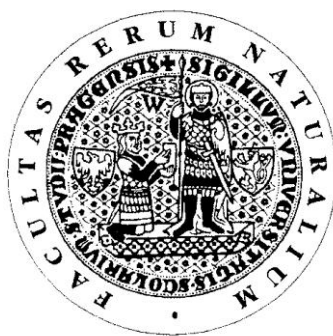


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Soňa Procházková

SYMETRICKÉ AMINOFOSFINÁTY

Symmetrical Aminophosphinates

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

Praha 2012

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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

Jsem si vědoma 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 13. května 2012.

ABSTRAKT

Byly připraveny a studovány dva typy α -aminofosfinátů: fosfinové analogy kyseliny iminodictové – kyselina aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinová) (**IDP^{hm}**) a kyselina aminobis(methyl(2-karboxyethyl)fosfinová) (**IDP^{ce}**), a bis(aminomethylfosfináty) – kyselina (hydroxy(fenyl)methylen)bis(aminomethylfosfinová) (**PheOHABPin**) a kyselina (methylen)bis(aminomethylfosfinová) (**ABPin**). Všechny připravené látky byly plně charakterizovány (pomocí NMR, MS, elementární analýzou). Struktura jedné látky v pevném stavu byla stanovena pomocí RTG difrakce.

Difosfináty byly syntetizovány reakcí Mannichovského typu, kdežto příprava bis(aminomethylfosfinátů) představovala několikastupňovou syntézu probíhající přes reaktivní silylestery. Látky byly připraveny ve středně vysokém až vysokém výtěžku.

Dále byly zkoumány a srovnávány acidobazické a koordinační vlastnosti studovaných látek pomocí potenciometrických a NMR titrací. Zjištěné hodnoty bazicity aminoskupin, které určují stabilitu komplexů, poskytly překvapivé výsledky. U difosfinátů byla zjištěna velmi nízká bazicita atomu dusíku, a proto tyto látky tvoří jen slabé komplexy. Oproti tomu hodnoty disociačních konstant aminoskupin bis(aminomethylfosfinátů) jsou výrazně vyšší než u ostatních aminofosfinátů a jsou srovnatelné s hodnotami obdobných aminokarboxylátů. Takto vysoká bazicita zaručuje dobré komplexační schopnosti.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Organofosforová syntéza, komplexy kovů, termodynamická stabilita.

ABSTRACT

Two types of α -aminophosphinates were prepared and studied: phosphinate analogues of iminodiacetic acid – aminobis(methyl(hydroxymethyl)phosphinic acid) (**IDP^{hm}**) and aminobis(methyl(2-carboxyethyl)phosphinic acid) (**IDP^{ce}**), and bis(aminomethylphosphinates) – (hydroxy(phenyl)methylen)bis(aminomethylphosphinic acid) (**PheOHABPin**) and (methylen)bis(aminomethylphosphinic acid) (**ABPin**). All prepared compounds were fully characterized (by NMR, MS, elemental analysis). One crystal structure was determined by X-ray singlecrystal analysis.

The diphosphinates were synthesized by Mannich type reaction, whereas the bis(aminomethylphosphinates) were prepared by multistep synthesis including reactive silylesters. Compounds were prepared in moderate or good yields

Acid-base and coordination properties of ligands were investigated and compared by potentiometric and NMR titrations. The values of protonation constants of aminogroups, which determine stability of complexes, showed surprising results. An extremely low basicity of nitrogen atom was found in diphosphinates. So, these compounds form just week complexes. On the other hand the basicity of aminogroups in bis(aminomethylphosphinates) is distinctively higher than those found for other aminophosphinates. High basicity results in good complexation properties.

KEYWORDS:

Organophosphorus synthesis, metal complexes, thermodynamic stability.

OBSAH

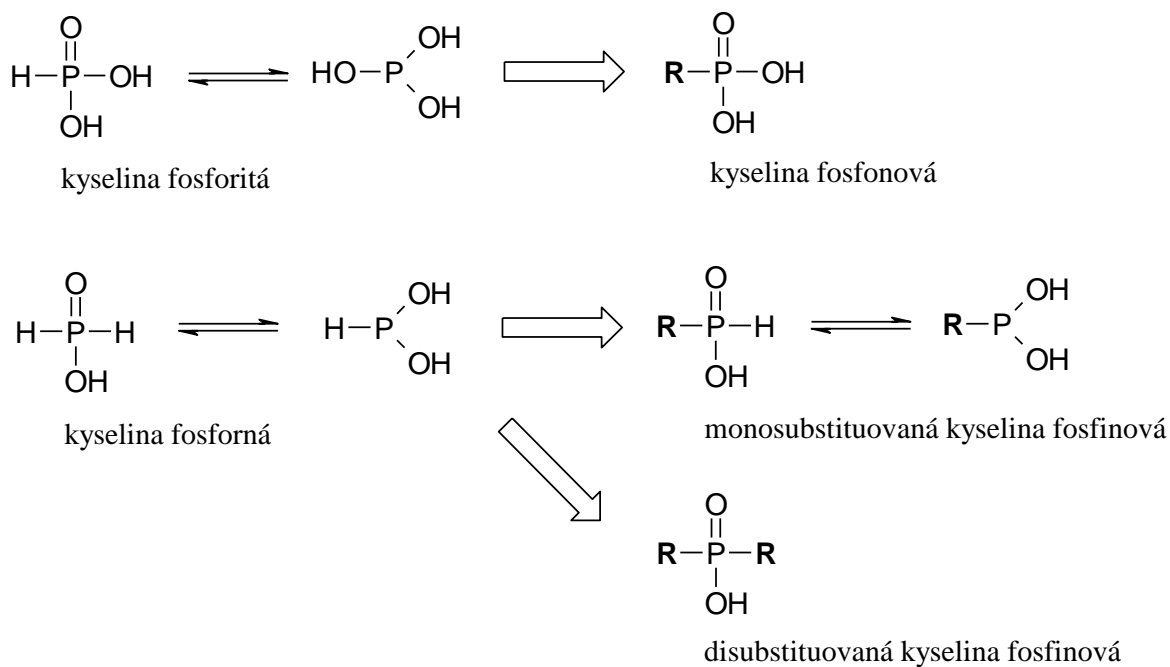
1. Úvod	6
1.1. Aminofosfonové/fosfinové kyseliny.....	8
1.1.1. Acidobazické vlastnosti.....	12
1.1.2. Koordinační vlastnosti.....	13
1.2. Bisfosfonáty/fosfináty.....	14
1.2.1. Acidobazické vlastnosti.....	15
1.3. Makrocyclické polyaminofosfonáty/fosfináty.....	17
1.4. Cíl práce.....	19
2. Experimentální část	20
2.1. Použité chemikálie.....	20
2.2. Metody charakterizace.....	20
2.3. Syntéza.....	23
I. Kyselina <i>N</i> -benzyl-aminobis(methylfosfinová).....	23
II. Kyselina <i>N</i> -benzyl-aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinová).....	24
III. Kyselina aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinová) – IDP ^{hm}	25
IV. Kyselina <i>N</i> -benzyl-aminobis(methyl(2-karboxyethyl)fosfinová).....	26
V. Kyselina aminobis(methyl(2-karboxyethyl)fosfinová) – IDP ^{ce}	28
VI. Kyselina <i>N</i> -ftalimidomethylfosfinová.....	29
VII. Kyselina (hydroxy(fenyl)methylen)bis(<i>N</i> -ftalimidomethylfosfinová).....	31
VIII. Kyselina (hydroxy(fenyl)methylen)bis(aminomethylfosfinová).....	33
3. Výsledky a Diskuse	34
3.1. Syntéza.....	34
3.1.1. Syntéza kyseliny aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinové).....	34
3.1.2. Syntéza kyseliny aminobis(methyl(2-karboxyethyl)fosfinové).....	35
3.1.3. Syntéza kyseliny (hydroxy(fenyl)methylen)bis(aminomethylfosfinové).....	37
3.2. Potenciometrické titrace.....	39
3.2.1. Aminodifosfinové kyseliny.....	39
3.2.2. Bis(aminomethylfosfináty).....	44
3.3. NMR titrace.....	48
3.4. Acidobazické a koordinační chování v roztoku.....	51
4. Závěr	53
5. Seznam použitých zkratk	54
6. Seznam použité literatury	55

1. ÚVOD

Chemie fosforu zahrnuje širokou paletu sloučenin – od látek ryze anorganických přes řadu organofosforových sloučenin až po makromolekulární komplexy. I v živých organismech hrají klíčovou roli sloučeniny fosforu. Fosfáty a jejich estery se účastní pochodů v důležitých biochemických dějích jako je přenos genetické informace, metabolismus, fotosyntéza, nervová a svalová činnost.¹

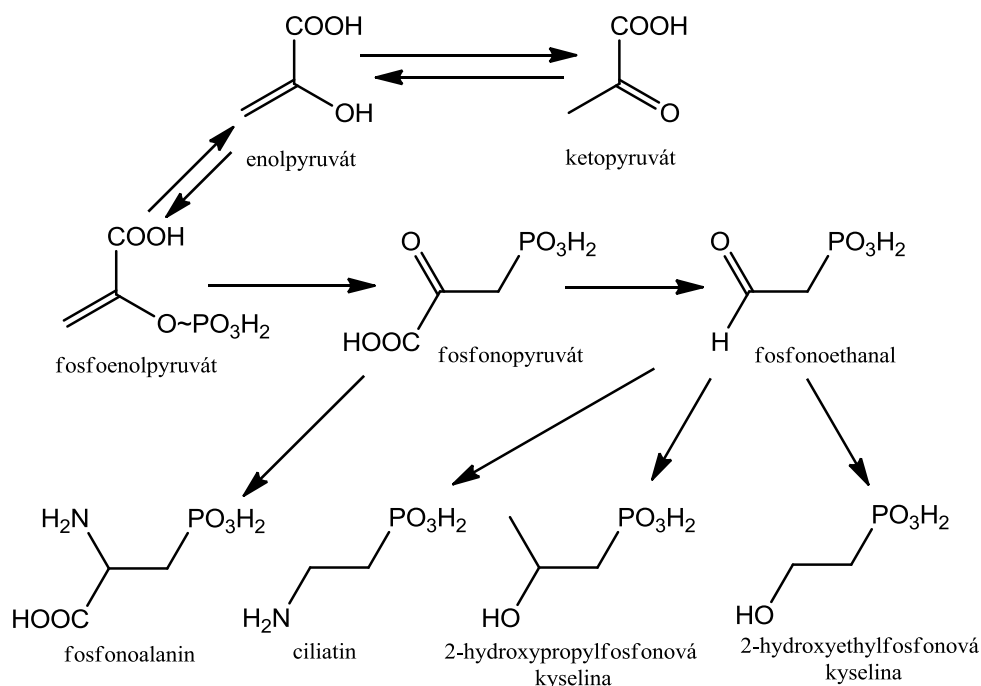
Předpokládalo se, že fosfáty jsou jediná forma, ve které se fosfor v živých organismech nachází. Až v polovině minulého století se ukázalo, že i sloučeniny s fosforem přímo vázaným na atom uhlíku (neboli s P–C vazbou) jsou součástí živé hmoty. Konkrétně se jedná o kyseliny fosfonové a fosfinové.

Fosfonové kyseliny, mající obecný vzorec $\mathbf{R-PO_3H_2}$ (kde \mathbf{R} je alkyl či aryl), jsou odvozeny od kyseliny fosforité nahrazením vodíku přímo vázaného na fosfor ($\text{H-PO}_3\text{H}_2$) organickým substituentem. Fosfinové kyseliny vznikají obdobně substitucí jednoho či obou na fosfor přímo vázaných vodíků kyseliny fosforené organickým zbytkem. Rozdělují se na monosubstituované ($\mathbf{R-PO_2H_2}$) a disubstituované ($\mathbf{R^1R^2PO_2H}$). (Obr. 1)



Obr. 1 Přehled fosfonových a fosfinových kyselin

Roku 1959 byla z prvoků žijících v batoru ovce poprvé izolována kyselina 2-aminoethylfosfonová neboli ciliatin² (**Obr. 2**). Od té doby byl ciliatin nalezen i v tělech bakterií, nižších mořských živočichů, bezobratlých, ale i v tkáních člověka. Díky rozvoji NMR technik (především ³¹P NMR) bylo při zkoumání tkáňových preparátů zjištěno, že obsahují řadu dalších fosfonátů resp. fosfinátů jako jsou například fosfolipidy, fosfosfingolipidy, fosfonglyceridy a *N*-methylciliatin.³ Podařilo se zjistit, že P–C vazba vzniká v organismech biosynteticky z fosfoenolpyruvátu.^{4,5} (**Obr. 2**)



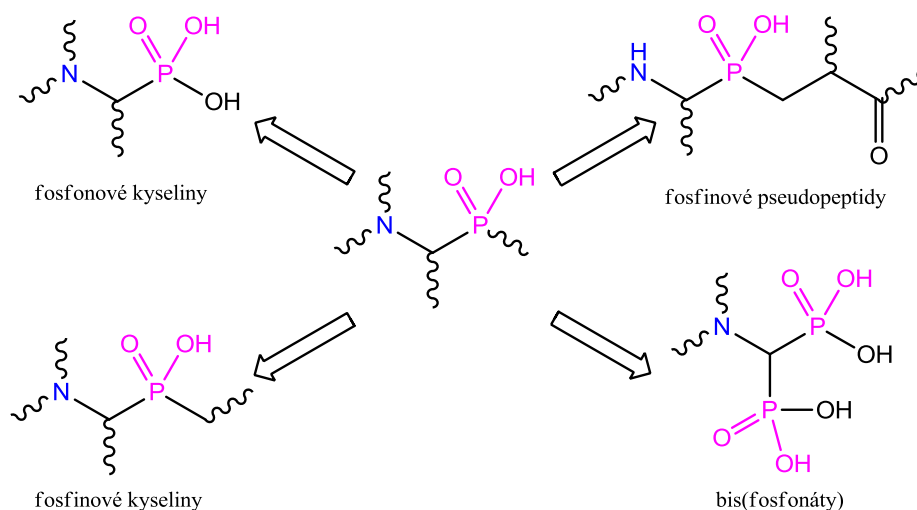
Obr. 2 Biosyntéza P–C vazby v organismu

Vedle ciliatinu vzniká v organismu z fosfoenolpyruvátu i fosfoalanin. Jeho přítomnost byla popsána například v lidské slinivce, slezině či střevech; avšak jeho biologická funkce není zatím objasněna.⁶

Celá řada fosfonových a fosfinových kyselin byla připravena uměle. Protože se dají použít jako bioisosterická záměna karboxylových kyselin, které mají v organismech úlohu regulátorů, mediátorů či inhibitorů, mohou fosfonové/fosfinové kyseliny hrát důležitou roli v ovlivnění metabolických procesů.⁷ Další typ synteticky připravených sloučenin jsou strukturní analogy přírodních fosfátových esterů, které obsahují místo přírodního C–O–P spojení vazbu C–C–P. Ty bývají na rozdíl od přirozených esterů odolné vůči hydrolytickým enzymům a poskytují tak důležité informace, které mohou přispět k objasnění řady biologických mechanismů.⁸

1.1. AMINOFOSFONOVÉ/FOSFINOVÉ KYSELINY

Aminofosfonové a aminofosfinové kyseliny tvoří skupinu široce používaných látek s uplatněním od agrochemie (herbicidy, insekticidy, pesticidy) až po medicínu (antibiotika, antivirotika, inhibitory enzymů, kontrastní látky). Aminofosfonové/fosfinové kyseliny jsou analogy aminokarboxylových kyselin vzniklé nahrazením karboxylové skupiny za skupinu fosfonátovou, resp. fosfinátovou. Pozornost je věnována především α -aminofosfonovým/fosfinovým kyselinám. V nich jsou aminová a fosfonátová/fosfinátová skupina v těsné blízkosti (skupiny jsou spojeny pouze přes methylenový můstek, čímž vzniká typické N–C–P seskupení) a mohou se snadno vzájemně ovlivňovat.



Obr. 3 Typy biologicky aktivních N–C–P sloučenin

Nejdůležitější typy látek s N–C–P uskupením představuje **Obr. 3**. Největší pozornost výzkumu je věnována fosfonovým kyselinám. Biologicky aktivní α -aminofosfonáty byly objeveny již před více než půl stoletím a dodnes nacházejí široká uplatnění. Chemie fosfinových kyselin není zdaleka tolik prozkoumána. α -aminofosfináty se používají zejména k syntézám pseudopeptidů využitelných jako inhibitory enzymů. Bis(fosfonátové) skupiny mají vysokou afinitu ke kostním tkáním, čehož se využívá při terapii kostních nádorů či jako kontrastní látky pro MRI zobrazování.

Obecné a farmakologické vlastnosti a příklady jednotlivých typů N–C–P sloučenin shrnuje **Tab. 1**.

Tab. 1 Obecné a farmakologické charakteristiky vybraných aminofosfonátů/fosfinátů.⁹

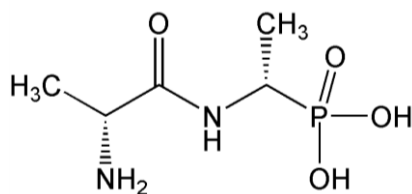
	α-aminofosfonáty	α-aminofosfináty	aminobis(fosfonáty)
syntetická dostupnost	velmi dobrá	normální až dobrá	velmi dobrá
aktivita a selektivita	střední	vysoká	vysoká
typ inhibice	reverzibilní	reverzibilní	reverzibilní
chemická a metabolická stabilita	velmi dobrá	velmi dobrá	velmi dobrá
biodostupnost	nízká	závislá na struktuře	velmi nízká
vylučování	rychlé	závislé na struktuře	velmi rychlé
doba léčebného účinku	krátká	krátká	dlouhá
vedlejší účinky, toxicita	ne	ne	ano
příklad léčiva	alafosfalin (antibiotikum)	fosinopril (antihypertenzivum)	incadronate (léčivo proti osteoporóze)

Hlavní snaha o využití α -aminofosfonových/fosfinových kyselin v medicíně je zaměřena na získání vysoce efektivních a selektivních inhibitorů enzymů (katalytických proteinů) všech systémových tříd. Tetraedrické uspořádání na atomu fosforu se podobá intermediátu vznikajícímu při enzymatické hydrolyze peptidové vazby. Avšak na rozdíl od peptidů, aminofosfonová/fosfinová skupina hydrolyze nepodléhá, a tak způsobuje inhibici těchto hydrolyzujících enzymů.^{5, 10}

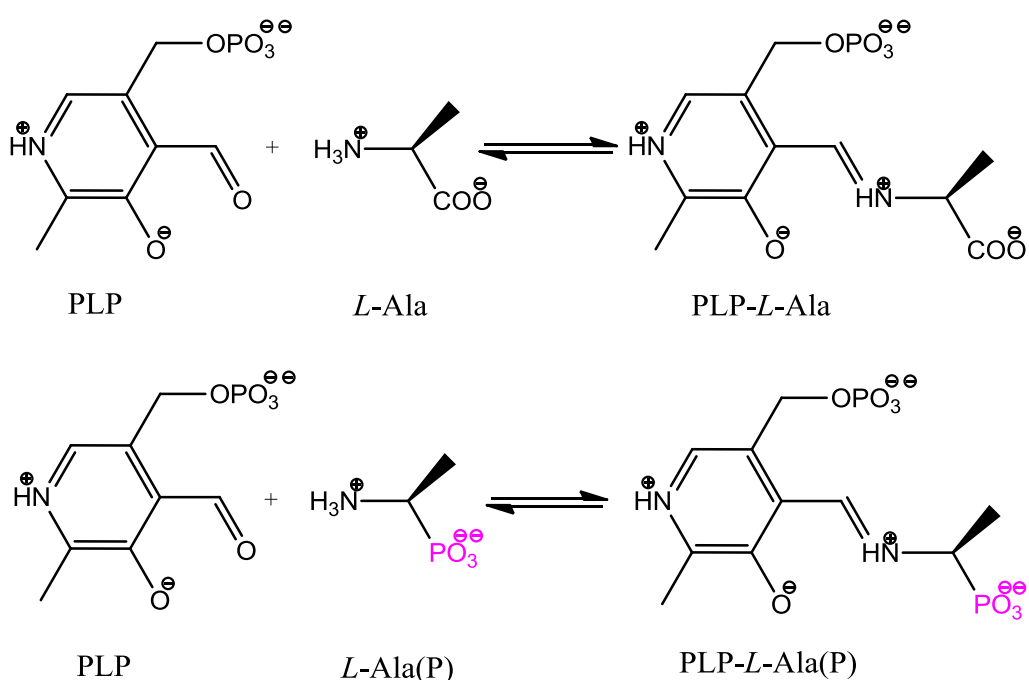
Úspěchu bylo dosaženo zvláště v inhibici proteas (patří do skupiny hydrolas) a ligas. Specifická inhibice enzymů, které jsou aktivní pouze při patologických stavech, je další cestou k cílené terapii onemocnění. Potenciální aplikace léčiv zahrnujících N–C–P strukturu ve své molekule se nabízí při léčbě bakteriálních a protozoálních infekcí (inhibice ureasy a ligas), tuberkulózy (inhibice glutamin syntetasy) a HIV (inhibice HIV-1 proteasy).⁹

Jako příklad používaného léčiva lze uvést antibiotikum s obchodním názvem Alafosfalin (fosfono(di)peptid *L*-Ala-*L*-Ala(P), **Obr. 4**). Jeho účinná složka, uvolněný metabolit *L*-Ala(P), zabraňuje biosyntéze buněčné stěny. *L*-Ala(P) se váže na

pyridoxal-5'-fosfát (PLP). Oproti přirozenému analogu se vzniklý fosfonátový komplex hydrolyticky neodbourává, ale namísto toho se jen silně naváže k enzymu *L*-alanin racemase (isomerasa), čímž působí jako jeho inhibitor.^{11, 12, 13} (**Obr. 5**)



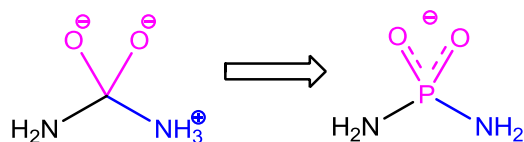
Obr. 4 Alafosfalin (fosfono(di)peptid *L*-Ala-*L*-Ala(P))



Obr. 5 Vznik analogických komplexů PLP-*L*-Ala a PLP-*L*-Ala(P)

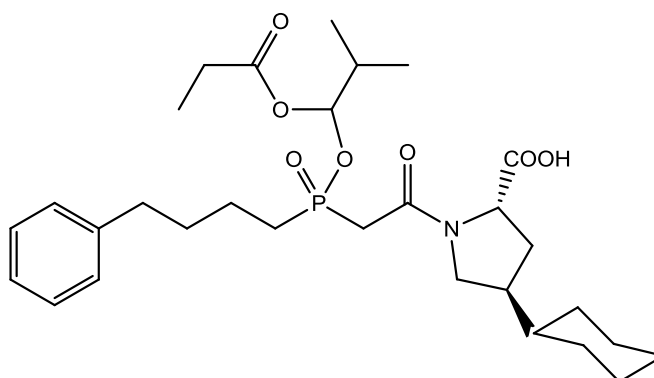
N-C-P struktura se vyskytuje také jako základ inhibitorů ureasy. Ureasa je enzym katalyzující hydrolýzu močoviny na amoniak a karbamát, který se poté spontánně rozloží na druhou molekulu amoniaku a oxid uhličitý.^{14, 15} Aktivita ureasy blíže souvisí hlavně s dvěma typy bakterií způsobujících u člověka těžké infekce: *Helicobacter pylori* (kolonizuje zažívací trakt) a *Proteus* a příbuzné druhy (infikují močové cesty).^{16, 17, 18} Uvolnění amoniaku z močoviny způsobí lokální zvýšení pH. Vyšší pH žaludečních šťáv umožní přežití a pomnožení patogenních bakterií v žaludku. *Helicobacter pylori* je jedním z původců vředových onemocnění. Při infekcích močových cest vede enzymatická alkalizace moči způsobená patogenními bakteriemi k řadě závažných zdravotních důsledků - od prudkého tvoření močových kamenů, přes pyelonefritidu (zánět ledvinných pánviček), až po jaterní

encefalopatii (narušení mozkových funkcí v důsledku selhávání jater). Inhibitory s nejvyšší aktivitou jsou založeny na fosfordiamidech, které napodobují přirozený přechodný stav substrátu během enzymaticky katalyzované reakce (**Obr. 6**).¹⁹ Jejich nevýhodou je však nízká stabilita v kyselém prostředí.²⁰ Proto je snaha je nahradit aminofosfináty s vyšší hydrolytickou stabilitou.²¹ Nejvíce se dosud osvědčila kyselina aminomethyl-methylfosfinová.²²



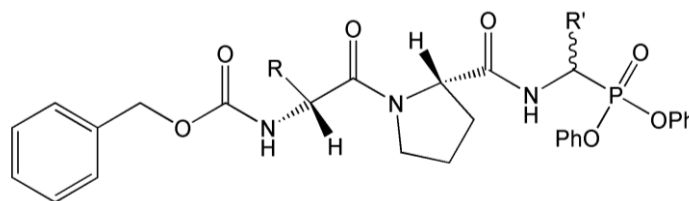
Obr. 6 Podobnost přechodného stavu přirozeného substrátu a fosfordiamidu

Jiné deriváty α -aminofosfonových/fosfinových kyselin se v medicíně používají jako antitrombotika, tj. látky snižující srážlivost krve.²³ V nedávné době se na trhu objevil přípravek fosinopril (komerční název Monopril, **Obr. 7**), který funguje jako inhibitor ACE (angiotensin-konvertující enzym) a používá se k léčbě hypertenze.⁹



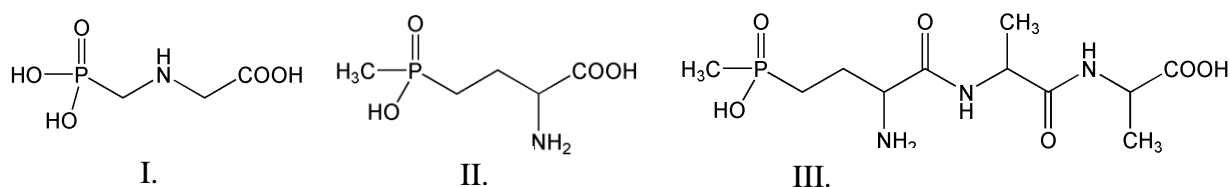
Obr. 7 Monopril (fosinopril)

α -aminoalkylfosfinové kyseliny se ukázaly i jako účinné látky v boji proti onemocnění AIDS.⁵ Inhibitor SB204144 (**Obr. 8**) slouží jako příklad silného inhibitoru HIV proteasy.²⁴



Obr. 8 Inhibitor HIV proteasy SB204144

I mimo medicínské použití našly aminofosfonáty/fosfináty své uplatnění. Celá řada aminofosfonových/fosfinových kyselin a jejich derivátů se dnes komerčně vyrábí jako herbicidy používané v zemědělství. Příklady těchto látek s prokázanými herbicidními a fungicidními účinky, nízkou toxicitou a šetrnému vlivu k životnímu prostředí jsou na **Obr. 9.**^{25, 26, 27}



Obr. 9 Aminofosfonové/fosfinové herbicidy: I. – Glyphosát, II. – Glufosinát, III. – Bialophos

O širokém okruhu využití fosforových derivátů aminokyselin svědčí i fakt, že se motiv α -aminofosfonové kyseliny objevuje i u látek využívaných jako inhibitory koroze.^{28, 29}

1.1.1. ACIDOBAZICKÉ VLASTNOSTI

Jak již bylo řečeno, aminofosfonové/fosfinové kyseliny lze chápat jako formální analogy aminokarboxylových kyselin. Kyselé a bazické funkční skupiny jsou uspořádány podobně jako v molekulách přírodních aminokarboxylových kyselin, čímž je zachována schopnost molekul tvořit specifickou síť vodíkových vazeb. Avšak změnou velikosti, geometrie a náboje molekuly se výrazně pozmění její acidobazické chování a komplexační schopnosti.

Hlavní rozdíly mezi fosfonovou/fosfinovou a karboxylovou skupinou jsou:³⁰

- I. Tvar – zatímco karboxylová skupina je planární (díky sp^2 hybridizaci na atomu uhlíku), kyseliny fosforu zaujímají výhradně tetraedrické prostorové uspořádání.
- II. Velikost – atom fosforu má větší atomový poloměr než atom uhlíku.
- III. Acidita – fosfináty jsou podstatně kyselejší než fosfonáty a karboxyláty. Z hlediska náboje po deprotonaci nese karboxylát a fosfinát po jednom záporném náboji, kdežto fosfonát po dvou.
- IV. Možnost čtvrtého substituentu na atomu fosforu u fosfinátů – přítomností další vhodné alkylové skupiny lze ovlivňovat vlastnosti a chování sloučeniny.

Tab. 2 srovnává hodnoty disociačních konstant aminokarboxylátů a aminofosfonátů/fosfinátů. Je patrné, že hodnota první protonizační konstanty stoupá v pořadí fosfinátová skupina < fosfonátová skupina < karboxylová skupina. Rovněž je ovlivněna i bazicita aminoskupiny; ta roste v pořadí aminofosfinát < aminokarboxylát < aminofosfonát.^{5,30}

Tab. 2 Disociační konstanty aminokarboxylátů a aminofosfonátů/fosfinátů

Sloučenina	Obecný vzorec	pK (-NH ₂)	pK (-kyselá funkce)
α-aminokarboxylová kyselina	RCH(NH ₂)COOH	8,5 – 9,5	2,0 – 3,0
α-aminofosfinová kyselina	RCH(NH ₂)P(O)R'(OH)	8,0 – 9,0	0,5 – 1,5
α-aminofosfonová kyselina	RCH(NH ₂)PO(OH) ₂	9,5 – 10,5	0,5 – 1,5 5,0 – 6,0
α-aminofosfonová kyselina	RCH(NH ₂)CH ₂ P(OH) ₂	10,0 – 11,0	0,5 – 1,5 5,0 – 6,0

Další vliv na acidobazické chování všech těchto molekul má tvorba intramolekulárních vodíkových vazeb mezi kyselou fosfonátovou/fosfinátovou funkcí a dusíkatou skupinou ve zwitteriontových formách, čímž dojde k vytvoření cyklické formy molekuly.³¹

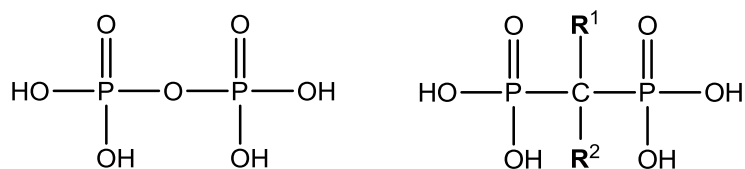
1.1.2. KOORDINAČNÍ VLASTNOSTI

Jeden z hlavních rysů aminofosfonátů/fosfinátů je schopnost vázat atomy kovů.⁵ S ohledem na využití je nejvyšší pozornost věnována koordinaci biologicky aktivních přechodných kovů.^{32, 33} Díky dostupnosti atomů kyslíku i dusíku v molekule ligandu můžeme pozorovat různé způsoby koordinace. U α -aminofosfonátů/fosfinátů převládá vznik bidentátních chelátů (-N, -O), které tvoří s iontem kovu termodynamicky nejstabilnější pětičlenné kruhy. V kyselém prostředí byl u aminofosfonátů pomocí NMR spektroskopie pozorován vznik rovnováhy mezi bidentátním a monodentátním chováním ligandů (část iontů kovů je koordinována pouze k jednomu deprotonovanému atomu kyslíku fosfonátové skupiny; aminoskupina se nalézá ve formě NH₃⁺).⁵

Termodynamická stabilita komplexů obecně vzrůstá s bazicitou donorových aminoskupin. Proto jejich konstanty stability vzrůstají v pořadí: aminofosfináty < aminokarboxyláty ≤ aminofosfonáty.³⁴

1.2. BISFOSFONÁTY/FOSFINÁTY

K nejméně studovaným bisfosfonátům patří geminální bis(fosfonáty) (dále jen bis(fosfonáty)) s obecným vzorcem $R^1R^2C(PO_3H_2)_2$, které jsou formální analoga pyrofosfátu (**Obr. 10**). Vazba P–O–P je nahrazena vazbou P–C–P, která umožňuje širokou modifikaci vlastností bis(fosfonátů) funkcionalizací zbylých dvou poloh na atomu α uhlíku. Díky krátké vzdálenosti obou fosfonových skupin vykazují geminální bis(fosfonáty) řadu specifických chemických a fyzikálních vlastností, jako je tvorba termodynamicky stabilních komplexů či vysoká afinita k povrchům anorganických materiálů (např. hydroxyapatitu, uhličitanu vápenatému a oxidu titaničitému).^{35, 36}



Obr. 10 Pyrofosfát a geminální bis(fosfonát)

Bis(fosfonáty) jsou na rozdíl od pyrofosfátu metabolicky stabilní. V klinické praxi jsou používány především jako antiresorpční látky pro léčbu kostních onemocnění.³⁷ Váží se do míst růstu a patologických změn kostí.³⁵ Jejich předností je vysoce selektivní a dlouhodobé působení a minimální vedlejší účinky.³⁸ Po aplikaci a průchodu krevním řečištěm jsou bis(fosfonáty) adsorbovány zejména na povrch hydroxyapatitu, což je hlavní složka kostní tkáně.³⁹ Adsorbované bis(fosfonáty) brání rozpouštění hydroxyapatitu a dále tak ovlivňují funkci všech kostních buněk, které jsou odpovědné za růst a degradaci kostí, čímž chrání povrch kostí. Substituenty na α uhlíkovém atomu mohou specificky interagovat s buněčnými membránovými receptory nebo s enzymy uvnitř buňky a výrazně tak ovlivňovat probíhající biologické pochody.⁴⁰ Na buněčné úrovni působí bis(fosfonáty) na osteoklasty (buňky zodpovědné za resorpci kostní tkáně).^{36, 41} Inhibují jejich tvorbu, aktivitu a soudržnost s kostní matricí a zkracují jejich dobu života.^{42, 43}

Podle působení na osteoklasty můžeme bis(fosfonáty) rozdělit do dvou hlavních skupin: ^{44, 45, 46}

1. Bis(fosfonáty) obsahující v postranním řetězci atom dusíku – inhibují farnesyl-difosfát syntasu v metabolickém cyklu kyseliny mevalonové. To způsobí nejprve poruchy v působení buněk následované jejich cílenou smrtí (apoptosou).

2. Bis(fosfonáty) bez atomu dusíku v postranním řetězci – obvykle jsou v buňkách metabolizovány na methylenbis(fosfonátová) analoga ATP. Jelikož obsahují nehydrolyzovatelnou P–C–P vazbu, metabolity se hromadí v buňkách, což má za následek rovněž apoptosu.

Další významnou aplikací bis(fosfonátů) jsou využití jejich komplexů s radionuklidy využívané zejména pro kostní diagnózy (^{99m}Tc, SPECT) a terapii nebo paliaci kostních metastáz (¹⁸⁶Re).⁴⁷ I další řada onemocnění způsobuje abnormální kalcifikace měkkých tkání, které pak mohou být zobrazovány díky specifické adsorpci komplexů bis(fosfonátů) s radionuklidy.⁴⁸ Jsou to například kalcifikace při rakovině prsu,⁴⁹ cirhóze jater,⁵⁰ či po prodělané mozkové mrtvici⁵¹ nebo infarktu myokardu.⁵²

V současnosti se studují bis(fosfonáty) především jako specifické nosiče léčiv. Jednoduché bis(fosfonáty) tvoří základní stavební kameny (building-blocks), které se snadno konjugují s biomolekulami (např. peptidy). Léčivo je pak kovalentně vázáno na polymerní nosič obsahující bis(fosfonáty), čímž lze i jinak nespecifickou látku selektivně dopravit a vázat na kostní tkáň.⁵³

1.2.1. ACIDOBAZICKÉ VLASTNOSTI

Silná interakce mezi oběma fosfonovými kyselinami zvyšuje bazicitu celé molekuly. Samotná kyselina fosfonová má dva disociační stupně charakterizované disociačními konstantami $pK_1 \leq 2$ a $pK_2 = 5 - 6$. Kdežto kyselina bis(fosfonová) vykazuje dva disociační stupně v kyselém prostředí, jeden v neutrálním prostředí a jeden v silně bazickém prostředí. Významný vliv na acidobazické chování molekuly mají substituenty na můstkovém atomu uhlíku (**Tab. 3**).⁵⁴ Přítomnost aminoskupiny v postranním řetězci představuje další silně bazické protonizační místo, které snižuje hodnoty disociačních konstant vlastní bis(fosfonové) skupiny.

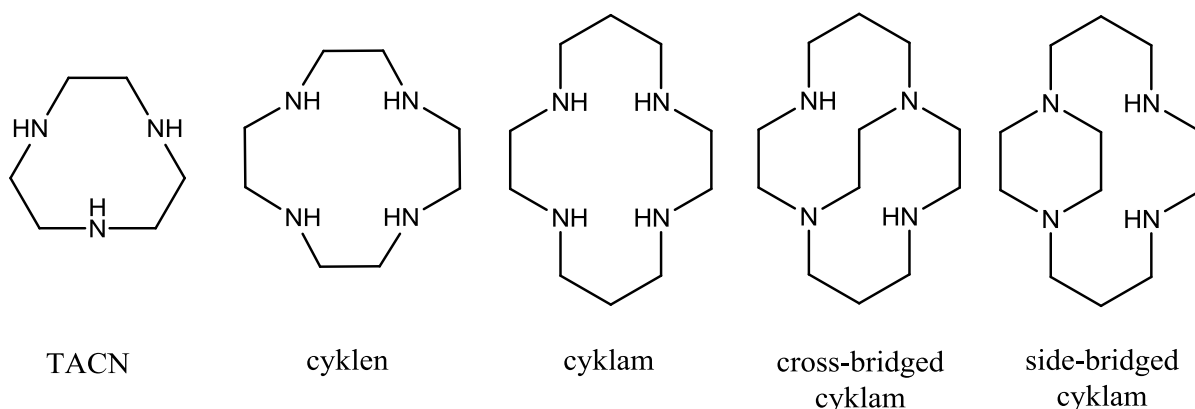
Tab. 3 Disociační konstanty vybraných bis(fosfonátů) obecného vzorce $\mathbf{R}^1\mathbf{R}^2\mathbf{C}(\text{PO}_3\text{H}_2)_2$

	H₄mdp	H₄hedp	H₄meth	H₄pam	H₄ale
R¹	–H	–OH	–H	–OH	–OH
R²	–H	–CH ₃	–NH ₂	–(CH ₂) ₂ NH ₂	–(CH ₂) ₃ NH ₂
pK₁	1,6	1,7	< 1	< 1	< 1
pK₂	2,77	2,6	1,4	2,55	2,72
pK₃	6,83	6,88	5,18	5,83	8,73
pK₄	10,2	10,90	8,85	9,9	10,5
pK₅	–	–	11,03	10,8	11,6

1.3. MAKROCYKLICKÉ POLYAMINOFOSFONÁTY / FOSFINÁTY

Specifickým příkladem sloučenin obsahujících N–C–P uskupení jsou makrocyklické polyaminofosfonáty/fosfináty. Tyto látky jsou schopné pevně vázat ionty vhodných přechodných kovů a lanthanoidů. Vzniklé komplexy bývají termodynamicky dostatečně stálé a kineticky inertní, a proto jsou zkoumány kvůli možnému medicínskému využití jako kontrastní látky pro molekulární zobrazovací metody jako MRI (Magnetická rezonanční tomografie; *Magnetic Resonance Imaging*), PET (Pozitronová emisní tomografie; *Positron Emission Tomography*), SPECT (jednofotonové emisní tomografii; *Single-Photon Emission Computed Tomography*), či cílenou radioterapii. Používané ionty kovů by byly v těle ve volné formě vysoce toxické. Tvorba stabilních komplexů zabraňuje riziku intoxikace pacienta. Pro radioterapii a radiodiagnostiku se používají komplexy radionuklidů kovů ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y (β^+ zářiče)⁵⁵ a ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{131}I , ^{201}Tl (γ zářiče),⁵⁶ kdežto tomografie magnetické rezonance používá paramagnetické ionty kovů (hlavně Gd^{3+}).⁵⁷

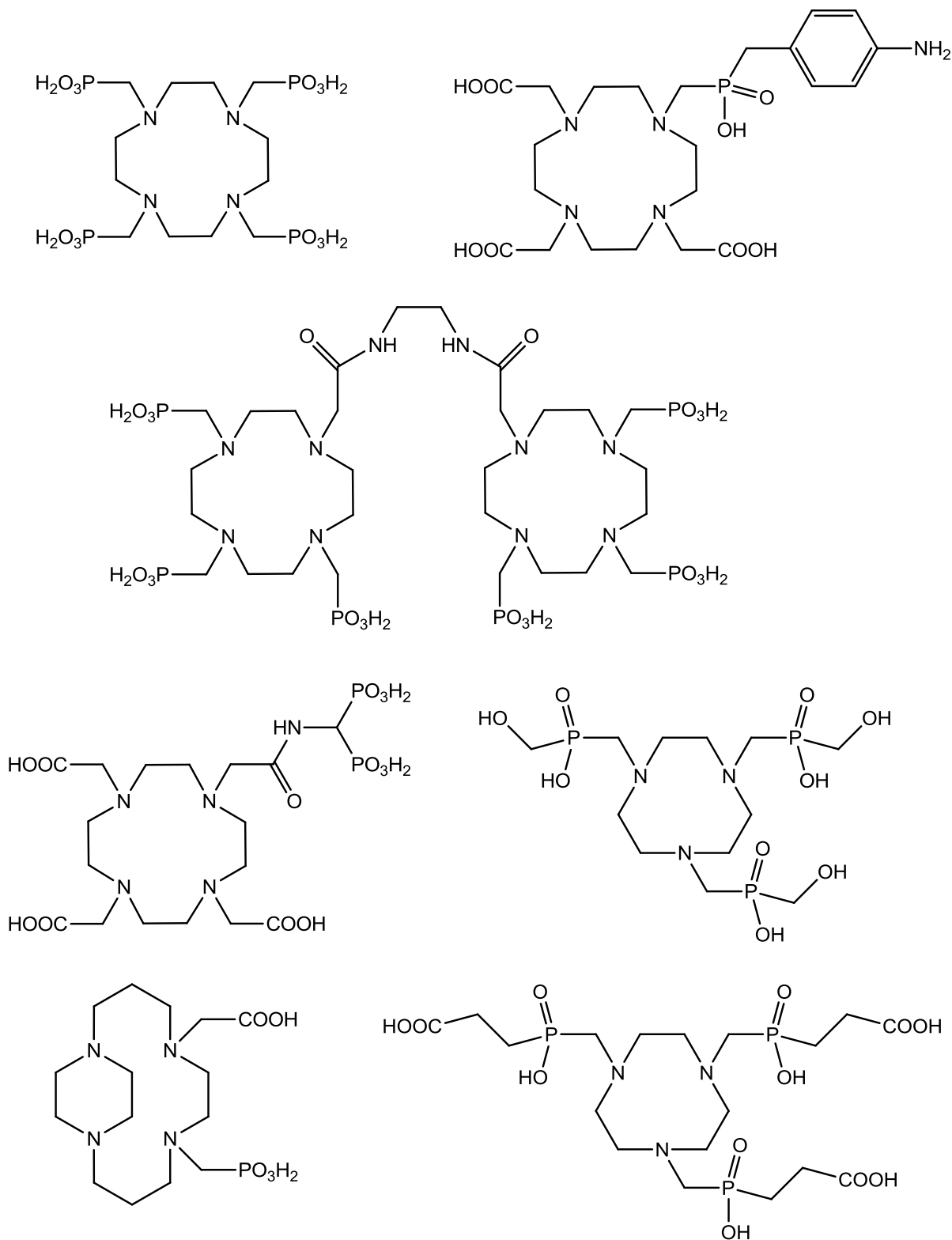
Základ používaných chelatantů tvoří polyazamakrocyklický kruh. Mezi nejpoužívanější skelety se řadí 1,4,7-triazacyklononan (TACN), 1,4,7,10-tetraazacyklododekan (cyklen), 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan (cyklam) a jeho varianty s různými typy přemostěním (cross-bridged cyklam, side-bridge cyklam). (**Obr. 11**)



Obr. 11. Nejběžnější skelety polyazamakrocyklů

Velikost makrocyklu, počet atomů dusíku a jejich bazicita, druhy a množství navázaných postranních skupin ovlivňují kinetickou a termodynamickou stabilitu vznikajících komplexů. Nesubstituované polyazamakrocykly se vyznačují nízkou rychlostí komplexace. Komplexaci lze urychlit navázáním tzv. pendantního ramene na volnou dusíkatou skupinu skeletu. Pendantní ramena jsou tvořena nejčastěji acetátovými skupinami, nověji

fosfonátovými či fosfinátovými deriváty.^{58, 59} **Obr. 12** představuje příklady některých nověji připravených makrocyklických polyaminofosfonátů/fosfinátů s vhodnými vlastnostmi pro medicínské použití.^{60 – 65}



Obr. 12 Makrocyklické polyaminofosfonáty/fosfináty pro medicínské použití

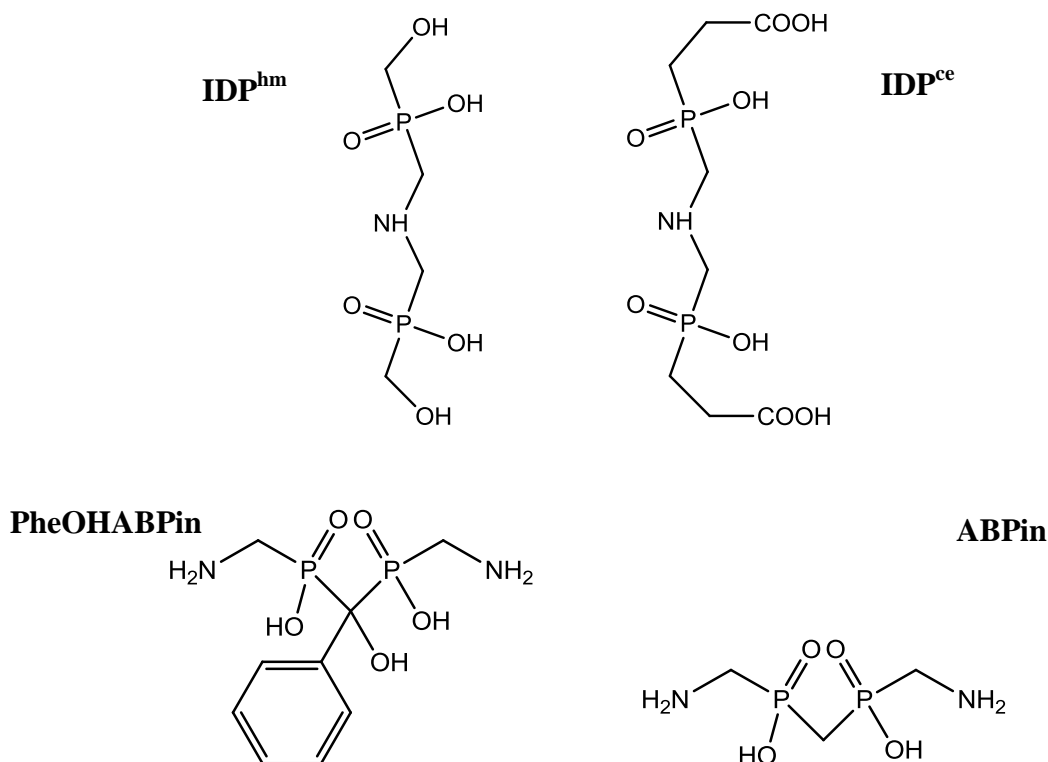
1.4. CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce se zaměřuje na přípravu a charakterizaci nových typů α -aminofosfinátů, a to vybraných aminodifosfinových kyselin a bis(fosfinátů). (**Obr. 13**)

Z aminodifosfinových kyselin se jedná o fosfinové analogy kyseliny iminodioctové (IDA) – kyselinu aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinovou) (**IDP^{hm}**) a kyselinu aminobis(methyl(2-karboxyethyl)fosfinovou) (**IDP^{ce}**). Skupinu bis(fosfinátů) zastupuje bis(aminomethylfosfinát) – kyselina (hydroxy(fenyl)methylen)bis(aminomethylfosfinová) (**PheOHABPin**).

Dále byly studovány acidobazické a koordinační vlastnosti připravených látek a dalšího nově připraveného bis(aminomethylfosfinátu) – kyseliny (metylen)bis(aminomethylfosfinové) (**ABPin**) pomocí potenciometrických a NMR titrací.

Uvedené strukturně jednoduché látky rozšiřují skupinu modelových sloučenin s N–C–P uskupením. Získaná data mají doplnit a obohatit již publikované informace o α -aminofosfinátech. Především jde o vliv fosfinátové skupiny na hodnotu bazicity atomu dusíku, která určuje stabilitu komplexů.



Obr. 13 Látky zkoumané v rámci diplomové práce

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Pro syntézu byly použity chemikálie z komerčních zdrojů (Aldrich, Fluka, Lach-Ner, Lachema, Lind).

Deionizovaná voda byla získána reverzní osmózou na PřF UK.

Kyselina (3-*tert*-butoxy-3-oxopropyl)fosfinová byla připravena podle postupu uvedeného v literatuře.^{62, 66}

2.2. METODY CHARAKTERIZACE

SPEKTROSKOPIE NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÉ REZONANCE (NMR)

¹H a ³¹P NMR spektra byla měřena na spektrometrech Varian VNMRS 300 (rezonanční frekvence: ¹H 299,94 MHz, ¹³C 75,4 MHz a ³¹P 121,4 MHz) a Varian UNITY INOVA 400 (rezonanční frekvence: ¹H 399,94 MHz, ¹³C 100,6 MHz a ³¹P 161,9 MHz) na PřF UK. Pro měření byly použity 5 mm NMR kyvety. Teplota měření byla 25°C. ¹H NMR spektra byla měřena v čistých deuterovaných rozpouštědlech (CDCl₃, D₂O, DMSO).

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 se zdrojem iontů získaných metodou ESI (Electrospray Ionization) a detekcí pomocí IT (Ion Trap). Spektra byla měřena v pozitivním (+) i negativním (-) módu. Dále jsou uvedeny pouze intenzivní signály, které se podařilo interpretovat.

TENKOVSTVÁ CHROMATOGRRAFIE (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě byly prováděny na hliníkových destičkách s vrstvou silikagelu impregnovaných fluorescenčním barvivem (Merck 1,0554 F₂₅₄). Jako mobilní fáze byly používány směsi EtOH a NH₄OH v různých poměrech.

Metody detekce: ninhydrin (0,5% roztoku ninhydrinu v EtOH), jód, UV-lampa ($\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 366 \text{ nm}$).

RENTGENOVÁ STRUKTURNÍ ANALÝZA (RTG)

Difrakční data byla získána přístrojem NONIUS KAPPA CCD se zářením Mo-K α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) při teplotě 150 K (chlazení Cryostream Cooler, Oxford Cryosystem) pomocí programu HKL DENZO.⁶⁷ Struktura byla řešena pomocí programu SIR92 (cit. ⁶⁸) a vypřesněna s použitím programu SHELXL97.⁶⁹ Vizualizace byla provedena použitím programu PLATON.

ELEMENTÁRNÍ ANALÝZA (EA)

Elementární analýza (C, H, N) byla provedena servisním pracovištěm Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR. Procentuální zastoupení prvků bylo zjištěno automatickým analyzátozem Perkin Elmer 2400. Výsledky (v hmotnostních procentech) jsou uváděny jako aritmetický průměr všech měření s přesností na jedno desetinné místo ve formátu nalezeno (vypočteno).

POTENCIOMETRICKÉ TITRACE

Titrace byly prováděny v potenciometrické cele termostatované na $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ při iontové síle $I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ M}$ resp. $I(\text{KNO}_3) = 0,1 \text{ M}$ v rozmezí pH cca 1,5 – 12 (nebo dokud se nezačaly srážet hydroxidy kovů). Inertní atmosféra během titrací byla zajištěna konstantním přívodem proudu argonu nad hladinu titrovaného roztoku. Počáteční objem titrovaného roztoku byl ~5 ml, koncentrace ligandu ~0,004 M a poměr ligand:kov 1:1 a 2:1. Jako titrační roztoky byly použity NMe_4OH resp. KOH o koncentraci ~0,2 M přesně. Potenciál byl měřen kombinovanou skleněnou argentchloridovou elektrodou GK 240B na pH metru PHM 240. Titrační roztok byl přidáván automatickou byretou 2 ml ABU 900. Každá titrace byla opakována třikrát až čtyřikrát. Počet experimentálních bodů v jedné titraci se pohyboval mezi 40 a 60. Z naměřených dat byly pomocí programu OPIUM (cit. ⁷⁰) získány protonizační konstanty ligandu a konstanty stability systémů ligand:kov. Program používá k proložení experimentálních bodů křivkou funkci nelineární regrese s metodou nejmenších čtverců. Hodnoty parametrů elektrody byly získány z kalibrační titrace použitím kalibrační funkce

$$E = E_0 + S \cdot \log[\text{H}^+] + J_A \cdot [\text{H}^+] + J_B \cdot K_w / [\text{H}^+],$$

kde E_0 je standardní elektrodový potenciál, S je Nernstovská směrnice, J_A a J_B koeficienty popisující kyselou a zásaditou chybu elektrody a K_w je iontový součin vody.

Protože hodnoty kalibračních parametrů elektrody se v čase mění, byla prováděna kalibrační titrace vždy před i po každé titraci.

Z titrací byly programem určeny celkové rovnovážné konstanty stability β . Protonizační konstanta je definována vztahem $\beta_{hl} = [\text{H}_h\text{L}_l] / [\text{H}]^h \cdot [\text{L}]^l$ a konstanta stability vztahem $\beta_{mhl} = [\text{M}_m\text{H}_h\text{L}_l] / [\text{M}]^m \cdot [\text{H}]^h \cdot [\text{L}]^l$ (pro přehlednost nejsou uváděny náboje jednotlivých částic). Vztah mezi celkovou konstantou β a konsektivní konstantou pK_a je pak obecně definován jako $pK_n = \log\beta_n - \log\beta_{(n-1)}$.

Hodnoty iontového součinu vody ($pK_w = 13,81$ pro $I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ M}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $pK_w = 13,78$ pro $I(\text{KNO}_3) = 0,1 \text{ M}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$) a konstanty stability systémů $\text{M}^{2+}-\text{OH}^-$ byly převzaty z literatury.⁷¹

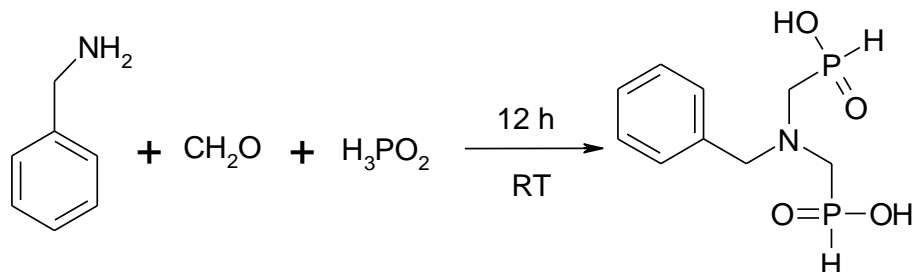
Jedna z titrovaných látek – kyselina (methylen)bis(aminomethylfosfinová) (**ABPin**) – byla připravena a dodána Mgr. Tomášem Davidem.

NMR TITRACE

Měření ^1H a $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spekter v závislosti na pH (od 5M HCl do srážení hydroxidů kovu) bylo provedeno při koncentraci ligandu $\sim 0,1 \text{ M}$ za absence nebo přítomnosti ZnSO_4 (poměr ligand : Zn^{2+} byl 1,1 : 1). Měření probíhalo při $25 \text{ }^\circ\text{C}$. pH vzorků bylo upravováno pomocí zředěných vodných roztoků KOH a HCl. Jako vnější standard byla použita D_2O obsahující 1% *t*-BuOH a 15% H_3PO_4 . Signál vody v ^1H NMR byl presaturován.

2.3. SYNTÉZA

I. KYSELINA *N*-BENZYL-AMINOBIS(METHYLFOSFINOVÁ)



Do 250ml baňky bylo naváženo 26,39 g (200 mmol) 50% aq. roztoku H₃PO₂ a 16,78 g (201 mmol) 36% aq. roztoku CH₂O. K míchané směsi bylo za chlazení v lázni voda/led pozvolna přidáno injekční stříkačkou 10,98 g (102 mmol) benzylaminu. Baňka byla uzavřena plastovou zátkou a reakční směs byla při laboratorní teplotě míchána 24 hodin. Tvorba produktu byla sledována pomocí ³¹P NMR. Reakční směs byla odpařena na rotační vakuové odparce při 50 °C vodní lázně (při nastavení vyšší teploty lázně hrozí oxidace P–H vazby) na hustý čirý olej. Tento olej byl rozpuštěn ve 100 ml methanolu. Přes noc se z roztoku vyloučila jemná bílá sraženina, která byla odsáta na fritě S2. Surový produkt byl suspendován v 60 ml methanolu. Suspenze byla míchána 2 hodiny. Následně byla sraženina odsáta na fritě S2 a promyta malým množstvím methanolu. Produkt ve formě jemné bílé krystalické sraženiny byl vysušen ve vakuovém exsikátoru nad P₄O₁₀.

Výtěžek: 12,01 g (tj. 45 %).

Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 3,48 (d, 4H, P–CH₂, ²J_{PH} = 10,6 Hz); δ 4,67 (s, 2H, CH₂–C₆H₅); δ 7,17 (d, 2H, P–H, ¹J_{PH} = 558 Hz); δ 7,56 (m, 5H, CH₂–C₆H₅)

¹³C {¹H} δ 55,1 (dd, 2C, P–CH₂, ¹J_{CP} = 79,7 Hz, ³J_{CP} = 3,6 Hz); δ 62,9 (s, 1C, CH₂–C₆H₅); δ 130,1 (s, CH₂–C₆H₅); δ 131,1 (s, CH₂–C₆H₅); δ 132,2 (s, CH₂–C₆H₅); δ 133,2 (s, CH₂–C₆H₅)

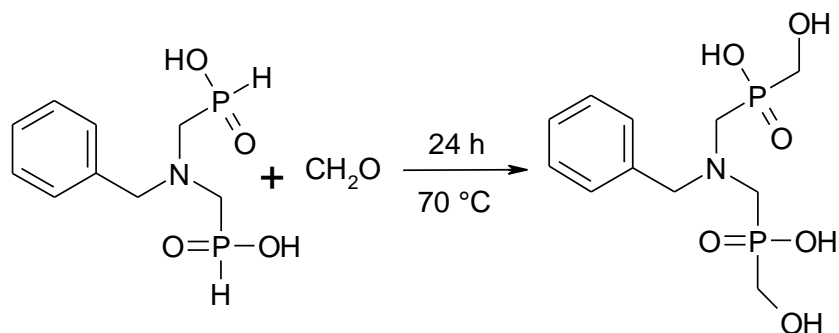
³¹P {¹H} δ 13,6 (s)

³¹P δ 13,5 (dt, ¹J_{PH} = 558 Hz, ²J_{PH} = 10,7 Hz)

MS (ESI): (–) 261,6 (M–H⁺)[–], vypočteno 262,0; (+) 301,7 (M+K⁺)⁺, vypočteno 302,0

EA (C₉H₁₅NO₄P₂·0,75 H₂O, M_r = 276,7): C 39,0 % (39,1 %), H 5,8 % (6,0 %), N 5,0 % (5,1 %)

II. KYSELINA *N*-BENZYL-AMINOBIS(METHYL(HYDROXYMETHYL)FOSFINOVÁ)



V 250ml baňce bylo v 50 ml 6M HCl rozpuštěno 5,0 g (19 mmol) kyseliny *N*-benzylaminobis(methylfosfinové) a k roztoku bylo přidáno 7,92 g (95 mmol, 5 ekv.) 36% aq. roztoku CH₂O. Baňka byla uzavřena plastovou zátkou a reakční směs byla při teplotě 70 °C míchána 24 hodin. Konverze byla sledována pomocí ³¹P NMR. Následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce na hustý čirý olej. Tento olej byl rozpuštěn ve vodě a roztok byl znova odpařen. Odpařování s vodou bylo zopakováno ještě třikrát kvůli odstranění polymerů formaldehydu. Produkt byl získán jako nažloutlý olej.

Výtěžek: 6,14 g (tj. 100 %).

Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 3,48 (d, 4H, P-CH₂, ²J_{PH} = 8,7 Hz); δ 3,80 (d, 4H, P-CH₂, ²J_{PH} = 6,6 Hz); δ 4,73 (s, 2H, CH₂-C₆H₅); δ 7,56 (m, 5H, CH₂-C₆H₅)

¹³C {¹H} δ 65,6 (dd, 2C, P-CH₂, ¹J_{CP} = 82,0 Hz; ³J_{CP} = 3,3 Hz); δ 73,9 (d, 2C, P-CH₂, ¹J_{CP} = 118 Hz); δ 75,2 (s, 1C, CH₂-C₆H₅); δ 142,4 (s, CH₂-C₆H₅); δ 142,9 (s, CH₂-C₆H₅); δ 143,9 (s, CH₂-C₆H₅); δ 144,7 (s, CH₂-C₆H₅)

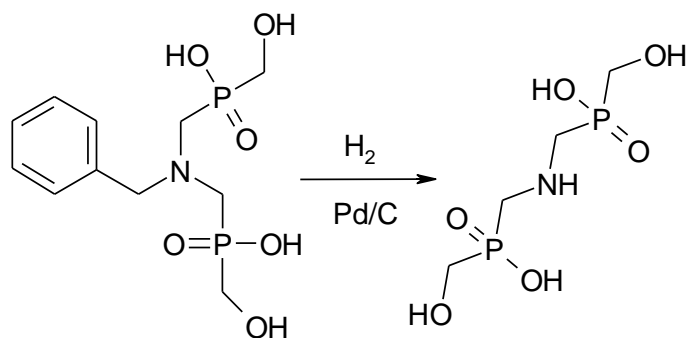
³¹P {¹H} δ 28,6 (s)

³¹P δ 28,5 (m)

MS (ESI): (-) 321,6 (M-H⁺)⁻, vypočteno 322,0

EA (C₁₁H₁₉NO₆P₂·0,5 HCl, M_r = 341,4): C 38,6 % (38,7 %), H 5,7 % (5,8 %), N 3,9 % (4,1 %)

III. KYSELINA AMINOBIS(METHYL(HYDROXYMETHYL)FOSFINOVÁ) – IDP^{HM}



2,06 g kyseliny *N*-benzyl-aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinové) bylo rozpuštěno v 20 ml vody a 20 ml EtOH. K roztoku bylo přidáno 200 mg palladia na aktivním uhlí (10% Pd/C). Směs byla hydrogenována plynným H₂ po dobu 48 h (pod balónkem) při RT. Poté byla zfiltrována přes filtrační papír. Filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Získaný olej byl lyofilizován. Pevný lyofilizát byl uchováván ve vakuovém exsikátoru nad P₄O₁₀.

Výtěžek: 1,32 g (tj. 89 %).

Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 3,29 (d, 4H, P–CH₂, ²J_{PH} = 9,6 Hz); δ 3,77 (d, 4H, P–CH₂, ²J_{PH} = 6,4 Hz)

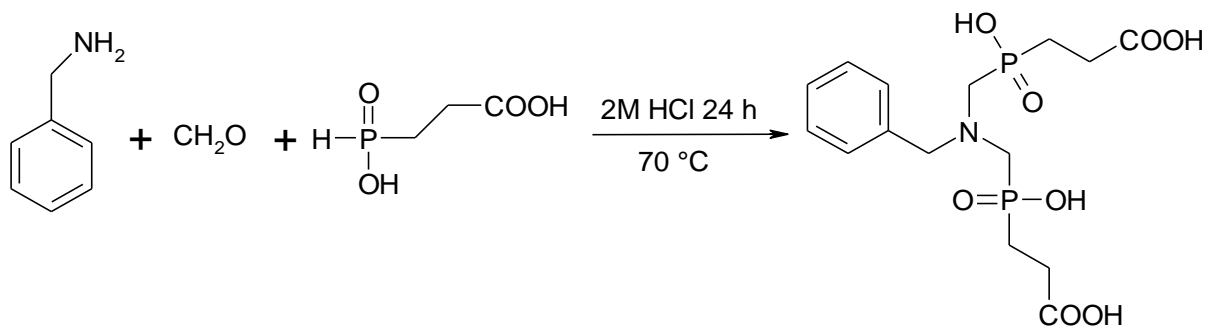
¹³C {¹H} δ 48,8 (d, 2C, P–CH₂, ¹J_{CP} = 86,7 Hz); δ 62,5 (d, 2C, P–CH₂, ¹J_{CP} = 117 Hz)

³¹P {¹H} δ 28,6 (s)

MS (ESI): (–) 231,5 (M–H⁺)[–], vypočteno 232,0; 201,5 (M–CH₂OH⁺)[–], vypočteno 202

EA (C₄H₁₃NO₆P₂·H₂O, M_r = 251,1): C 18,6 % (19,1 %), H 5,7 % (6,0 %), N 5,4 % (5,6 %)

IV. KYSELINA *N*-BENZYL-AMINOBIS(METHYL(2-KARBOXYETHYL)FOSFINOVÁ)



5,43 g (28,0 mmol) kyseliny (3-*tert*-butoxy-3-oxopropyl)fosfinové bylo přes noc refluxováno se 250 ml 6M HCl. Směs byla odpařena na rotační vakuové odparce na hustý čirý olej, který byl rozpuštěn v 60 ml vody a 20 ml 6M HCl. K roztoku bylo přidáno 4,68 g (55,8 mmol, 8 ekv.) 36% aq. roztoku CH₂O a 0,75 g (6,9 mmol) benzylaminu. Baňka byla uzavřena plastovou zátkou a reakční směs byla při teplotě 70 °C míchána 24 hodin. Konverze byla sledována pomocí ³¹P NMR. Následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce na hustý čirý olej. Tento olej byl rozpuštěn ve vodě a roztok byl znovu odpařen. Odpařování s vodou bylo zopakováno ještě třikrát kvůli odstranění polymerů formaldehydu. Vzniklý olej byl přečištěn sloupcovou chromatografií na slabém kationtovém iontoměničči (AMBERLITE CG-50, H⁺-cyklus, objem kolony cca 300 ml). Byla použita gradientová eluce, kde se mobilní fáze měnila po 200 ml v pořadí voda, 10% aq. roztok EtOH, 20% aq. roztok EtOH, 50% aq. roztok EtOH, čistý EtOH. Nečistoty vytekly spolu s vodou; produkt se eluoval 10% a 20% a 50 % aq. roztokem EtOH. Eluce byla sledována pomocí TLC a ³¹P NMR. Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny na rotační vakuové odparce na hustý nažloutlý olej, který po čase začal krystalizovat.

Výtěžek: 2,42 g (tj. 86 %).

Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 1,93 (m, 4H, P-CH₂-CH₂); δ 2,52 (m, 4H, P-CH₂-CH₂); δ 3,55 (d, 4H, P-CH₂, ²J_{PH} = 8,1 Hz); δ 4,70 (s, 2H, CH₂-C₆H₅); δ 7,59 (m, 5H, CH₂-C₆H₅)
¹³C {¹H} δ 27,5 (d, 2C, P-CH₂, ¹J_{CP} = 162 Hz); δ 30,1 (s, 2C, P-CH₂-CH₂); δ 52,7 (d, 2C, P-CH₂, ¹J_{CP} = 182 Hz); δ 73,4 (s, 1C, CH₂-C₆H₅); δ 138,5 (s, CH₂-C₆H₅); δ 139,1 (s, CH₂-C₆H₅); δ 139,9 (s, CH₂-C₆H₅); δ 141,0 (s, CH₂-C₆H₅); δ 176,6 (s, 2C, CH₂-COOH)

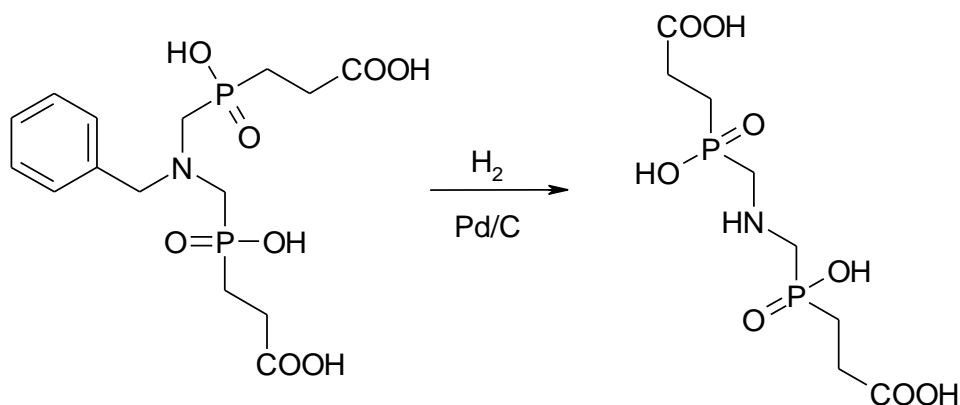
³¹P {¹H} δ 29,7 (s)

MS (ESI): (-) 405,7 (M-H⁺)⁻, vypočteno 406,0; 387,7 (M-H₂O-H⁺)⁻, vypočteno 388

TLC (EtOH-NH₄OH 5:1): R_f = 0,2

EA (C₈H₁₇NO₈P₂·0,5HCl, M_r = 335,4): C 28,8 % (28,7 %), H 5,2 % (5,4 %), N 4,1 % (4,2 %)

V. KYSELINA AMINOBIS(METHYL(2-KARBOXYETHYL)FOSFINOVÁ) – IDP^{CE}



2,42 g (5,94 mmol) benzylamin bis(karboxyethylfosfinátu) bylo rozpuštěno v 100 ml vody. K roztoku bylo přidáno 240 mg palladia na aktivním uhlí (10% Pd/C). Směs byla hydrogenována plynným H₂ po dobu 48 h (pod balónkem) při RT. Poté byla zfiltrována přes filtrační papír. Filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v malém množství deionizované vody. Roztok byl ponechán volně odpařovat. Produkt po několika dnech vykrytalizoval v podobě bílých krystalů.

Výtěžek: 1,71 g (tj. 91 %).

Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 2,05 (m, 4H, P-CH₂-CH₂); δ 2,66 (m, 4H, P-CH₂-CH₂); δ 3,58 (d, 4H, P-CH₂, ²J_{PH} = 11,7 Hz)

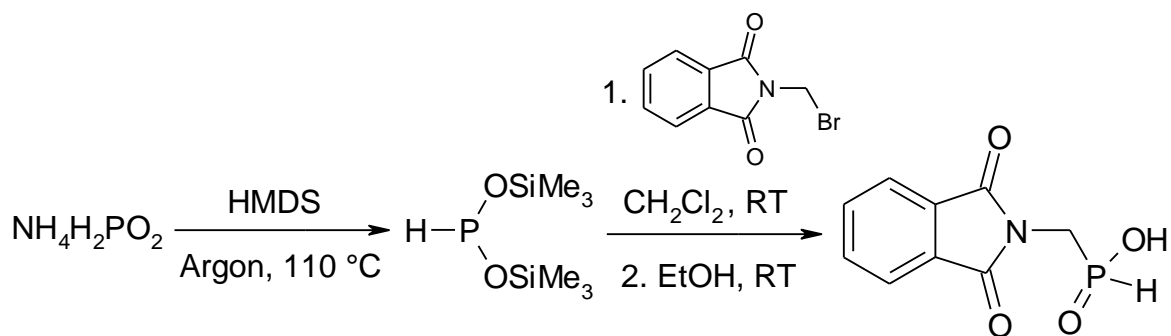
¹³C {¹H} δ 24,4 (d, 2C, P-CH₂, ¹J_{CP} = 160 Hz); δ 26,3 (s, 2C, P-CH₂-CH₂); δ 46,9 (d, 2C, P-CH₂, ¹J_{CP} = 181 Hz); δ 176,6 (s, 2C, CH₂-COOH)

³¹P {¹H} δ 31,4(s)

MS (ESI): (-) 315,6 (M-H⁺)⁻, vypočteno 316; 297,6 (M-H₂O-H⁺)⁻, vypočteno 298; 279,6 (M-2H₂O-H⁺)⁻, vypočteno 280

EA (C₈H₁₇NO₈P₂·0,5HCl, M_r = 335,4): C 28,8 % (28,7 %), H 5,2 % (5,4 %), N 4,1 % (4,2 %)

VI. KYSELINA *N*-FTALIMIDOMETHYLFOSFINOVÁ



Do 1000 ml trojhrdlé baňky bylo naváženo 20 g (240,8 mmol) rekrystalizovaného fosforanu amonného. Baňka byla opatřena magnetickým míchadlem, zaváděcí trubičkou s kohoutem (na přívod argonu), chladičem, na nějž byla nasazena další trubička s kohoutem (napojena na membránovou vývěvu – zdroj vakua) a zátkou (do posledního hrdla; sloužila jako ventil při sekuraci). Aparatura byla sekurována (3x evakuována a následně naplněna argonem). Poté byla zaváděcí trubička na chladiči vyměněna za bublačku a zátky za gumové septum (vše v protiproudu argonu). Přes septum bylo pomocí injekční stříkačky s jehlou přidáno 100 ml (508 mmol) hexamethyldisilazanu. Proud argonu byl ztlumen tak, aby bublačkou procházela cca 1 bublinka za 2 s. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána přes noc v olejové lázni o teplotě $100 - 110\text{ }^\circ\text{C}$. Po ukončení reakce byl zesílen proud argonu a celá aparatura byla vyjmuta z olejové lázně a ponechána vychladnout na laboratorní teplotu. K reakční směsi bylo přes septum přidáno injekční stříkačkou 200 ml suchého dichlormethanu.

Za stálého míchání byla přes septum přidána pomocí silné jehly suspence 15 g (62,5 mmol) brommethylftalimidu v 300 ml suchého dichlormethanu. Reakční směs byla míchána 12 hodin pod mírným proudem argonu. Poté byl zvýšen proud argonu a reakční směs byla převedena pomocí kanyly do baňky obsahující 600 ml ethanolu. Reakční baňka byla vymyta dalšími 50 ml ethanolu a obě ethanolové frakce byly spojeny. Vzniklá suspence byla odpařena na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn za varu ve 150 ml 1% HCl. Malé množství nerozpuštěného materiálu bylo odsáto za horka na fritě. Filtrát byl ponechán ochladit do druhého dne. Vyloučený pevný produkt byl odfiltrován na fritě a sušen prosáváním vzduchu. Dále byl rozpouštěn za varu ve vodě až na čirý roztok (asi 350 ml). Horký roztok byl ponechán ochladit a do druhého dne se z něj vyloučila bílá sraženina, která byla odfiltrována na fritě (1. frakce). Filtrát byl odpařen dosucha na rotační vakuové odparce a rekrystalován z minimálního množství horké vody (2. frakce). Po filtraci pevné látky byl

filtrát znovu odpařen a ještě jednou rekrystalizován stejným způsobem (3. frakce). Druhá a třetí frakce byly spojeny a dosušeny v exsikátoru nad P_4O_{10} .

Výtěžek: 10,75 g (tj. 75 %).

Charakterizace:

NMR (DMSO): 1H δ 3,86 (dd, 2H, P- CH_2 , $^2J_{PH} = 9,9$ Hz, $^3J_{HH} = 2,1$ Hz); δ 7,18 (dt, 1H, P-H, $^1J_{PH} = 558,3$ Hz, $^3J_{HH} = 2,1$ Hz); δ 7,88 (m, 4H, arom.)

^{13}C δ 38,0 (d, P- CH_2 , $^2J_{CP} = 98,0$ Hz); δ 123,4 (s, arom.); δ 131,5 (s, arom.); δ 134,8 (s, arom.); δ 167,3 (s, 4C, C=O)

^{31}P δ 17,6 (dt, $^1J_{PH} = 558,1$ Hz, $^2J_{PH} = 10,0$ Hz)

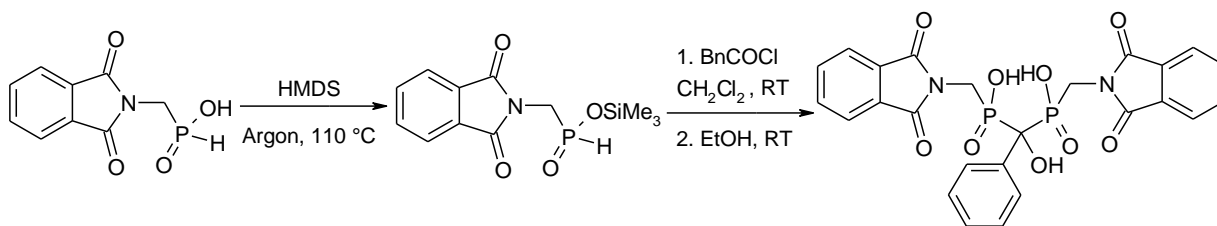
$^{31}P\{^1H\}$ δ 17,6 (s)

MS (ESI): (-) 223,5 (M-H⁺)⁻, vypočteno 224,1

TLC (EtOH-NH₄OH 1:1): $R_f = 0,8$

EA (C₉H₈NO₄P, $M_R = 225,1$): C 48,0 % (48,0 %); H 3,5 % (3,1 %); N 6,2 % (6,3 %)

VII. KYSELINA (HYDROXY(FENYL)METHYLEN)BIS(*N*-FTALIMIDOMETHYLFOSFINOVÁ)



100 ml trojhrdlá baňka byla opatřena magnetickým míchadlem, zaváděcí trubičkou s kohoutem (napojenou na přívod argonu) a chladičem, na nějž byla nasazena další zaváděcí trubička s kohoutem (napojená na membránovou vývěvu). Do baňky bylo vsypáno 5,00 g *N*-ftaloyl-aminomethylfosfinové kyseliny (22,2 mmol) a poslední hrdlo bylo uzavřeno zátkou. Aparatura byla sekurována (3x evakuována a následně naplněna argonem). Poté byla zaváděcí trubička na chladiči vyměněna za bublačku naplněnou nujolem a zátky byla vyměněna za gumové septum (obojí v silném protiproudu argonu). Přes septum bylo pomocí injekční stříkačky přidáno 30 ml hexamethyldisilazanu. Proud argonu byl ztlumen tak, aby bublačkou procházela cca 1 bublinka za 2 s. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána 12 hodin v olejové lázni o teplotě 100 – 110 °C. Po ukončení reakce byl zesílen proud argonu a celá aparatura byla vyjmuta z olejové lázně a ponechána vychladnout na laboratorní teplotu. K reakční směsi bylo přes septum přidáno injekční stříkačkou 20 ml vysušeného dichlormethanu.

Přes septum byl přidán roztok 1,64 g benzoylchloridu (11,7 mmol) v 20 ml suchého dichlormethanu. Reakční směs byla míchána 12 hodin pod mírným proudem argonu. Poté byl zvýšen proud argonu a reakční směs byla převedena pomocí kanyly do baňky obsahující 200 ml ethanolu. Reakční baňka byla vymyta dalšími 50 ml ethanolu a obě ethanolové frakce byly spojeny. Vzniklá suspenze byla odpařena dosucha na rotační vakuové odparce. Získaný odparek byl rozpuštěn za horka v 50 ml vody a zfiltrován s aktivním uhlím. Po ochlazení bylo k filtrátu za stálého míchání přikapáno 5 ml koncentrované HCl. Během přidávání kyseliny se začala tvořit nažloutlá vazká sraženina. Po 2 hodinách byla kapalina nad vyloučeným surovým produktem opatrně slita a bylo přidáno 50 ml roztoku MeCN:CHCl₃:MeOH (1:1:1). Do druhého dne se z roztoku vyloučila bílá krystalická látka, která byla odfiltrována na fritě S3, promyta vodou a dlouze prosávána vzduchem. Produkt byl dosušen v evakuovaném exsikátoru s P₄O₁₀.

Výtěžek: 3,93 g (tj. 64 %).

Charakterizace:

NMR (5% Et₃N v DMSO): ¹H δ 3,74 (m, 4H, P-CH₂); δ 7,17 (m, 1H, arom.); δ 7,29 (m, 2H, arom.); δ 7,82 (m, 10H, arom.)

¹³C{¹H} δ 36,0 (d, 2C, P-CH₂, ¹J_{CP} = 100,0 Hz); δ 77,2 (t, 1C, C-OH, ¹J_{CP} = 79,8 Hz); δ 122,8 (s, arom.); δ 126,2 (s, arom.); δ 127,3 (s, arom.); δ 131,7 (s, arom.); δ 134,3 (s, arom.); δ 167,6 (s, 4C, C=O)

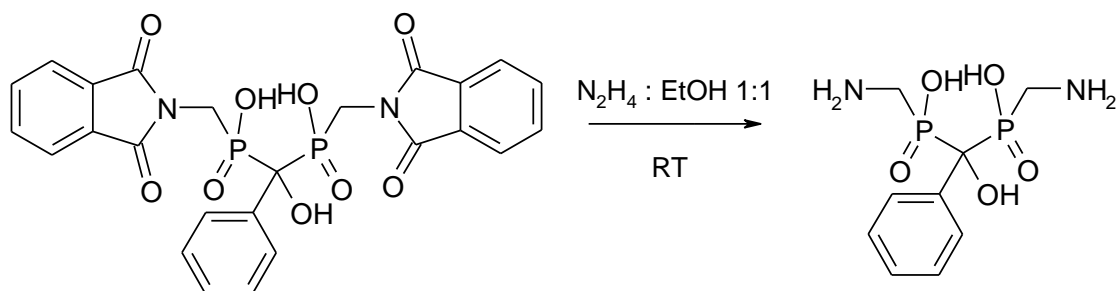
³¹P{¹H} δ 30,4 (s)

MS (ESI): (-) 552,8 (M-H⁺)⁻, vypočteno 553,4; (+) 577,0 (M+Na⁺)⁺, vypočteno 577,4; 656,1 (M+NHEt₃⁺)⁺, vypočteno 656,4

TLC (MeCN-MeOH-NH₄OH 3:1:2): R_f = 0,5

EA (C₂₅H₂₀N₂O₉P₂·0,5HCl, M_R = 572,6): C 52,0 % (52,4 %); H 3,9 % (3,6 %); N 4,7 % (4,9 %)

VIII. KYSELINA (HYDROXY(FENYL)METHYLEN)BIS(AMINOMETHYLFOSFINOVÁ)



3,93 g (7,09 mmol) kyseliny (hydroxy(fenyl)methylen)bis(*N*-fthalimidomethylfosfinové) bylo rozpuštěno za laboratorní teploty v roztoku 80 ml 80 % aq. hydrazinu a 80 ml ethanolu. Roztok byl míchán po dobu 24 h. Průběh odbourávání fthalimidových skupin byl kontrolován pomocí ^{31}P NMR. Surový produkt byl odpařen do sucha na rotační vakuové odparce a poté byl odpařován ještě několikrát s ethanolem kvůli odstranění zbytků hydrazinu. Odparek byl rozpuštěn v malém množství vody a převrstven ethanolem. Do druhého dne se vyloučila sraženina, která byla odfiltrována na fritě S3, promyta ethanolem a přečištěna sloupcovou chromatografií na silném aniontovém iontoměniči (DOWEX 1, OH^- -cyklus). Nečistoty byly eluovány vodou, produkt pak 6M HCl. Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml 1% aq. HCl. Do roztoku byl přidán nadbytek ethanolu. Přes noc se vysrážel produkt, který byl odfiltrován na fritě S3, promyt ethanolem a vysušen v evakuovaném exsikátoru s P_4O_{10} .

Výtěžek: 1,69 g (tj. 81 %).

Charakterizace:

NMR (D_2O): ^1H δ 3,11 (m, 4H, P- CH_2); δ 7,45 (m, 3H, C- C_6H_5); δ 7,75 (m, 2H, C- C_6H_5)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ δ 35,6 (d, 2C, P- CH_2 , $^1J_{\text{CP}} = 99,2$ Hz); δ 81,7 (t, 1C, C-OH, $^1J_{\text{CP}} = 96,3$ Hz); δ 126,5 (t, C- C_6H_5 , $^2J_{\text{CP}} = 3,9$ Hz); δ 128,4 (s, C- C_6H_5); δ 129,1 (s, C- C_6H_5); δ 137,4 (s, C- C_6H_5)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ δ 28,3 (s)

MS: (-) 292,5 ($\text{M}-\text{H}^+$) $^-$, vypočteno 293,2; (+) 294,7 ($\text{M}+\text{H}^+$) $^+$, vypočteno 295,2; 316,8 ($\text{M}+\text{Na}^+$) $^+$, vypočteno 317,2; 332,7 ($\text{M}+\text{K}^+$) $^+$, vypočteno 333,2

TLC (EtOH- NH_4OH 1:1): $R_f = 0,4$

EA ($\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, $M_R = 348,7$): C 31,0 % (31,0 %); H 5,5 % (5,1 %); N 8,0 % (7,8 %)

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1. SYNTÉZA

3.1.1. SYNTÉZA KYSELINY AMINOBIS(METHYL(HYDROXYMETHYL)FOSFINOVÉ)

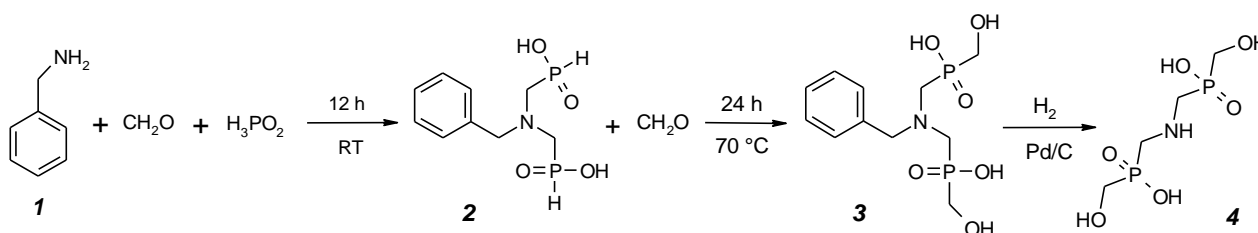


Schéma 1 Syntéza kyseliny aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinové)

Kyselina aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinová) (látka **4**) byla připravena třístupňovou syntézou z výchozího benzylaminu **1** podle **Schéma 1**. Kyselina *N*-benzylaminobis(methylfosfinová) (látka **2**) byla připravena modifikací dříve publikovaného postupu⁷² – reakcí Mannichovského typu benzylaminu s kyselinou fosforovou a roztokem formaldehydu. V původní práci se benzylamin přidával za laboratorní teploty. Přidávkem benzylaminu se reakční směs silně zahřívala a za vyšší teploty docházelo k vedlejší reakci – reduktivní methylaci (vznikal *N*-methylovaný derivát). Bylo prokázáno, že vznik tohoto vedlejšího produktu lze omezit chlazením reakční směsi během přidávání benzylaminu v lázni voda/led.⁷³ Dalším bočním produktem této reakce je hydroxymethyl derivát. Oba vedlejší produkty reakce (cca 10 %) je možno snadno odstranit triturací surového produktu v methanolu a následnou rekrystalizací. Výtěžek reakce je poté okolo 50 %. Látka **3** byla připravena reakcí látky **2** s nadbytkem vodného roztoku formaldehydu v kyselém prostředí (6M aq. HCl). Během reakce vznikají také různé částice obsahující krátké formaldehydové řetězce. Nadbytek formaldehydu je proto nutné odstranit několikanásobným odpařováním reakční směsi s vodou. Reakce probíhá kvantitativně. V konečném kroku byla odstraněna chránicí benzylová skupina hydrogenací plynným vodíkem. Reakce byla katalyzována palladiem.

Kyselina aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinová) byla po reakci získána ve formě oleje, který byl lyofilizací převeden na bílý prášek. Přes všechny snahy se produkt nepodařilo vykristalizovat přímo z roztoku.

3.1.2. SYNTÉZA KYSELINY AMINOBIS(METHYL(2-KARBOXYETHYL)FOSFINOVÉ)

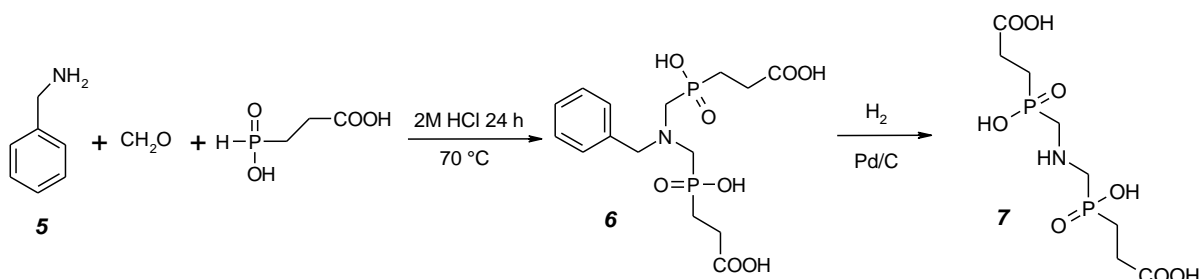
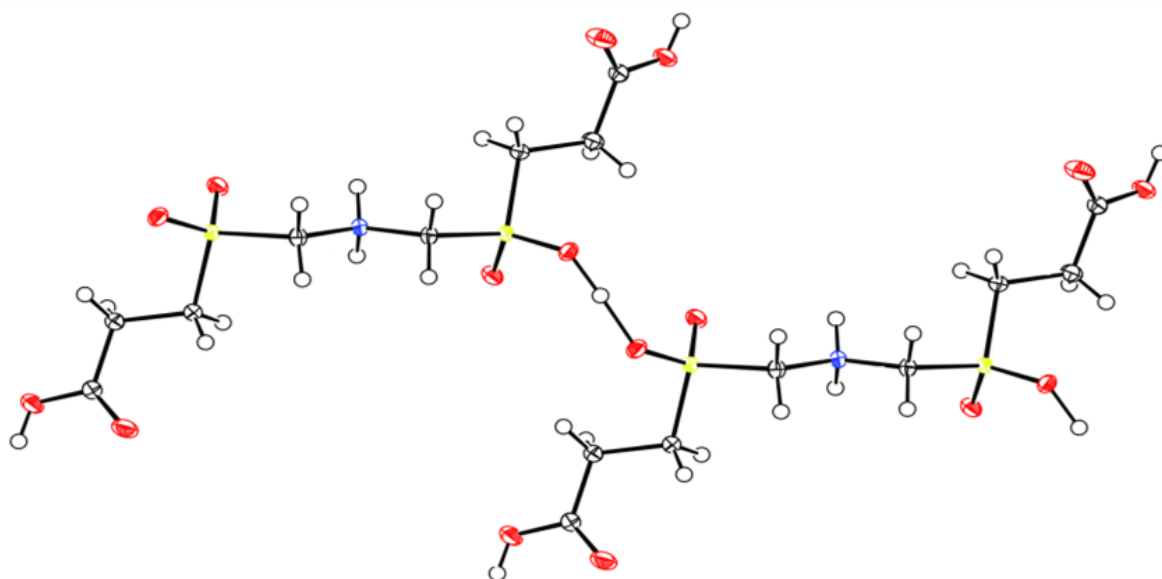


Schéma 2 Syntéza kyseliny aminobis(methyl(2-karboxyethyl)fosfinové)

Syntéza kyseliny aminobis(methyl(2-karboxyethyl)fosfinové) (látka 7) probíhala obdobně jako výše zmíněná syntéza kyseliny aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinové) (**Schéma 2**). V prvním kroku reakcí Mannichovského typu benzylaminu 5 s kyselinou (3-*tert*-butoxy-3-oxopropyl)fosfinovou a formaldehydem vznikala látka 6. Reakční směs se během přidávání benzylaminu nemusí chladit; samotná reakce probíhá až za zvýšené teploty (70 °C). Vzniklá směs byla čištěna gradientovou elucí pomocí slabého kationtového iontoměničce založené na principu nepolárních interakcí mezi benzylovou skupinou produktu a iontoměničcem. Vodou se eluovaly nečistoty neobsahující ve své molekule benzylovou skupinu (především nezreagovaná výchozí kyselina (3-*tert*-butoxy-3-oxopropyl)fosfinová, která se přidávala do reakční směsi v přebytku). Postupným snižováním polaritý rozpouštědla se z iontoměničce uvolnil produkt. V druhém kroku byla odstraněna chránicí benzylová skupina hydrogenací plynným vodíkem. Reakce byla katalyzována palladiem a probíhala kvantitativně.

Látku 7 se podařilo vykrytalizovat pozvolným odpařováním z malého objemu vody. Byly získány bezbarvé krystaly monohydrátu produktu (IDP^{cc}·H₂O). Pomocí RTG difrakce byla určena RTG struktura (**Obr 14**). Látka 3 krystaluje v monoklinické soustavě. Struktura je stabilizováno intermolekulárními vodíkovými vazbami mezi fosfinátovými skupinami. Vybrané parametry jsou v **Tab. 4**.



Obř. 14 Struktura dvou molekul monohydrátu $\text{IDP}^{\text{ce}} \cdot \text{H}_2\text{O}$ spojených vodíkovou vazbou mezi fosfínátovými skupinami. (Molekuly vody nejsou pro jednoduchost zobrazeny).

Tab. 4 Vybrané RTG parametry monohydrátu $\text{IDP}^{\text{ce}} \cdot \text{H}_2\text{O}$

Parametr	$\text{IDP}^{\text{ce}} \cdot \text{H}_2\text{O}$	Parametr	$\text{IDP}^{\text{ce}} \cdot \text{H}_2\text{O}$
vzorec	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_9\text{P}_2$	<i>Z</i>	4
M_{R}	333,17	D_{C} ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	1,574
barva a tvar	bezbarvé prizma	σ (mm^{-1})	0,351
rozměry (mm)	0,35 x 0,42 x 0,50	$F(000)$	696
soustava	monoklinická	celkový počet difrakcí	3230
prostorová grupa	$\text{P } 1 \ 2_1/n \ 1$	počet pozorovaných difrakcí ($I > 2\delta(I)$)	3052
a (Å)	8,1759(3)	data; omezení; parametry	3230; 3; 196
b (Å)	18,8124(6)	g.o.f.	0,721
c (Å)	9,4611(3)	R_1 ($I > 2\delta(I)$); R_2 (všechna data)	0,0310; 0,0324
α (°)	90	wR_1 ($I > 2\delta(I)$); wR_2 (všechna data)	0,0958; 0,0978
β (°)	105,0120(10)	maximální změna / e.s.d.	0,020
γ (°)	90	největší difrakční maxima, minima ($\text{e} \cdot \text{Å}^{-3}$)	0,418; -0,330
V (Å ³)	1405,53(8)		

3.1.3. SYNTÉZA KYSELINY

(HYDROXY(FENYL)METHYLEN)BIS(AMINOMETHYLFOSFINOVÉ)

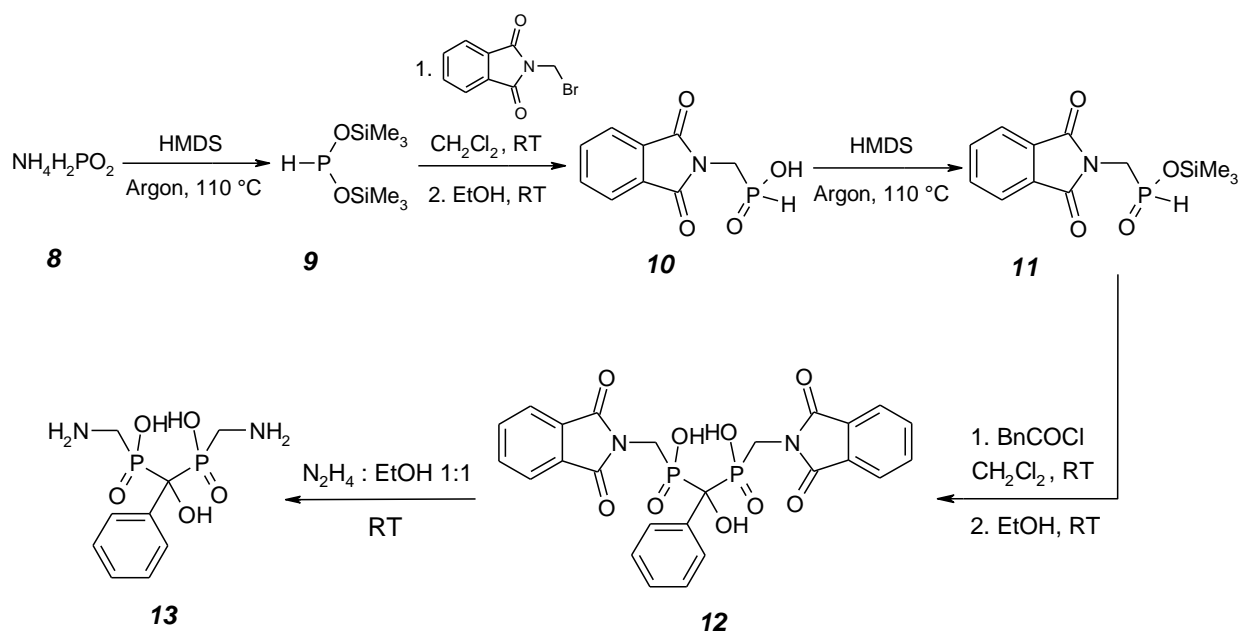


Schéma 3 Syntéza kyseliny (hydroxy(fenyl)methylen)bis(aminomethylfosfinové)

Příprava kyseliny (hydroxy(fenyl)methylen)bis(aminomethylfosfinové) představovala několikastupňovou syntézu (**Schéma 3**). Nejprve byla připravena kyselina *N*-ftaloyl-aminomethylfosfinové (látka **10**). Její syntéza probíhala přes reaktivní samozápalný meziprodukt bis(trimethylsilyloxy)fosfin (látka **9**). Příprava látky **9** z fosforanu amonného **8** a hexamethyldisilazanu *in situ* byla mnohokrát publikována^{74, 75, 76} a osvědčila se i v naší laboratoři. Aby došlo ke kvantitativní konverzi, byly výchozí látky zahřívány na teplotu $100 - 110\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu asi 12 hodin. Poté následovala alkylace vzniklého bis(trimethylsilyloxy)fosfinu brommethylftalimidem. Obě reakce probíhaly v inertní atmosféře, protože bis(trimethylsilyloxy)fosfin i silylestery fosfinových kyselin jsou citlivé k oxidaci a na vzdušnou vlhkost. Dalším krokem byla hydrolyza silylesterových skupin ethanolem. Hydrolyza těchto esterů je silně exotermický proces. Reakční směs byla proto přidávána pomalu do nadbytku ethanolu.

Popsaný postup přípravy látky **10** není novou metodou. Oproti původní práci⁷⁷ byl však modifikován a zjednodušen způsob čištění reakční směsi. Surový produkt, který obsahuje monosubstituovanou i disubstituovanou kyselinu *N*-ftaloyl-aminomethylfosfinovou, byl získán rekrystalizací odparku z vroucího roztoku 1% aq. HCl. Jednotlivé látky byly

od sebe odděleny opětovnou krystalizací z vroucí vody. V první frakci se vyloučila disubstituovaná kyselina, ve druhé monosubstituovaná kyselina a třetí frakce obsahovala monosubstituovanou kyselinu znečištěnou malým množstvím kyseliny fosforené.

I syntéza látky **12** probíhala přes reaktivní silylestery. V inertní atmosféře je látka **10** esterifikována pomocí hexamethyldisilazanu za vzniku látky **11**. Vzniklá esterová forma následně reaguje s benzoylchloridem za vzniku silylesteru kyseliny (hydroxy(fenyl)methylen)bis(*N*-ftaloyl-aminomethylfosfinové). Posledním krokem je deesterifikace silylových skupin ethanolem. Čistý produkt **12** byl získán krystalizací z kyselého prostředí (konc. aq. HCl) a následnou rekrystalizací ze směsi organických rozpouštědel (MeCN:CHCl₃:MeOH) ve formě bílé krystalické látky.

Látka **13** byla získána z látky **12** odbouráním chránících ftalimidových skupin směsí hydrazinu a ethanolu. Reakce proběhla přes noc za laboratorní teploty kvantitativně. Surový produkt byl rozpuštěn v malém množství vody a převrstven ethanolem. Přes noc se z roztoku vyloučila látka **13** ve formě bílého prášku. Kvůli odstranění zbytku amoniaku, který by byl překážkou při potenciometrických titracích, byla látka **13** dále čištěna pomocí chromatografie na silném aniontovém měniči (DOWEX 1). Produkt byl posléze získán ve formě hydrochloridu opět jako bílý prášek.

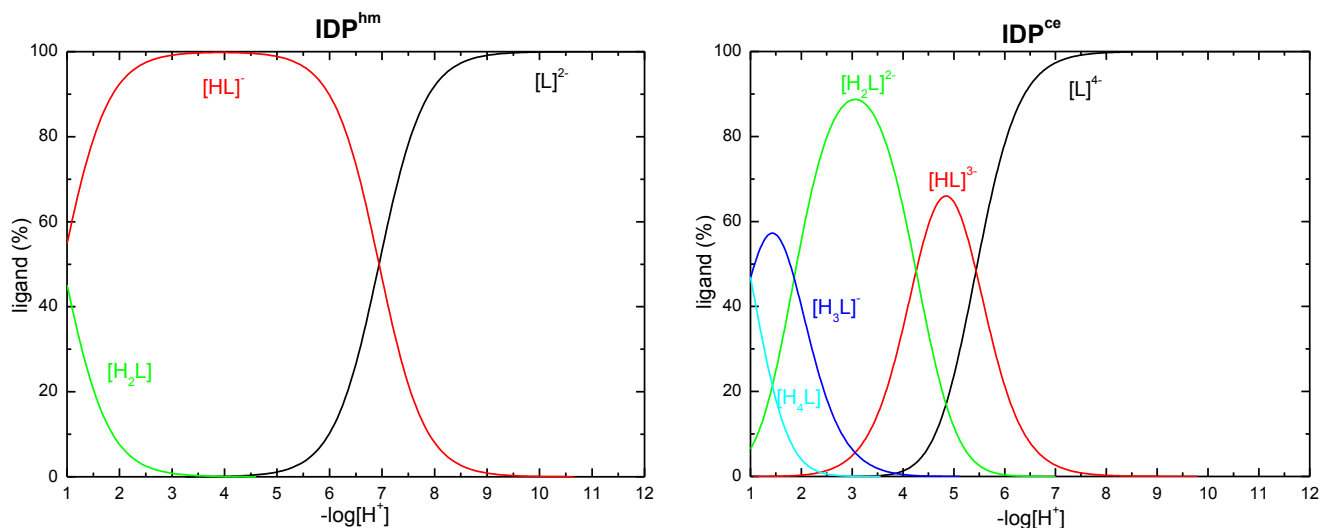
3.2. POTENCIOMETRICKÉ TITRACE

3.2.1. AMINODIFOSFINOVÉ KYSELINY

Pomocí potenciometrických titrací byly stanoveny hodnoty protonizačních konstant látek **IDP^{hm}** a **IDP^{ce}** a konstanty stability jejich komplexů s ionty Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} a Ga^{3+} .

U látky **IDP^{hm}** byly stanoveny dvě protonizační konstanty (**Tab. 5**) – pK_1 odpovídá protonizaci jedné z fosfinátových skupin (pK_a druhého fosfinátu je příliš nízké na to, aby se dalo stanovit potenciometricky) a pK_2 protonizaci atomu dusíku. Titrace byla provedena v rozmezí pH 1,5 – 12. Z distribučního diagramu (**Obr. 15**) je patrné, že se v roztoku nacházejí tři typy částic – $[\text{H}_2\text{L}]^{2-}$, $[\text{HL}]^-$ a $[\text{L}]^{2-}$. Na začátku titrace roztok obsahuje částice $[\text{H}_2\text{L}]^{2-}$ a $[\text{HL}]^-$. Zastoupení dvakrát protonizované částice $[\text{H}_2\text{L}]^{2-}$ však rychle klesá a od pH 3 je v roztoku přítomna pouze jednou protonizovaná částice $[\text{HL}]^-$. Od pH 4,5 roste zastoupení částice $[\text{L}]^{2-}$, která při pH 10 dosahuje již 100 % zastoupení.

U látky **IDP^{ce}** byly stanoveny čtyři protonizační konstanty (**Tab. 6**) – pK_1 odpovídá protonizaci jedné z fosfinátových skupin (pK_a druhého fosfinátu je příliš nízké na to, aby se dalo stanovit pomocí potenciometrie), pK_2 a pK_3 protonizaci na karboxylátech a pK_4 protonizaci na atomu dusíku. V rozmezí pH 1,5 – 12 se v roztoku nacházejí čtyři typy částic – $[\text{H}_4\text{L}]^{2-}$, $[\text{H}_3\text{L}]^-$, $[\text{H}_2\text{L}]^{2-}$, $[\text{HL}]^{3-}$ a $[\text{L}]^{4-}$ (**Obr. 15**). Na počátku titrace jsou v roztoku přítomny částice $[\text{H}_4\text{L}]^{2-}$, $[\text{H}_3\text{L}]^-$ a $[\text{H}_2\text{L}]^{2-}$. Od pH 2 začíná pomalu narůstat i zastoupení jednou protonizované částice $[\text{HL}]^{3-}$. Při pH 4 se objevuje plně deprotonovaná částice $[\text{L}]^{4-}$, které je od pH 8 jedinou částicí nacházející se v roztoku.



Obr. 15 Distribuční diagramy látek **IDP^{hm}** a **IDP^{ce}** ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

U látky **IDP^{hm}** byly stanoveny konstanty stability komplexů s ionty kovů Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} a Ga^{3+} (**Tab. 5**). Titrace s kovy byly provedeny ve dvou poměrech ligand:kov 1:1 a 2:1. Látka **IDP^{hm}** jako tridentátní ligand neobsadí všechna koordinační místa iontu kovu, což umožňuje vznik i komplexů s dvěma ligandy vázanými na jeden iont kovu.

Tab. 5 Celkové protonizační konstanty ligandu **IDP^{hm}** a konstanty stability jeho komplexů
($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NMe_4Cl , $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

IDP^{hm}	H⁺	Cu²⁺	Ni²⁺	Zn²⁺	Mg²⁺	Ga³⁺
logβ(HL)	6,94(1)					
logβ(H₂L)	7,86(2)					
logβ(ML)		6,51(1)	4,08(3)	3,84(2)	2,13(3)	7,50(1)
logβ(ML(OH)₂)						0,53(1)
logβ(ML₂)		9,65(6)	7,65(5)	7,01(4)		13,34(6)
logβ(MHL₂)		15,66(5)	13,65(7)	13,32(6)	11,99(5)	
logβ(ML₂(OH))		2,13(3)				
logβ(ML₂(OH)₂)		-7,65(5)				

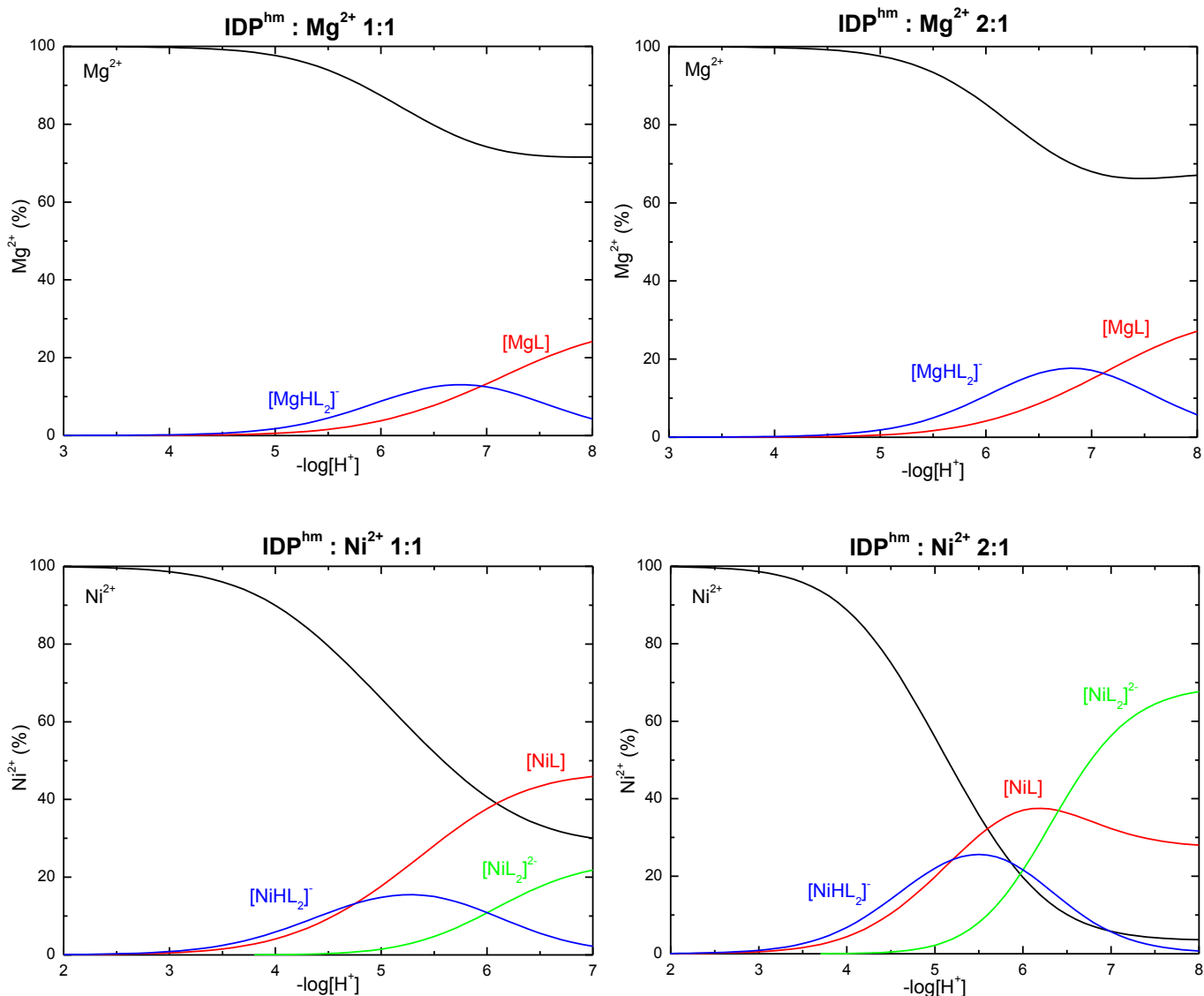
Ligand **IDP^{hm}** tvoří se zkoumanými kovy jen slabé komplexy, a proto se během všech titrací při vyšším pH objevovaly sraženiny hydroxidů kovů. Získané hodnoty konstant stability rostou v pořadí $\text{Mg}^{2+} < \text{Ni}^{2+} \approx \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Ga}^{3+}$. Distribuční diagramy jednotlivých systémů ligand–kov zobrazuje **Obr. 16**.

S ionty Mg^{2+} tvoří ligand slabé komplexy. V rozmezí pH 2 – 8 se objevují částice $[\text{MgHL}_2]^-$ a $[\text{MgL}]$, které však dosahují maximálního zastoupení jen 20 – 25 %; většina iontu kovu zůstává volně v roztoku. Chování systému při poměru ligand:kov 1:1 a 2:1 je téměř identické.

Distribuční diagramy systémů **IDP^{hm}–Ni²⁺** a **IDP^{hm}–Zn²⁺** jsou velmi podobné. Vznikají tři typy částic - $[\text{MHL}_2]^-$, $[\text{ML}]$ a $[\text{ML}_2]^{2-}$. Při poměru ligand:kov 1:1 byla titrace ukončena z důvodu tvorby sraženiny při pH 7, při poměru 2:1 při pH 8. V poměru 2:1 je patrný nárůst zastoupení částic $[\text{MHL}_2]^-$ a $[\text{ML}_2]^{2-}$.

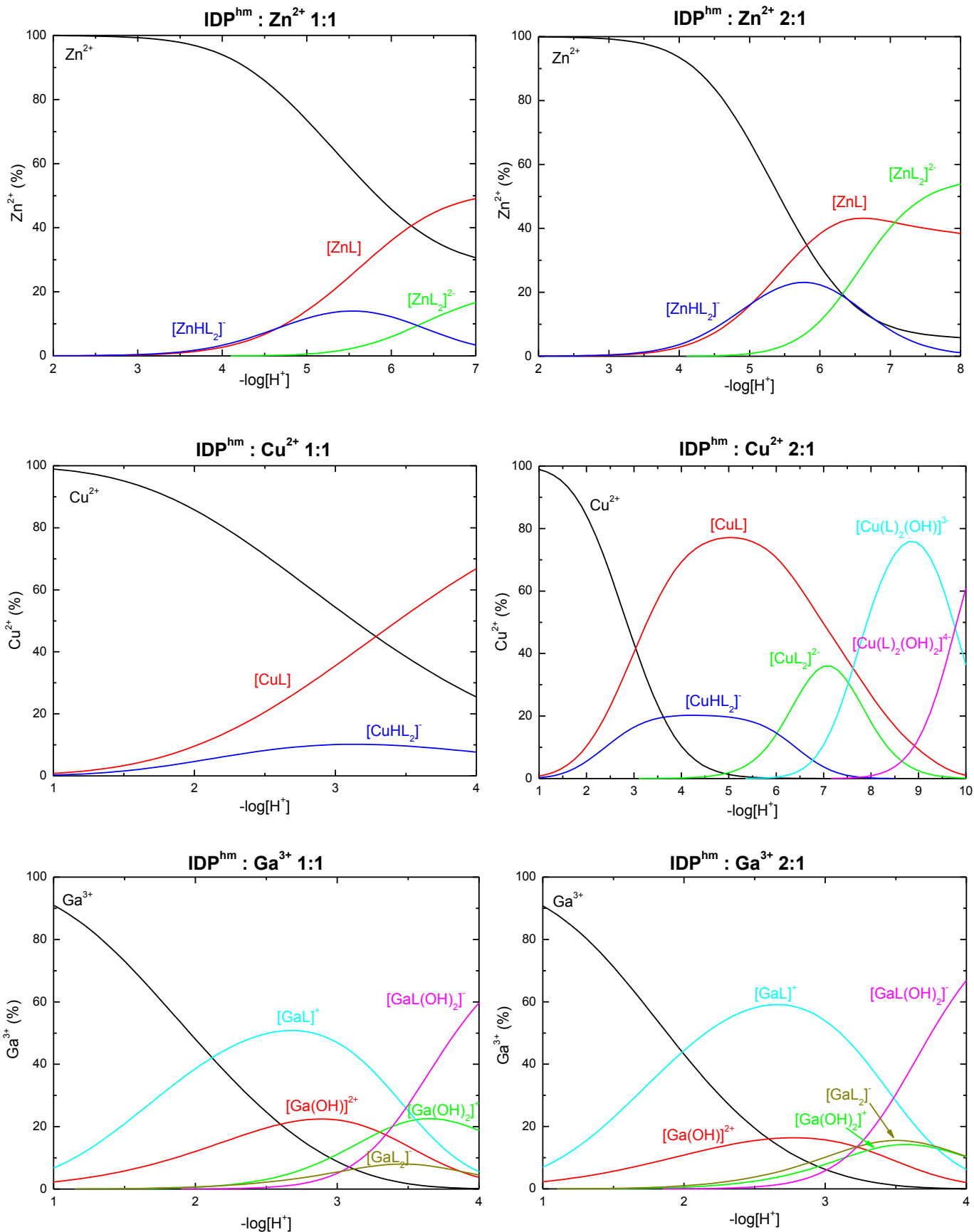
V systému $\text{IDP}^{\text{hm}}\text{-Cu}^{2+}$ je jasně patrný vliv poměru ligand:kov. Zatímco v poměru ligand:kov 1:1 se sraženina hydroxidů kovu objevila již při pH 4, v poměru 2:1 bylo možno titrovat až do pH 10. V roztoku vznikala majoritní částice $[\text{CuL}]$ vyskytující se v celém rozsahu pH (maximální zastoupení $\sim 75\%$ při pH 5). Dále vznikají částice $[\text{CuHL}_2]^-$ a $[\text{CuL}_2]^{2-}$. Navíc od pH 6 resp. pH 8 se objevují i hydroxokomplexy $[\text{Cu}(\text{L})_2(\text{OH})]^{3-}$ a $[\text{Cu}(\text{L})_2(\text{OH})_2]^{4-}$.

Již na počátku titrace systému $\text{IDP}^{\text{hm}}\text{-Ga}^{3+}$ je asi 10 % kovu zakomplexováno. Dále v roztoku převládá částice $[\text{GaL}]^+$ s maximálním zastoupením 60 % při pH 2,5. Objevuje se i částice $[\text{GaL}_2]^-$ ($\sim 15\%$ při pH 3,5). Od pH 2,5 narůstá zastoupení částice $[\text{GaL}(\text{OH})_2]^-$.



Obr. 16 Distribuční diagramy systémů $\text{IDP}^{\text{hm}}\text{-kov}$ v poměrech 1:1 a 2:1

($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, 25°C)



Obr. 16 Distribuční diagramy systémů IDP^{hm} -kov v poměrech 1:1 a 2:1 (pokračování)

($c_{lig} = c_M = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

U látky **IDP^{ce}** byly stanoveny konstanty stability komplexů s ionty kovů Ni²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ a Ga³⁺ (**Tab. 6**). Také ligand **IDP^{ce}** vytváří s kovy jen slabé komplexy. Proto byly všechny titrace provázeny tvorbou sraženin a musely být ukončeny již v kyselém pH (4 – 6).

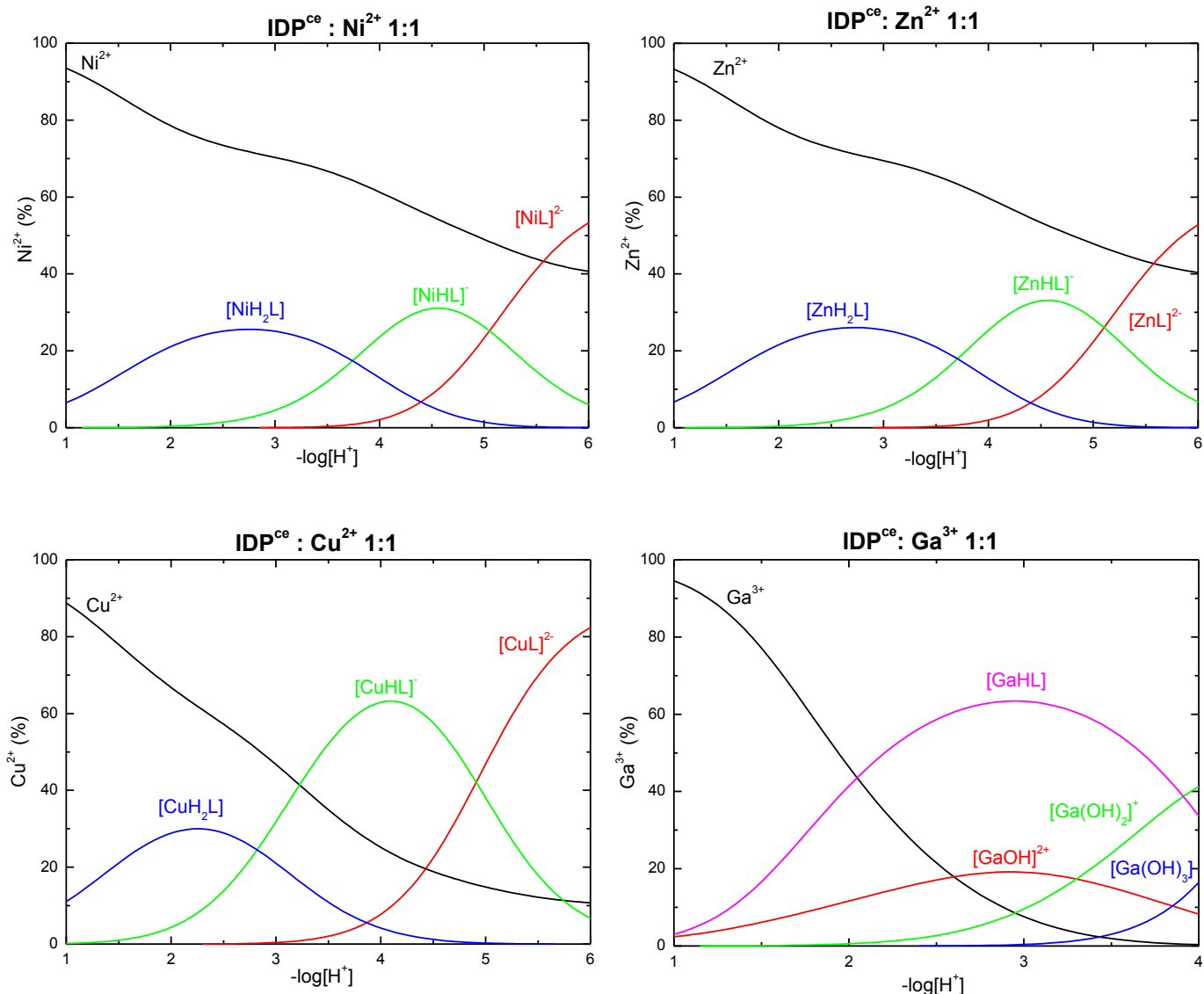
Tab. 6 Celkové protonizační konstanty ligandu **IDP^{ce}** a konstanty stability jeho komplexů

($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NMe₄Cl, 25 °C)

IDP^{ce}	H⁺	Cu²⁺	Ni²⁺	Zn²⁺	Ga³⁺
logβ(HL)	5,44(2)				
logβ(H₂L)	9,69(1)				
logβ(H₃L)	11,55(2)				
logβ(H₄L)	12,56(5)				
logβ(ML)		4,36(3)	3,02(4)	3,02(5)	
logβ(MHL)		9,27(3)	8,07(4)	8,12(5)	10,46(3)
logβ(MH₂L)		12,09(6)	11,81(5)	11,82(7)	

Získané hodnoty konstant stability rostou v pořadí Ni²⁺ ≈ Zn²⁺ < Cu²⁺ < Ga³⁺. Pořadí dvojmocných kovů odpovídá Irwing-Williamsově řadě. Nejvyšší hodnota stability komplexu s iontem Ga³⁺ je dána především jeho vyšším nábojem oproti ostatním zkoumaným iontům kovů. Distribuční diagramy jednotlivých systémů ligand–kov jsou zobrazeny na **Obr. 17**.

Ve všech případech je již na počátku titrace část kovu (~10 %) zakomplexována. V průběhu titrace dvojmocných kovů vznikají tři typy částic - [MH₂L], [MHL]⁻ a [ML]²⁻. Částice [MH₂L] dosahuje maximálního zastoupení při pH 2 - 3 (~30 %), částice [MHL]⁻ při pH 4 - 5 (~60 % pro Cu²⁺ a ~30% pro Ni²⁺ a Zn²⁺). Zastoupení částice [ML]²⁻ narůstá do pH 6 (~80% pro Cu²⁺ a ~50% pro Ni²⁺ a Zn²⁺), při kterém byla titrace ukončena. Při titraci systému **IDP^{ce}**-Ga³⁺ vzniká pouze komplex [GaHL], který kolem pH 3 dosahuje 60 % zastoupení. Dále iont Ga³⁺ tvoří řadu hydroxokomplexů. Ve vodě nerozpustný hydroxid gallitý, který vzniká již kolem pH 4, byl příčinou ukončení titrace.



Obr. 17 Distribuční diagramy systémů IDP^{ce}–kov v poměru 1:1

($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

3.2.2. BIS(AMINOMETHYLFOSFINÁTY)

Pomocí potenciometrických titrací byly stanoveny hodnoty protonizačních konstant bis(aminomethylfosfinátů) **PheOHABPin** a **ABPin** a konstanty stability jejich komplexů s ionty kovů Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} .

U látky **PheOHABPin** byly stanoveny dvě protonizační konstanty (**Tab. 7**) – pK_1 a pK_2 odpovídá protonizacím aminoskupin. Hodnoty pK_a fosfinátových skupin jsou příliš nízké, než aby se daly stanovit potenciometricky. V rozmezí pH 2 – 12 se v roztoku nacházejí tři typy částic – $[\text{H}_2\text{L}]$, $[\text{HL}]^-$ a $[\text{L}]^{2-}$ (**Obr. 18**). Na začátku titrace je v roztoku přítomna pouze dvakrát protonizovaná částice $[\text{H}_2\text{L}]$. Až při pH 6 začíná narůstat zastoupení jednou protonizované částice $[\text{HL}]^-$. Od pH 8 se v roztoku objevuje i plně deprotonovaná částice $[\text{L}]^{2-}$.

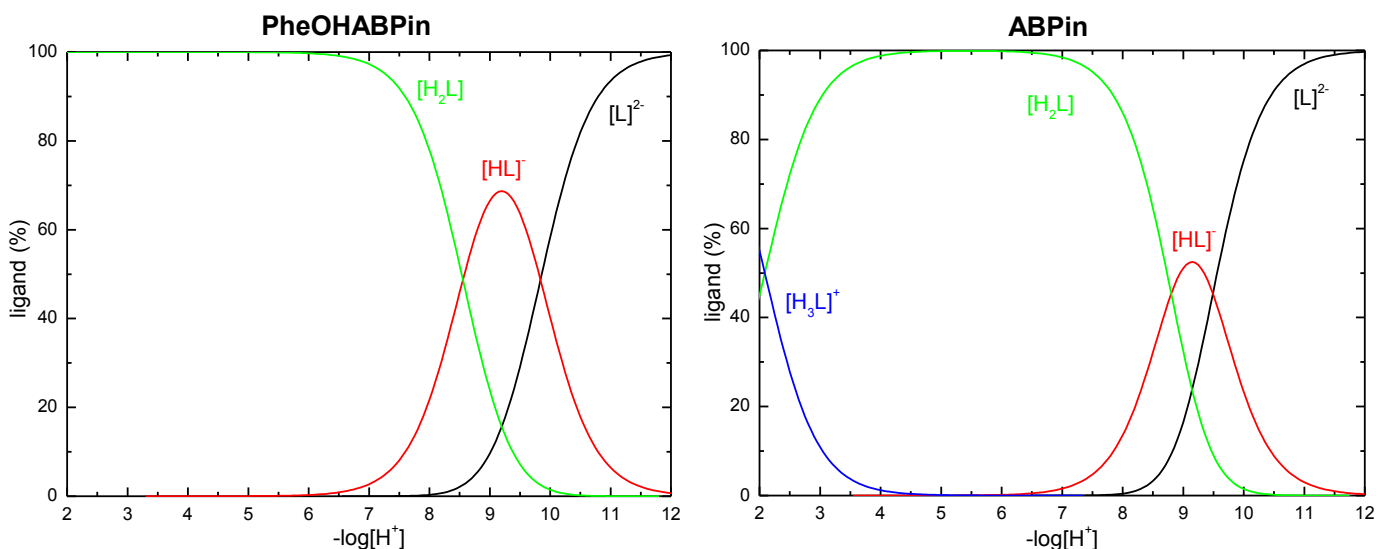
U látky **ABPin** byly stanoveny tři protonizační konstanty (**Tab. 8**) – pK_1 odpovídá protonizaci jedné z fosfinátových skupin (pK_a druhého fosfinátu je příliš nízké na to, aby se dalo stanovit pomocí potenciometrie), pK_2 a pK_3 protonizacím aminoskupin. V rozmezí pH 2 – 12 v roztoku vznikají čtyři typy částic – $[H_3L]^+$, $[H_2L]$, $[HL]^-$ a $[L]^{2-}$ (**Obr. 18**). Na začátku titrace při pH 2 jsou v roztoku přítomny částice $[H_3L]^+$ a $[H_2L]$. Zastoupení částice $[H_3L]^+$ klesá do pH 4,5, kdy je již v roztoku zastoupena téměř výhradně jen částice $[H_2L]$. Od pH 6 začíná narůstat zastoupení částice $[HL]^-$, která dosahuje svého maxima při pH 9. Od pH 8 se v roztoku nachází i plně deprotonizovaná částice $[L]^{2-}$.

Tab. 7 Celkové protonizační konstanty ligandu **PheOHABPin** a konstanty stability jeho komplexů; ($c_{\text{lig}} = c_M = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

PhoOHABPin	H⁺	Cu²⁺	Ni²⁺	Zn²⁺	Mg²⁺
logβ(HL)	9,84(1)				
logβ(H₂L)	18,39(1)				
logβ(ML)		11,13(1)	7,13(1)	6,51(1)	2,59(1)
logβ(ML₂(OH))		3,06(2)	-1,44(2)	-2,26(2)	
logβ(ML₂(OH)₂)		-9,23(3)	-13,94(4)	-13,28(4)	

Tab. 7 Celkové protonizační konstanty ligandu **ABPin** a konstanty stability jeho komplexů ($c_{\text{lig}} = c_M = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

ABPin	H⁺	Cu²⁺	Ni²⁺	Zn²⁺	Mg²⁺
logβ(HL)	9,49(2)				
logβ(H₂L)	18,29(2)				
logβ(H₃L)	20,38(2)				
logβ(ML)		9,87(1)	7,13(1)	6,29(1)	3,66(1)
logβ(ML₂(OH))		1,04(2)	-1,44(2)	-2,29(1)	-6,44(2)
logβ(ML₂(OH)₂)		-9,48(4)	-13,94(4)		



Obr. 18 Distribuční diagramy látek **PheOHABPin** a **ABPin**

($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

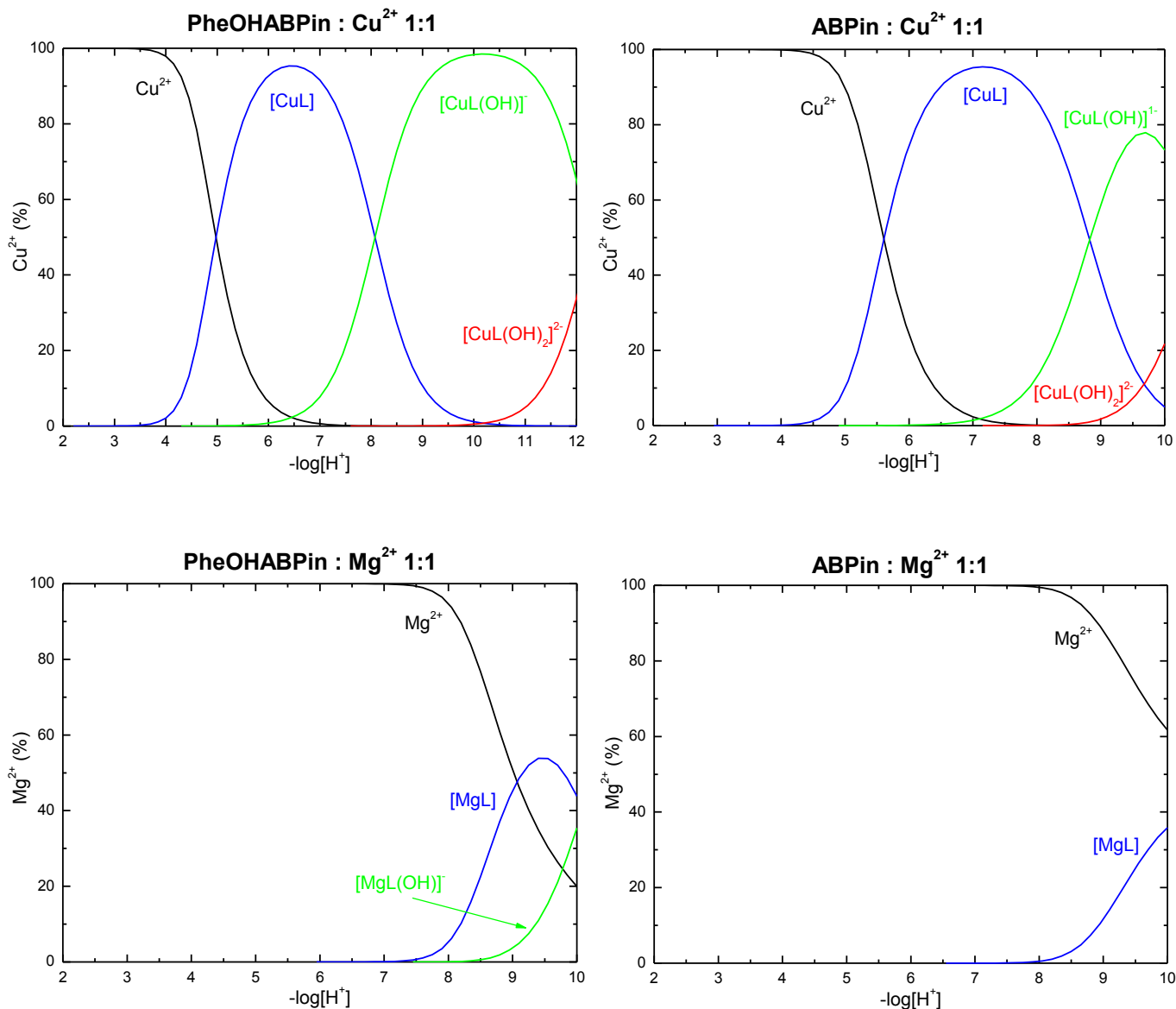
Získané hodnoty konstant stability rostou v pořadí $\text{Mg}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$ (**Tab. 7** a **Tab. 8**). Oba bis(aminomethylfosfináty) vykazují podobné koordinační chování. Distribuční diagramy jednotlivých systémů ligand–kov zobrazuje **Obr. 19**.

V systémech **PheOHABPin**– Cu^{2+} i **ABPin**– Cu^{2+} dochází ke komplexaci iontů Cu^{2+} od pH 4, kdy začíná narůstat zastoupení částice $[\text{CuL}]$. Ta dosahuje svého maxima (zastoupení ~95 %) v systému **PheOHABPin**– Cu^{2+} při pH 6,5 a v systému **ABPin**– Cu^{2+} při pH 7. Od pH 6 se rovněž tvoří částice $[\text{CuL}(\text{OH})]^-$. Její maximální zastoupení je v systému **PheOHABPin**– Cu^{2+} při pH 10 (~98 %) a v systému **ABPin**– Cu^{2+} při pH 9,5 (~75 %). Od pH 9 se tvoří i částice $[\text{CuL}(\text{OH})_2]^{2-}$. Titrace systému **ABPin**– Cu^{2+} byla ukončena z důvodu tvorby sraženiny při pH 10; v systému **PheOHABPin**– Cu^{2+} k srážení nedocházelo.

S ionty Mg^{2+} tvoří oba bis(aminomethylfosfináty) slabé komplexy. Ionty Mg^{2+} se začínají komplexovat až při pH 8. V roztoku se nacházejí částice $[\text{MgL}]$ (s ligandy **PheOHABPin** i **ABPin**) a $[\text{MgL}(\text{OH})]^-$ (jen s ligandem **ABPin**), které dosahují zastoupení do 50 %. Obě titrace byly ukončeny při pH 10 z důvodu tvorby sraženiny.

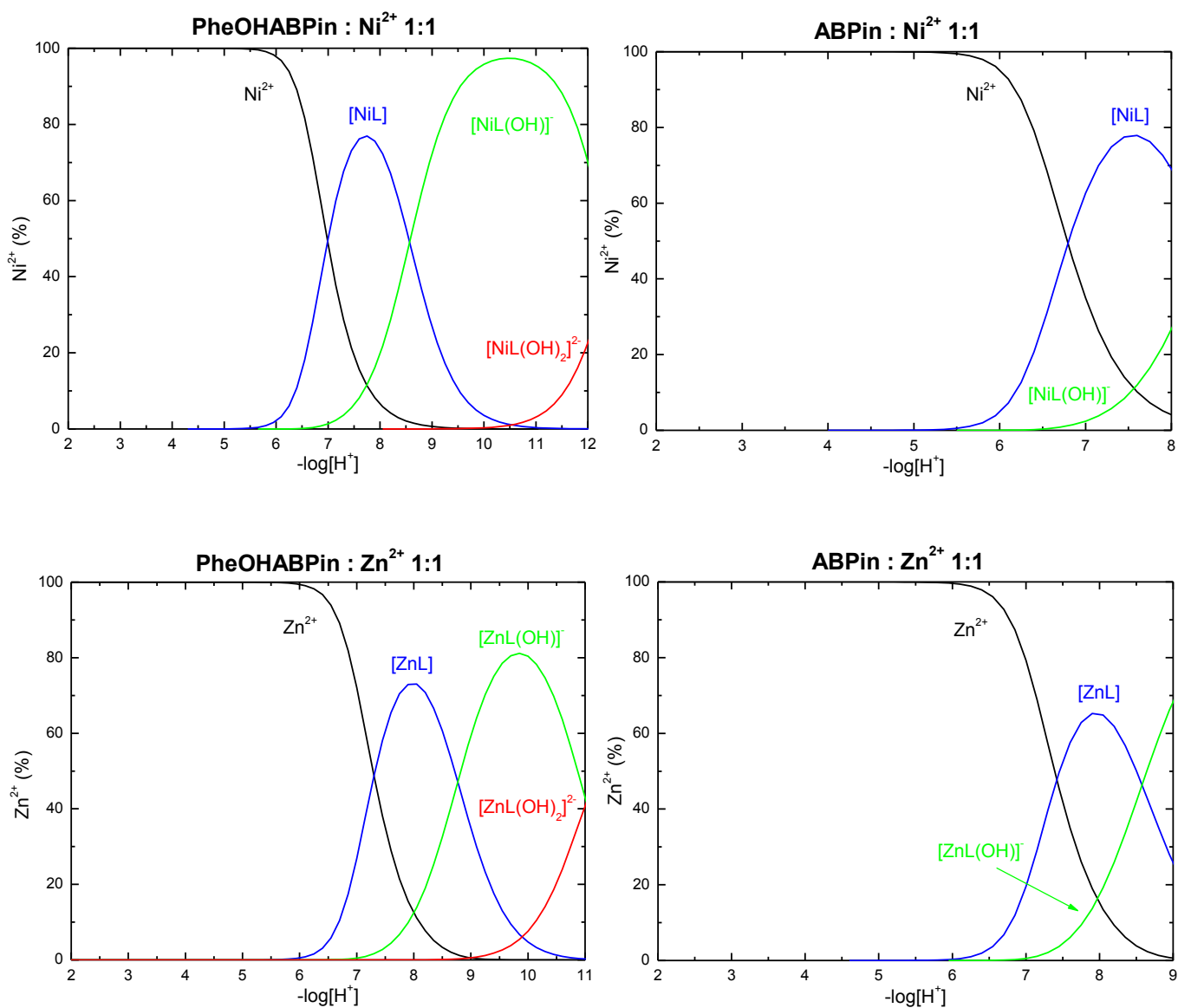
Chování iontů Ni^{2+} a Zn^{2+} v systémech s oběma bis(aminomethylfosfináty) vykazuje značnou podobnost. Ke komplexaci iontů Ni^{2+} a Zn^{2+} dochází v systémech **PheOHABPin**– M^{2+} i **ABPin**– M^{2+} od pH 5 – 6. V roztoku roste zastoupení částice $[\text{ML}]$, která dosahuje svého maxima (~75 % pro Ni^{2+} i Zn^{2+}) při pH 7,5 – 8. Od pH 6,5 rovněž narůstá zastoupení částice $[\text{ML}(\text{OH})]^-$, která má své maximum v systému **PheOHABPin**– M^{2+} při pH 9,5 – 11 (~97 % pro Ni^{2+} a ~80 % pro Zn^{2+}); titrace systému

ABPin– M^{2+} byla ukončena z důvodu tvorby sraženiny již při pH 8 resp. pH 9 (částice $[NiL(OH)]^-$ dosahovala před koncem titrace zastoupení ~25 % a částice $[ZnL(OH)]^-$ ~70 %). V systému **PheOHABPin**– M^{2+} byla dále pozorována částice $[ML(OH)_2]^{2-}$. Vznikala od pH 9 – 10 a dosahovala svého maximálního zastoupení okolo 20 % pro Ni^{2+} při pH 12 a okolo 40 % pro Zn^{2+} při pH 11.



Obr. 19 Distribuční diagramy systémů **PheOHABPin**–kov a **ABPin**–kov v poměrech 1:1

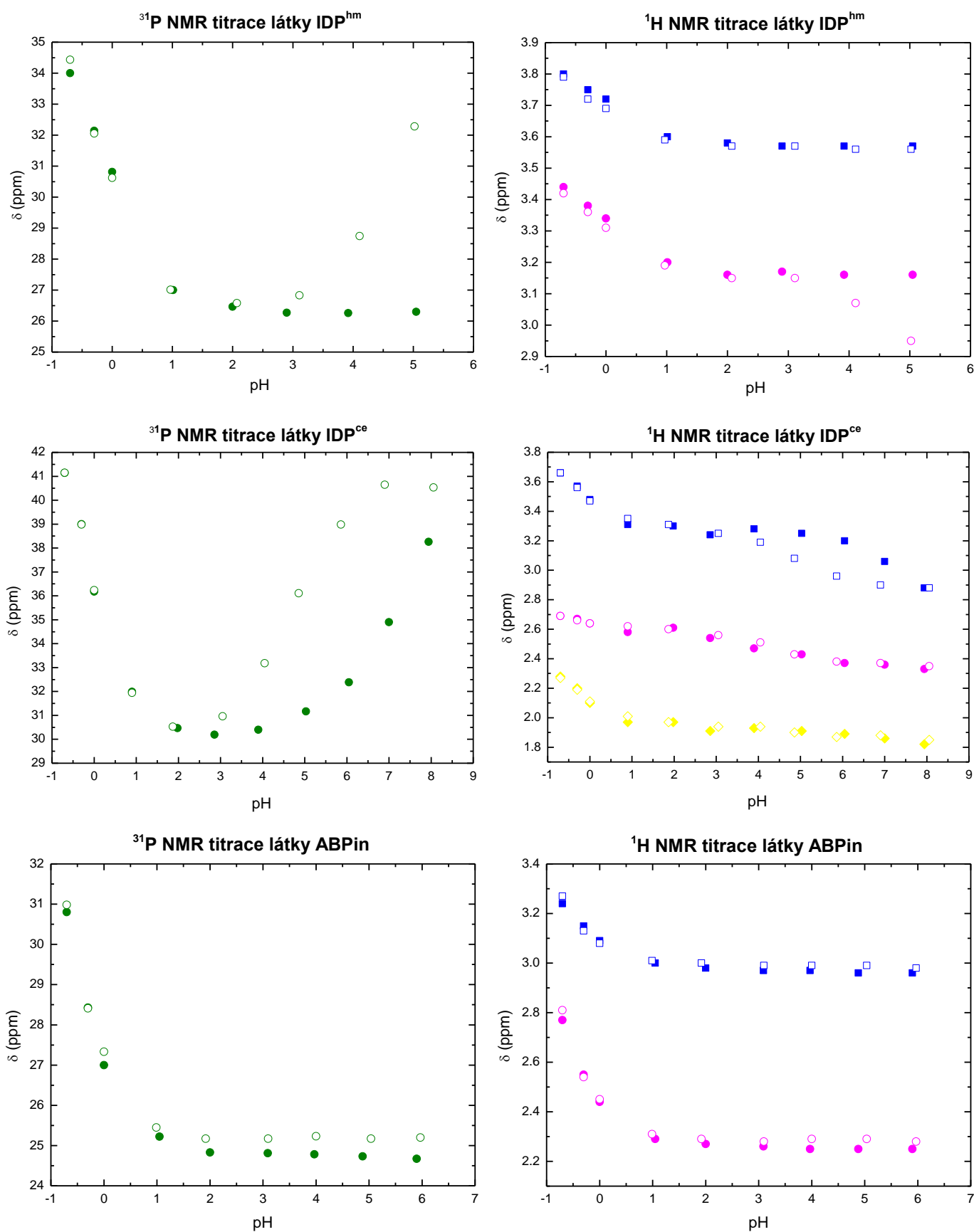
$$(c_{lig} = c_M = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}, I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3, 25 \text{ }^\circ\text{C})$$



Obr. 19 Distribuční diagramy systémů **PheOHABPin**–kov a **ABPin**–kov v poměrech 1:1
(pokračování); ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

3.3. NMR TITRACE

Koordinační chování ligandů v roztoku bylo dále studováno pomocí NMR. Výsledky NMR titrací jsou zobrazeny na **Obr. 20**. NMR měření probíhalo v roztoku volného ligandu a v systému ligand–kov (M:L 1,1:1). Ligandy tvoří se Zn²⁺ ionty slabé komplexy. Proto docházelo ve všech případech k tvorbě sraženiny (u **IDP^{hm}** při pH 5, u **IDP^{ce}** při pH 8 a u **ABPin** při pH 6) a titrace musely být předčasně ukončeny.



Obr. 20 ^{31}P a ^1H NMR titrace volných ligandů (plné symboly) a systémů ligand- Zn^{2+} (prázdné symboly); ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

Snížení chemických posunů na ^{31}P NMR i ^1H NMR titračních křivkách v silně kyselé oblasti (do pH 2) je způsobeno deprotonizací fosfinátových skupin. Od pH 2 do konce titrací je na titračních křivkách volných ligandů vidět plató vyjma ligandu IDP^{ce} , kde dochází ke změnám chemických posunů díky deprotonizaci karboxylátových skupin.

Rozdíly v chemických posunech mezi titračními křivkami volného ligandu a systémů ligand- Zn^{2+} jsou projevem tvorby komplexů. Při pohledu na ^{31}P NMR titrační křivky látek IDP^{hm} a IDP^{ce} je patrná odlišnost křivek při pH > 3, která odpovídá deprotonizaci a koordinaci atomu dusíku. Na ^1H NMR titračních křivkách je tato změna patrná pouze na signálech vodíků N- CH_2 -P uskupení. Posuny signálů vodíků P- CH_2 -OH (u látky IDP^{hm}) a P- CH_2 - CH_2 -COOH (u látky IDP^{ce}) se v přítomnosti kovu nemění, což napovídá, že hydroxomethylová resp. karboxyethylová skupina se v kyselé oblasti komplexace neúčastní.

U látky **ABPin** nejsou rozdíly v chemickém posunu pozorované od pH 0 do pH 6 při porovnání ^{31}P NMR a ^1H NMR titračních křivek natolik výrazné, aby jednoznačně prokazovaly koordinaci.

3.4. ACIDOBAZICKÉ A KOORDINAČNÍ CHOVÁNÍ V ROZTOKU

Pro bazicitu aminokyselin platí obecný trend: aminofosfonáty > aminokarboxyláty > aminofosfináty (**Tab. 9**). Fosfinátová skupina odtahuje elektronovou hustotu z atomu dusíku a tím usnadňuje disociaci atomu vodíku, čímž je snížena hodnota disociační konstanty aminoskupiny. Pokud je v poloze α více fosfinátových skupiny, je jejich $-I$ efekt ještě patrnější. Srovnání s jednoduchými analogy (**Tab. 9**) ukazuje, že bazicita připravených difosfinátů (**IDP^{hm}** a **IDP^{ce}**) odpovídá tomuto trendu. Tyto látky, které obsahují ve své molekule dvě fosfinátové skupiny, vykazují výrazné snížení bazicity atomu dusíku oproti jednoduchým aminofosfinátům.

Tab. 9 Protonizační konstanty studovaných α -aminofosfinátů a podobných sloučenin ($I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Pro přehlednost jsou vynechány náboje.

	IDP^{hm}	IDP^{ce}	PhOHABPin	ABPin	Gly(P^{tBu})^a	AM₂P^b	Gly(P)^c	Gly^d	IDA^e
pK_a(HL)	6,94	5,44	9,84	9,49	8,42	8,51	10,05	9,56	9,34
pK_a(H₂L)	0,92	4,25	8,55	8,80	1,20	7,07	5,39	2,36	2,62
pK_a(H₃L)	–	1,86	< 1	2,09	–	0,77	0,40	–	1,77
pK_a(H₄L)	–	1,01	–	–	–	–	–	–	–

^a **Gly(P^{tBu})** – kyselina aminomethyl(*t*-butyl)fosfinová⁷⁸; ^b **AM₂P** – kyselina bis(aminomethyl)fosfinová¹⁰; ^c **Gly(P)** – kyselina (aminomethyl)fosfinová⁵⁴; ^d **Gly** – glycín⁵⁴; ^e **IDA** – kyselina iminodictová⁵⁴

Studované bis(aminomethylfosfináty) však z výše zmíněného trendu vybočují. Hodnoty jejich disociačních konstant jsou vyšší než u ostatních aminofosfinátů a jsou dokonce srovnatelné s hodnotami aminokarboxylátů. U hodnoty disociační konstanty druhé aminoskupiny v molekule aminobis(fosfinátu) (**pK_a(H₂L)**) nedochází k tak razantnímu snížení jako v případě **AM₂P**, protože v terminálních aminobis(fosfinátech) jsou jednotlivé aminoskupiny od sebe více vzdáleny a vzájemně se méně ovlivňují.

Nezvykle vysoká je i hodnota disociační konstanty fosfinátové skupiny (**pK_a(H₃L)**) bis(aminomethylfosfinátu) **ABPin**. Pokud ji srovnáme s hodnotou zjištěnou u druhého bis(aminomethylfosfinátu) **PheOHABPin**, je zřejmé, že její hodnota je ovlivněna substituenty na centrálním atomu uhlíku. U **ABPin** jsou na centrální atom uhlíku navázány pouze atomy vodíku, které do systému přinášejí elektrony ($+I$ efekt), čímž zvyšují hodnotu disociační konstanty. Kdežto fenylová a hydroxylová funkční skupina u **PheOHABPin** elektrony

z centrálního atomu odtahuje ($-I$ efekt) a tím způsobuje snížení hodnoty disociační konstanty oproti nesubstituovanému analogu.

Pořadí hodnot konstant stability pro jednotlivé komplexy s ionty kovů odpovídá Irwing-Williamsově řadě (**Tab. 10**). Nejstabilnější komplexy tvoří ligandy s ionty Cu^{2+} . Hodnoty konstant stability komplexů s ionty Zn^{2+} a Ni^{2+} jsou si blízké a celkově nižší než pro ionty Cu^{2+} .

Tab. 10 Konstanty stability $\log\beta(\text{ML})$ komplexů studovaných α -aminofosfinátů a podobných sloučenin ($I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Pro přehlednost jsou vynechány náboje.

	IDP^{hm}	IDP^{ce}	PhOHABPin	ABPin	Gly(P^{tBu})^a	AM₂P^b	Gly(P)^c	Gly^d	IDA^e
Cu²⁺	6,51	4,36	11,13	9,87	5,37	7,64	8,12	8,12	10,56
Zn²⁺	3,84	3,02	6,51	6,29	–	4,12	5,00	4,96	7,15
Ni²⁺	4,08	3,02	7,13	7,51	3,62	5,58	5,25	5,78	8,3

^a **Gly(P^{tBu})** – kyselina aminomethyl(*t*-butyl)fosfinová⁷⁸; ^b **AM₂P** – kyselina bis(aminomethyl)fosfinová¹⁰; ^c **Gly(P)** – kyselina (aminomethyl)fosfinová⁵⁴; ^d **Gly** – glycin⁵⁴; ^e **IDA** – kyselina iminodioctová⁵⁴

Mezi aminokyselinami tvoří nejstabilnější komplexy aminofosfonáty, komplexy aminokarboxylátů jsou méně stabilní a nejnižší stabilitu vykazují aminofosfináty. Připravené difosfináty (**IDP^{hm}** a **IDP^{ce}**), jejichž disociační konstanty aminoskupiny jsou velmi nízké, tvoří rovněž jen slabé komplexy. Z této závislosti vybočují studované bis(aminomethylfosfináty) **PhOHABPin** a **ABPin**, jejichž zjištěné hodnoty konstant stability komplexů s ionty kovů jsou dokonce vyšší než obdobné konstanty aminofosfonátů. Zvýšení stability komplexů bis(aminomethylfosfinátů) je dáno vysokými hodnotami disociačních konstant obou aminoskupin (**Tab. 9**).

Prostřednictvím ^1H a ^{31}P NMR titrací byla u některých dříve připravených aminofosfinátů pozorována koordinace na centrální iont pouze pomocí fosfinátové skupiny.¹⁰ Podobné chování se dalo očekávat i u studovaných látek. Protože však v oblasti, kde dochází k deprotonizaci fosfinátových skupin ($\text{pH} < 2$), nebyl pozorován ani na jedné titrační křivce významný rozdíl mezi chemickými posuny roztoku volného ligandu a systému ligand–kov, nebyla koordinace fosfinátové skupiny na centrální iont prokázána. Nicméně se potvrdilo, že celkové chování látek při NMR titracích je v souladu s výsledky potenciometrických titrací a tvorba komplexu odpovídá distribučním diagramům systémů **IDP^{hm}–Zn²⁺**, **IDP^{ce}–Zn²⁺** a **ABPin–Zn²⁺**.

4. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly připraveny a studovány nové látky ze skupiny α -aminofosfinátů: aminodifosfináty – kyselina aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinová) (**IDP^{hm}**), kyselina aminobis(methyl(2-karboxyethyl)fosfinová) (**IDP^{ce}**) a bis(aminomethylfosfináty) – kyselina (hydroxy(fenyl)methylen)bis(aminomethylfosfinová) (**PheOHABPin**), kyselina (methylen)bis(aminomethylfosfinová) (**ABPin**).

Difosfináty byly syntetizovány reakcí Mannichovského typu, kdežto příprava bis(aminomethylfosfinátů) představovala několikastupňovou syntézu probíhající přes reaktivní silylestery. Látky byly připraveny ve středně vysokém až vysokém výtěžku.

Pomocí potenciometrických a NMR titrací byly zkoumány acidobazické a koordinační vlastnosti studovaných látek. Byly určeny disociační konstanty a konstanty stability komplexů jednotlivých ligandů s ionty Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} a Ga^{3+} . Rozhodující vliv na stabilitu vznikajících komplexů má hodnota bazicity aminoskupiny. Čím vyšší je disociační konstanta aminoskupiny, tím má látka lepší komplexační schopnosti. Difosfináty **IDP^{hm}** a **IDP^{ce}** s velmi nízkou bazicitou aminoskupiny tvořily slabé komplexy, kdežto u bis(aminomethylfosfinátů) **PheOHABPin** a **ABPin** se díky zvýšené bazicitě aminoskupiny prokázaly dobré komplexační schopnosti.

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABPin	kyselina (methylen)bis(aminomethylfosfinová)
ACE	angiotensin-konvertující enzym
Ala	alanin
AM ₂ P	kyselina bis(aminomethyl)fosfinová
ATP	adenosintrifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
EA	elementární analýza
ekv.	ekvivalent
ESI	ionizace elektrosprejem
Et ₃ N	triethylamin
EtOH	ethanol
HMDS	hexamethylidisilazan
IDA	kyselina iminodioctová
IDP ^{hm}	kyselina aminobis(methyl(hydroxymethyl)fosfinová
IDP ^{ce}	kyselina aminobis(methyl(2-karboxyethyl)fosfinová
L	ligand
M	kov
MRI	magnetická rezonanční tomografie
MS	hmotnostní spektrometrie
NMe ₄ Cl	tetramethylamonium chlorid
NMe ₄ OH	tetramethylamonium hydroxid
NMR	nukleární magnetická rezonance
PET	pozitronová emisní tomografie
PheOHABPin	kyselina (hydroxy(fenyl)methylen)bis(aminomethyl- fosfinová)
PLP	pyridoxal-5'-fosfát
RT	laboratorní teplota
RTG	rentgenová strukturní analýza
SPECT	jednofotonová emisní tomografie
<i>t</i> -BuOH	<i>terc</i> -butanol
TLC	tenkovrstvá chromatografie

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 Greenwood N. N., Aernshaw A.; *Chemistry of the Elements 2nd ed.*, Elseviere Science, Oxford **2002**
- 2 Horiguchi M., Kandatsu M.; *Nature* **1959** 184 901
- 3 Baer E., Stanacev N. Z.; *J. Biol. Chem.* **1964** 239 3209
- 4 Voet D., Voet J. G.; *Biochemistry 3rd ed.*, Wiley, New York **2004**
- 5 Kukhar V. P., Hudson H. R.; *Aminophosphonic and aminophosphinic Acids Chemistry and Biological Activity*, Wiley, Chichester **2000**
- 6 Tan S. A., Tan L. G.; *Clin. Physiol. BioChem.* **1989** 7 303
- 7 Hansen H. I., Kehler J.; *Synthesis* **1999** 11 1925
- 8 Engel R.; *Synthesis of Carbon-Phosphorus Bond*, CRC, Press **1998**
- 9 Mucha A., Kafarski P., Berlicki L.; *J. Med. Chem.* **2011** 54 5955
- 10 Kubiček V., Vojtišek P., Rudovský J., Hermann P., Lukeš I.; *Dalton Trans* **2003** 3927
- 11 Badet B., Inagaki K., Soda K., Walsh C. T.; *Biochemistry* **1986** 25 3275
- 12 Stamper C. G. F., Morollo A. A., Ringe D.; *Biochemistry* **1998** 37 10438
- 13 Au K., Ren J., Walter T. S., Harlos K., Nettleship J. E., Owens R. J., Stuart D. I., Esnouf R. M.; *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2008** 64 327
- 14 Krajewska B.; *J. Mol. Katal. B* **2009** 59 9
- 15 Mobley H. L. T., Island M. D., Hausinger R. P.; *Microbiol. Rev.* **1995** 59 451
- 16 Burne R. A., Chen Y. M.; *Microbes Infect.* **2000** 2 533
- 17 Follmer C.; *J. Clin. Pathol.* **2010** 63 424
- 18 Kosikowska P., Berlicki L.; *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011** 21 945
- 19 Amtul Z., Atta-ur-Rahman, Siddiqui R. A., Choudhary M. I.; *Curr. Med. Chem.* **2002** 9 1323
- 20 Pope A. J., Toseland C. D., Rushant B., Richardson S., McVey M., Hills J.; *Dig. Dis. Sci.* **1998** 43 109
- 21 Vassiliou S., Grabowiecka A., Kosikowska P., Yiotakis A., Kafarski P., Berlicki L.; *J. Med. Chem.* **2008** 51 5736
- 22 Berlicki L., Bochno M., Grabowiecka A., Bialas A., Kosikowska P., Kafarski P.; *Amino Acids* **2012** 42 1937
- 23 McKittrick B. A., Stamford A. W., Weng X., Ma K., Chackalamannil S., Czarniecki M., Cleven R. M., Fawzi A. B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996** 6 1629

- 24 Abdel-Meguid S. S., Zhao B., Murthy K. H. M., Winborne E., Choi J. K., DesJarlais
R. L., Minnich M. D., Culp J. S., Debouck C.; *Biochemistry* **1993** 32 7972
- 25 Baird D. D., Upchurch R. P., Homesley W. B., Franz J. E.; *Proc. North Cent. Weed
Control Conf.* **1971** 26 64
- 26 Rupp W., Finke M., Bieringer H., Langelüddeke P.; *Ger. Offen.* **1977** 2 717 440
- 27 Bayer E., Gugel K. H., Hägele K., Hägenmaier H., Jessipow S., König W. A.,
Zähner H.; *Helv. Chim. Acta* **1972** 55 224
- 28 Lukeš I., Bartoníček R., Zelenka P., Šíp M.; A. O. 265354 **1990** Czech
- 29 Bartoníček R., Lukeš I., Němcová J., Zelenka P.; A. O. 259097 **1990** Czech
- 30 Lukeš I., Kotek J., Vojtíšek P., Hermann P.; *Coord. Chem. Rev.* **2001** 216-217 287
- 31 Appleton T. G., Hall J. R., Harris A. D., Kimlin H. A., McMahon I. J.; *Aust. J. Chem.*
1984 37 1833
- 32 Wozniak M., Noworogrocki G.; *Talanta* **1979** 26 1135
- 33 Wozniak M., Noworogrocki G.; *Bull. Soc. Chim. France* **1978** 3-4 I-153
- 34 Řehoř I.; *Diplomová práce*, PřF UK v Praze, Praha **2006**
- 35 Fleisch H.; *Bisphosphonates in Bone Disease*, Academia Press, London **2000**
- 36 Fleisch H.; *Endocr. Rev.* **1998** 19 80
- 37 Neville-Webbe H. L., Holen I., Coleman R. E.; *Cancer Treat. Rev.* **2002** 28 305
- 38 Russell R. G. G., Rogers M. J.; *Bone* **1999** 25 97
- 39 Bagi C. M.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005** 57 995
- 40 Kubiček V.; *PhD. Thesis*, PřF UK v Praze, Praha **2007**
- 41 Rogers M. J., Gordon S., Benford H. L., Coxon F. P., Luckman S. P., Monkkonen J.,
Frith J. C.; *Cancer* **2000** 12 2961
- 42 Wang D., Miller S. C., Kopečková P., Kopeček J.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005** 57
1049
- 43 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 Academic Press San Diego **2002** 1361
- 44 Bergstrom J. D., Bostedro R. G., Masarachia P. J., Reszka A. A., Rodan G.; *Arch.
Biochem. Biophys.* **2000** 373 231
- 45 van Beek E., Pieterman E., Cohen L., Lowik C., Papapoulos S.; *Biochem. Biophys. Res.
Commun.* **1999** 264 108
- 46 Rogers M. J., Watts D. G., Russel R. C. G.; *Cancer* **1997** 80 1652
- 47 Deutsch E., Libson K., Jurisson S., Lindoy L. F.; *Prog. Inorg. Chem.* **1983** 30 75

- 48 Adzamli I. K., Gries H., Johnson D., Blau M.; *J. Med. Chem.* **1989** 32 139
- 49 An Y. S., Yoon J. K., Lee M. H., Joh C. W., Yonn S. N.; *Clin. Nucl. Med.* **2004** 29 723
- 50 Kawamura E., Kawabe J., Hayashi T., Oe A., Kotani J., Torri K., Habu D., Shiomi S.;
Clin. Nucl. Med. **2005** 30 351
- 51 Mackie G. C.; *Clin. Nucl. Med.* **2003** 30 351
- 52 MacDonald W. B. G., Troedson R. G.; *Clin. Nucl. Med.* **2001** 26 455
- 53 Wang D., Miller S. C., Kopečková P., Kopeček J.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005** 57
1049
- 54 NIST Standard Reference Database 46 (Critically Selected Stability Constants of Metal
Complexes) Version 8.0 **2004**
- 55 Anderson C. J., Welch M. J.; *Chem. Rev.* **1999** 99 2219
- 56 Herzog H.; *Pharm. Userer Zeit* **2005** 34 (6) 468
- 57 Banwell C. N., McCash E. M.; *Fundamentals Of Molecular Spectroscopy* 4th ed.,
The McGraw-Hill Publishing Company, London **1994**
- 58 Blower P. J., Lewis J. S., Zweit J.; *Nucl. Med. Biol.* **1996** 23 957
- 59 Kotek J., Lubal P., Hermann P., Císařová I., Lukeš I., Godula T., Svobodová I.,
Táborský P., Havel J.; *Chem. Eur. J.* **2003** 9 233
- 60 Kubíček V., Rudovský J., Kotek J., Hermann P., Ven der Elst L., Muller R. N., Kolar Z.
I., Wolterbeek H. T., Peters J. A., Lukeš I.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005** 127 16477
- 61 Notni J., Hermann P., Halíčková J., Kotek J., Kubíček V., Plutnar J., Loktionova N.,
Riss P. J., Rösch F., Lukeš I.; *Chem.-Eur. J.* **2010** 16 7174
- 62 Tanwar J., Datta A., Tiwari A. K., Thirumal M., Chuttani K., Mishra A. K.;
Bioconjugate Chem. **2010** 22 244
- 63 Lacerda S., Marques F., Campello P., Gano L., Kubíček V., Hermann P., Santos I.; *J.*
Labelled Compd. Radiopharm. **2010** 53 36
- 64 Boswell C. A., Regino C. A., Baidoo K. E., Wong K. J., Milenic D. E., Kelly J. A., Lai
C. C., Brechbiel M. W.; *Bioorg. Med. Chem.* **2009** 17 548
- 65 Šimeček J., Schulz M., Notni J., Plutnar J., Kubíček V., Havlíčková J., Hermann P.;
Inorg. Chem. **2012** 51 577
- 66 Řezanka P., Kubíček V., Hermann P., Lukeš I.; *Synthesis* **2008** 9 1431
- 67 a) Otwinovski Z., Minor W.; *HLK DENZO and Scalepack Program package*, Nonius
BV, Delft **1997** b) Otwinovski Z., Minor W.; *Methods Enzymol.* **1997** 276 307
- 68 Altomare A., Burla M. C., Camalli M., Cascarano G., Giacavazzo C., Guagliardi A.,
Polidori G.; *J. Appl. Crystallogr.* **1994** 27 435

- ⁶⁹ Sheldrick G. M.; *SHELXL97* [Program for Crystal Structure Refinement from Diffraction Data] University of Göttingen, Göttingen **1997**
- ⁷⁰ Kývala M., Lukeš I.; *International Conference, Chemometrics '95*, p. 63, Pardubice, Czech Republic, **1995**
- ⁷¹ Baes C. F. Jr., Mesmer R. E.; *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, New York **1976**
- ⁷² Dhawan B., Redmore D.; *J. Chem. Research* **1988** 34
- ⁷³ Pniok M.; *Diplomová práce PřF UK v Praze Praha* **2011**
- ⁷⁴ Bujard M., Gouverneur V., Mioskowski C. J.; *J. Org. Chem.* **1999** 64 2119
- ⁷⁵ Majewski P.; *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **1989** 45 151
- ⁷⁶ Regan A. C., Sciammetta N., Tattersall P. I.; *Tetrahedron Lett.* **2000** 41 8211
- ⁷⁷ Chen S., Coward J. K.; *J. Org. Chem.* **1998** 63 502
- ⁷⁸ Rohovec J., Lukeš I., Vojtíšek P., Císařová I., Hermann P.; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1996** 2685

PODĚKOVÁNÍ

Nejvíce nejlepšimu Vojtovi patří i nejvíce nejlepší poděkování. Během práce byl nejen výborným školitelem, ale stal se mi i dobrým přítelem, na kterého jsem se kdykoliv mohla obrátit s jakýmkoliv chemickým i nechemickým problémem. Děkuji za všechny čas, trpělivost, neskonalou péči a vstřícnost, kterou mi věnoval a za nezapomenutelné konzultace.

Dále děkuji Sandrovi za vedení během práce s bis(fosfináty). Byl nejlepším otrokářem, jakého jsem si mohla přát.

Nezměrný dík si zaslouží Dr. Jana Havlíčková, která mě zasvětila do problematiky potenciometrických titrací a nechala nahlédnout do tajů hrátek s "OPIEM".

Za měření NMR a MS spekter děkuji Sandrovi, Hobovi, panu Mírovi, Ondrovi, BJ a Honzovi B. Dále všem kolegům patří dík za vytvoření příjemného pracovního prostředí a udržování vřelých vztahů v laboratoři.

Děkuji Dr. Ivaně Císařové za naměření rentgenové struktury a Doc. Honzovi Kotkovi za její vypřesnění.

Děkuji Prof. Petru Hermannovi za velké množství podnětných rad a připomínek.

Děkuji Doc. Pavlu Vojtíškovu za ochotu práci oponovat.

Na závěr bych ráda poděkovala rodině a přátelům za vytvoření skvělého zázemí po celou dobu mého studia.