoty tří absorbancí pro jednotlivé navážky hydroxyapatitu. Spektra vzorků mají stejný tvar jako spektrum standardu, ale oproti standardu dochází ke snižování koncentrace BnOHBPIn. Hodnoty absorbance pro jednotlivé navážky hydroxyapatitu byly zprůměrovány a uvedeny v grafu (Obr. 3.9). Získaná data ze sorpčních experimentů byla porovnána s daty, které byly získány

simulací pomocí Langmuirovy izotermy (rovnice 2.1.). Hodnoty  $X_m$  a  $K$  pro hydroxyethylbis(fosfonát) byly převzaty z literatury<sup>25</sup>. Převzaté hodnoty:

$$X_m = 1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{g},$$
$$K = 6,1 \cdot 10^{-4} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}.$$

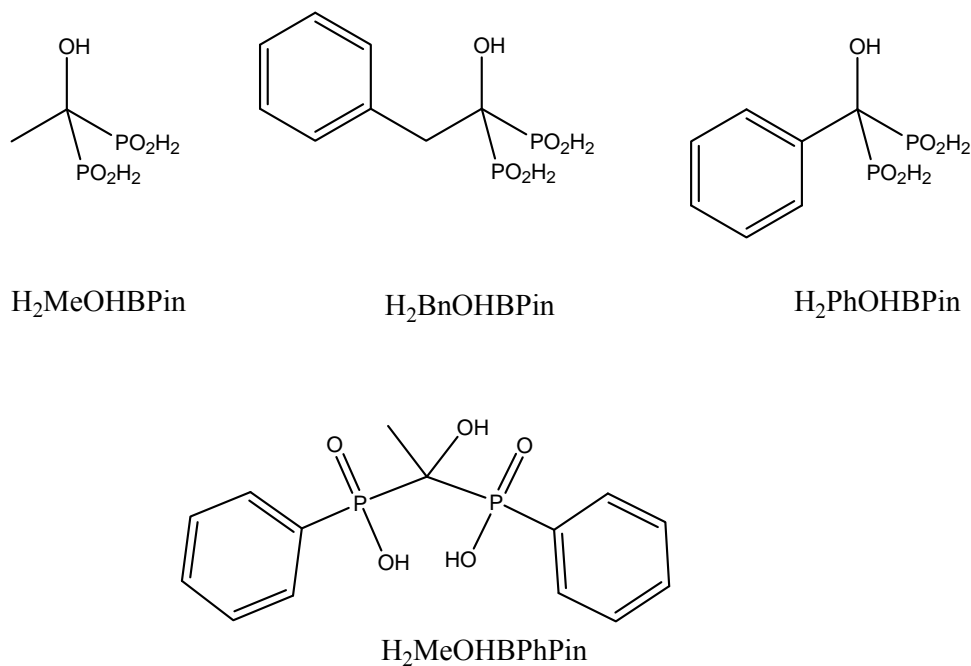
Získaná data byla zpracována pomocí programu Scientist<sup>29</sup> a graficky zpracována programem Origin 8. V porovnání s bis(fosfonáty) je sorpce na bis(fosfinátech) zanedbatelná viz Obr. 3.9.



Obr. 3.9 Závislost obsahu bis(fosfonátu) a bis(fosfinátu) v roztoku na množství přidaného hydroxyapatitu (○ ~ procentuální zastoupení bis(fosfinátu) – experimentální data, ● = vypočtené procentuální zastoupení bis(fosfonátu) – simulace).

## 4. ZÁVĚR

Byly připraveny 4 geminální bis(fosfináty) (Obr. 4.1), které byly plně charakterizovány pomocí  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie, MS, TLC, EA. Připravené sloučeniny byly získány v následujících výtěžcích: BnOHBPIn 57 %, PhOHBPIn 53 %, MeOHBPhPin 56 % a MeOHBPIn s výtěžkem 55 %.



Obr. 4.1 Připravené geminální bis(fosfinové) sloučeniny.

Stabilita připravených sloučenin byla testována ve vodných roztocích pokrývajících celou škálu pH. Rozpad sloučenin byl sledován pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie. Výsledky ukazují, že připravené sloučeniny se s různou rychlostí v závislosti na prostředí rozpadají na mono(fosfinát) a kyselinu fosforitou. Pomocí UV–Vis spektroskopie byla dále provedena sorpce bis(fosfofinátu) na hydroxyapatit jakožto model kostní tkáň. Výsledky sorpčního experimentu ukazují, že dochází ke zcela zanedbatelné sorpci na hydroxyapatit.

- 
- [1] Quin, L. D.: *A Guide to Organophosphorus Chemistry*, A John Wiley & Sons, 2000.
- [2] Hilderbrand, R. L.: *The Role of Phosphonates in Living Systems*, CRC Press, 1983.
- [3] Engel, R.: *Synthesis of Carbon-Phosphorus Bond*, CRC Press, 1998.
- [4] Martell, A. E.; Smith R. M.: *Critical Stability Constants*. New York, Plenum Press, Vols. 1–6; 1974-1989. NIST Standard Reference Database 46 (*Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes*), Version 7.0, 2003.
- [5] Kubíček, V.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I: *Eur. J. Inorg. chem.*, **333**, (2007).
- [6] Zhang, S.; Geeti, G.; Uludağ, H.: *Chem. Soc. Rev.*, **36**, 507, (2007).
- [7] a) Bagi C. M.: *Adv. Drug Delivery Rev.*, **57**, 995 (2005). b) Widler, L.; Jaeggi, K. A.; Glatt, M.; Muller, K.; Bachmann, R.; Bisping, M.; Born, A. R.; Cortesi, R.; Guiglia, G.; Jeker, H.; Klein, R.; Ueli, R.; Schmid, J.; Schreiber, G.; Seltenmeyer, Y.; Green, J. R.: *J. Med. Chem.*, **45**, 3721 (2002). c) Russell, R. G. G.; Rogers, M. J.: *Bone*, **25**, 97 (1999).
- [8] Fleisch, H.; Russell, R. G. G.; Straumann, F.; *Nature*, **212**, 901 (1966).
- [9] Fleisch, H.; Russel, R. G.; Francis, M. D.; *Science*, **165**, 1262 (1969).
- [10] Fleisch, H.; *Endocr.Rev.*, **19**(1), 80 (1998).
- [11] a) Rogers, M. J.; Gordon, S.; Benford, H. L.; Coxon, F. P.; Luckman, S. P.; Monkkonen, J.; Frith, J. C.: *Cancer*, **12**, 2961 (2000). b) Boissier, S.; Magonetto, S.; Frappart, L.; Cuzin, B.; Ebetino, F. H.; Delmas, P. D.; Deliaisse, J. M.; Clezardin, P.: *Cancer Res.*, **67**, 3890 (1997).
- [12] Fleisch, H.; Reszka, A.; Rodan, G. A.; Rogers M.: Bisphosphonates – mechanism of action. In: Bilezikian, J. P.; Raisz, L. G.; Rodan, G. A. (Eds.): *Principles of Bone Biology*, 2nd Edition, San Diego, Academic Press, 2002, 1361.
- [13] Wang, D.; Miller, S. C.; Kopečková, P.; Kopeček, J.: *Adv. Drug Delivery Rev.*, **57**, 1049 (2005).
- [14] Dunford, J. E.; Thompson, K.; Coxon, F. P.; et al.: *J. Pharmacol Exp. Ther.*; **296**, 235 (2001).
- [15] Mönkkönen, H.; Aureola, S.; Lehenkari, P.; Kellinsalmi, M.; Hassinen; I. E.; Vepsäläinen, J.; Mönkkönen, J.: *Brit. J. Pharmacol*, **147**, 437 (2006).
- [16] Neville-Webbe, H. L.; Holen, I.; Coleman, R. E.: *Cancer Treatment Rev.*, **28**(6), 305 (2002).
- [17] Fleisch, H.; *Bisphosphonates in Bone Disease*, Academic Press, London, 2000.



- 
- [18] a) Russel, G.; Mueller, G.; Shipman, C.; Croucher, P.; *Novartis Found. Symp.* **232**, 251 (2001). b) Watts, N. B.: *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **27**, 197 (2001). c) Coleman, R. E.; *Rev. Contemp. Pharmacother.*, **9**, 147(1998).
- [19] Boyde, A. [www.brsoc.org.uk/gallery](http://www.brsoc.org.uk/gallery); [on-line][2011].
- [20] Green, J, R. *Clinical Rev. Oncologist*; **9**(4), 3 (2004).
- [21] Vitha, T.: *Bone-seeking Lanthanide(III) Complexes of Macrocyclic Ligands Bearing Bis(phosphonate) Pendant Arm*, (2009), disertační práce UK.
- [22] Hengst, V.; Oussoren, C.; Kissel, T.; Storm, G.: *Inter. Jour. Pharm.*, **331**(2), 224 (2007).
- [23] Gonzalez, K. A.; Wilson, L. J.; Wu, W.; Nancollas, G. H.: *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 1991 (2002).
- [24] Försterová, M.; Svobodová, I.; Lubal, P.; Táborský, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.: *Dalton Trans.*, **5**, 535 (2007). b) Táborský, P.; Svobodová, J.; Lubal, P.; Hnatejko, Z.; Lis, S.; Hermann, P.: *Polyhedron*, **26**(15), 4119 (2007).
- [25] a) Vitha, T.; Kubíček, V.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Lukeš, I.; Peters J. A. *Dalton Trans.*, 3204 (2009). b) Vitha, T.; Kubíček, V.; Kotek, J.; Hermann, P.; Kolar, Z. I.; Wolterbeek, H. T.; Peters, J. A.; Lukeš I. *Langmuir*, **24**, 1952 (2004). c) Vitha, T.; Kubíček, V.; Hermann, P.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Kolar, Z. I.; Wolterbeek, H. T.; Breeman, W. A. P.; Lukeš, I.; Peters J. A.: *J. Med. Chem.*, **51**, 677 (2008); d) Kubíček, V.; Rudovský, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Kolar, Z. I.; Wolterbeek, H. T.; Peters, J. A.; Lukeš I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 16477 (2005).
- [26] Loginova, L. P.; Levin, I. V.; Matveeva, A. G.; Pisareva, S. A.; Nifant'ev, E. E.: *Russ. Chem. Bul.*, **53**, 2000 (2004).
- [27] Gaizer, F.; Haegele, G.; Goudetsidis, S.; Papadopoulos, H. Z. *Naturforsch., B: Chem. Sci.*, **45**, 323 (1990).
- [28] David, T.: *Methylene-bis(phosphonates) Derivaties for Modification of Biomolecules*, (2010), diplomová práce UK.
- [29] Micromath: Scientist, version 2.0, Salt Lake City, Utah.