

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Jaderná chemie



Bc. Martina Benešová

Bifunkční chelatanty dvojmocné mědi
Bifunctional ligands for copper(II) complexation

Diplomová práce

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D

Praha, 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného grantu GAČR
P207/11/1437.

*„Učenec v laboratoři není jen odborník, je to dítě, které hledí na vědu jako na
pohádku. Vidí ve vědě krásu.“*

Marie Skłodowska-Curie

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Kotka, Ph.D, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. 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. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 28. srpna 2012

Martina Benešová

Název: Bifunkční chelatanty dvojmocné mědi

Řešitel: Bc. Martina Benešová

Školitel: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D

Ústav: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, UK v Praze

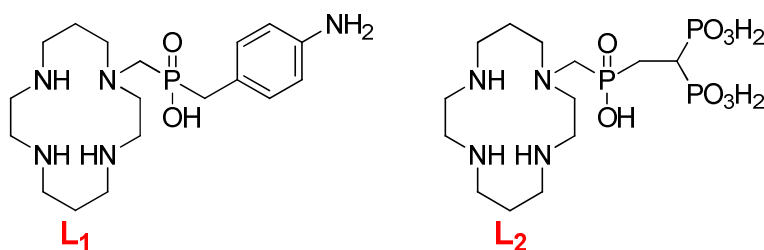
E-mail autora: EvaGlaser@seznam.cz

ABSTRAKT

Hlavním cílem této práce byla příprava a studium vlastností makrocyclických ligandů založených na 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekanovém skeletu, jež je vhodný pro komplexaci dvojmocných kationtů mědi. Design těchto ligandů je navržen s ohledem na jejich potenciální užití v nukleární medicíně.

Cyklamový makrocyklus byl navržen tak, aby nesl jedno koordinující se aminobenzylfosfinátové pendantní rameno (sloučenina **L₁**) a nebo monofosfinátové-bis(fosfonátové) pendantní rameno (sloučenina **L₂**). V průběhu syntézy byl skelet ochráněn v polohách 1, 4 a 8.

V rámci této práce byla nalezena cesta k syntéze obou cílených produktů. Dále byly studovány termodynamické, kinetické a koordinační vlastnosti ligandu **L₂** pomocí UV/VIS spektrofotometrie a potenciometrických titrací. Rovněž byla ověřena modelová biokonjugace ligandu **L₁** s primárním aminem.



KLÍČOVÁ SLOVA

Cyklam, fosfináty, fosfonáty, nukleární medicína, měďnaté komplexy, kinetická inertnost, termodynamická stabilita.

Title: Bifunctional ligands for copper(II) complexation

Author: Bc. Martina Benešová

Supervisor: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Institution: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, CU in Prague

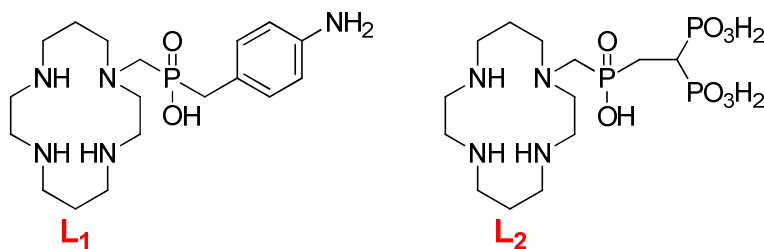
Author's e-mail: EvaGlaser@seznam.cz

ABSTRACT

The main aim of this thesis was preparation of macrocyclic ligands based on 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane skeleton, which is suitable for selective complexation of divalent copper, and study of their properties. These ligands are suggested for potential utilization in nuclear medicine.

Cyclam macrocycle was modified to bear one coordinating aminobenzylphosphinate pendant arm (compound **L₁**) or monophosphate-bis(phosphonate) pendant arm (compound **L₂**). During the synthesis, the skeleton was protected in positions 1, 4 and 8.

In the frame of this work the synthesis of both targeted products was developed. Furthermore, a study of the thermodynamic, kinetic and coordination properties of ligand **L₂** was investigated by UV/VIS spectrophotometry and potentiometric titrations. A model bioconjugation of ligand **L₁** with primary amine was also studied.



KEYWORDS

Cyclam, phosphinates, phosphonates, nuclear medicine, copper(II) complexes, kinetic inertness, thermodynamic stability.

OBSAH

1.	TEORETICKÝ ÚVOD	8
1.1	Nukleární medicína a její využití	8
1.1.1	Radioterapeutika	9
1.1.2	Radiodiagnostika	11
1.1.3	Radiofarmaka	14
1.2	Měď	15
1.2.1	Vlastnosti a použití mědi	16
1.2.2	Izotopy mědi a jejich aplikace v medicíně	16
1.3	Fosfor	18
1.3.1	Medicínské aplikace a význam pro lidský organizmus	19
1.3.2	Bis(fosfonáty)	20
1.3.3	Fosfinové kyseliny	20
1.4	Ligandy vhodné pro komplexaci mědi	21
1.4.1	Polyazamakrocykly	21
1.4.2	Polyaminokarboxyláty	22
1.4.3	Makrocyclické polyaminofosfonáty a polyaminofosfináty	23
1.4.4	Bis(thiosemikarbazony) a porfyriny	23
1.5	Biokonjugace	25
1.6	Teoretické pozadí a cíl práce	26
2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
2.1	Seznam použitých chemikálií	28
2.1.1	Reagencie	28
2.1.2	Rozpouštědla	29
2.1.3	Deuterovaná rozpouštědla	29
2.1.4	Iontoměniče a sorbenty	29
2.2	Metody charakterizace	30
2.2.1	Nukleární magnetická rezonance (NMR)	30
2.2.2	Hmotnostní spektrometrie (MS)	30
2.2.3	Tenkvrstvá chromatografie (TLC)	31
2.2.4	Spektrofotometrická měření	31
2.2.5	Potenciometrické titrace	32
2.2.6	Elementární analýza	33
2.2.7	Radiokomplexace	33
2.3	Syntéza	34
2.3.1	Příprava fosforových prekurzorů	36
2.3.2	Syntéza látky 1 (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan, cyklam)	44
2.3.3	Syntéza látky 2 (1,4,8-tris(trifluoracetyl)-1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan)	45
2.3.4	Navázání fosforového pendantu	46
2.3.5	Příprava látky L₁	51
2.3.6	Příprava látky L₂	55
2.4	Modelová biokonjugace ligandu L₁	57
2.5	Termodynamické vlastnosti komplexů	58
2.5.1	Potenciometrické titrace ligandu L₂	58
2.6	Kinetické vlastnosti komplexů	58
2.6.1	Formační kinetika ligandu L₂	58

2.6.2	Disociační kinetika komplexu Cu–L ₂	61
2.6.3	Radiokomplexace ligandu L ₂ s ⁶¹ Cu	62
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	64
3.1	Příprava prekurzorů	64
3.1.1	Syntéza látky I.....	64
3.1.2	Syntéza látky II	64
3.1.3	Syntéza látky III.....	65
3.1.4	Syntéza látky IV	66
3.1.5	Syntéza látky V.....	66
3.1.6	Syntéza látky VI.....	66
3.1.7	Syntéza látky 1	67
3.1.8	Syntéza látky 2	67
3.1.9	Mannichovy reakce.....	68
3.1.10	Syntéza látky L ₁	69
3.1.11	Syntéza látky L ₂	69
3.2	Modelová biokonjugace ligandu L ₁	70
3.3	Potenciometrické titrace ligandu L ₂	72
3.4	Formační a disociační kinetiky ligandu L ₂	78
3.4.1	Formační kinetiky ligandu L ₂	79
3.4.2	Disociační kinetiky ligandu L ₂	81
3.5	Radiokomplexace ligandu L ₂ s ⁶¹ Cu	84
4.	ZÁVĚR.....	89
5.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	90
6.	PODĚKOVÁNÍ.....	92
7.	POUŽITÁ LITERATURA	94
8.	PŘÍLOHY	99

Označení jednotlivých makrocyclických sloučenin zmiňovaných v textu je uvedeno ve **Schématu 1**. Kódové označení všech fosforových prekurzorů pro syntézu ligandů je vyobrazeno ve **Schématu 2**.

Schéma 1: Kódové označení makrocyclických sloučenin uvedených v textu

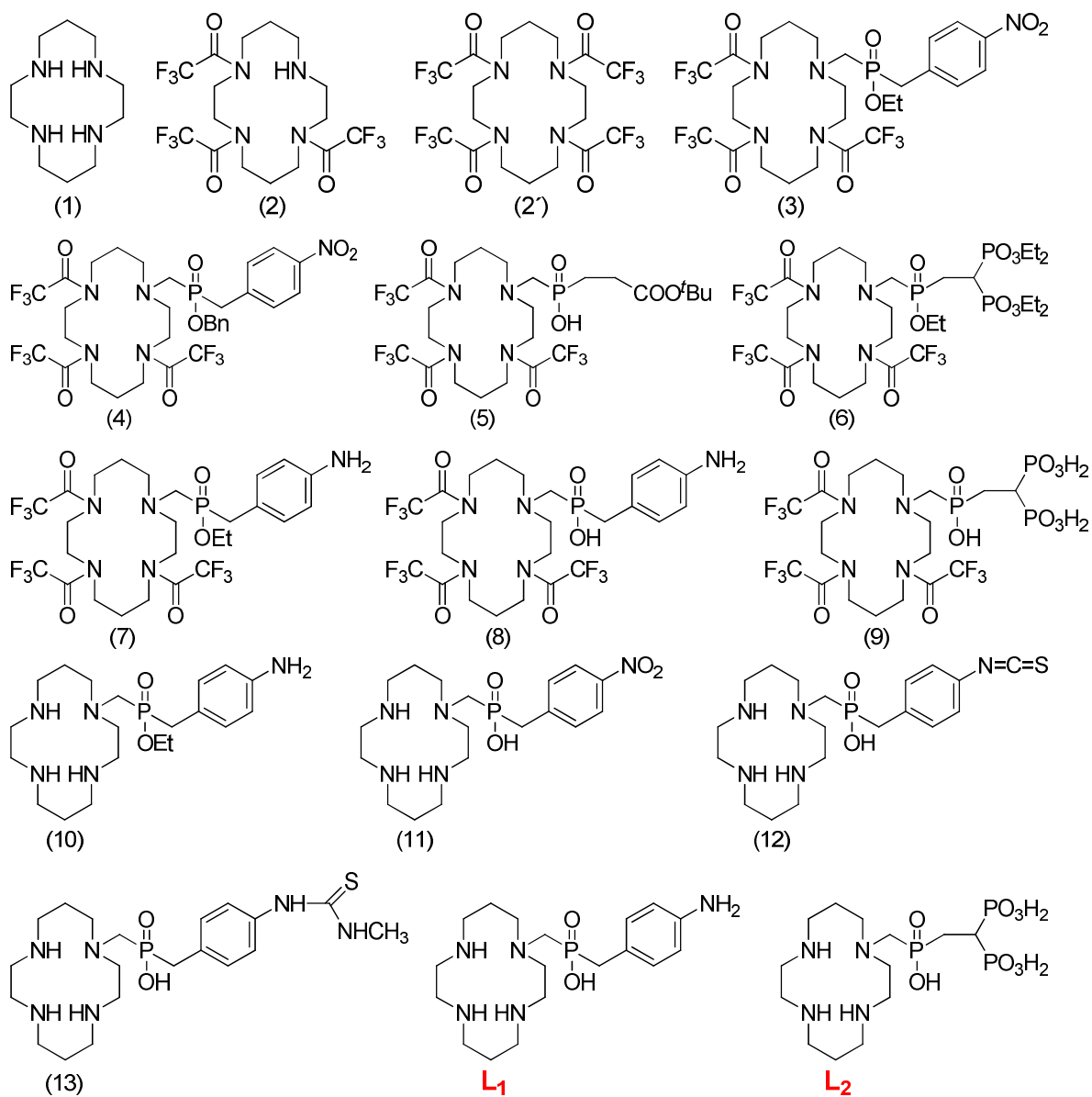
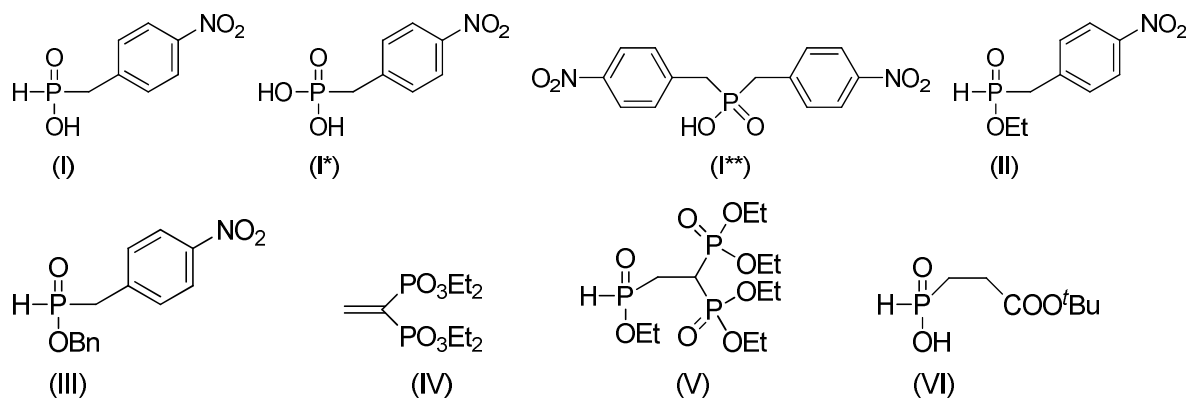


Schéma 2: Kódové označení fosforových prekurzorů uvedených v textu



1. TEORETICKÝ ÚVOD

Nukleární medicína nachází významné uplatnění především v diagnostice chorob, ve studiu jejich vzniku a průběhu a částečně i v jejich prevenci a terapii. Radionuklidy i ionizující záření se začaly využívat ve zdravotnictví prakticky již od počátku objevení jejich účinků na lidský organizmus, nejdříve k léčebným, později i diagnostickým účelům.

Studium radioaktivních izotopů mědi (především ^{64}Cu a ^{67}Cu) je stále více spojováno s jejich využitím v nukleární medicíně. Jedním z hlavních důvodů je jejich aplikovatelnost jak v zobrazovacích, tak i v terapeutických metodách.

1.1 Nukleární medicína a její využití

Nukleární medicína je definována jako speciální interdisciplinární lékařský obor, jež užívá vlastností radioaktivního záření za účelem diagnostiky a terapie chorob.^[1] Převážnou část její současné náplně tvoří zobrazovací diagnostika, v menší míře laboratorní diagnostika a léčba.^[2] Při terapii je metod nukleární medicíny užíváno k léčbě všech druhů rakoviny, k mírnění bolesti u rakoviny kostí nebo k léčbě onemocnění krve.^[3] Své uplatnění nachází rovněž ve vnitřním lékařství, pediatrii, ale také například v oboru psychiatrie.^[4]

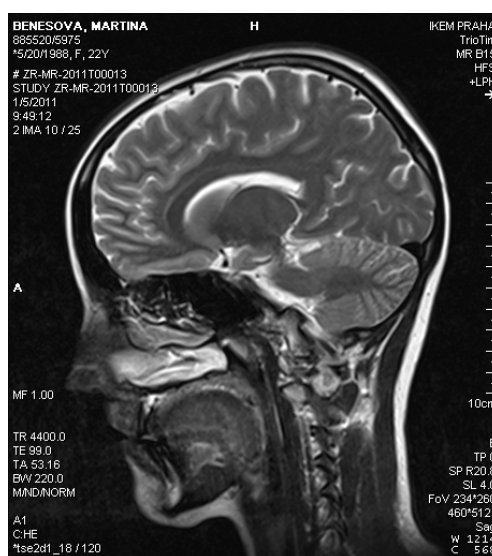
Metody nukleární medicíny jsou založeny na tzv. indikátorovém nebo stopovacím principu (*Tracer Principle*), který objevil maďarský chemik György Hevesy v roce 1913. Jeho podstatou je shodné chemické chování izotopů. Radioaktivní izotopy reagují chemicky stejně jako stabilní izotopy téhož prvku.^[5]

Mezi zobrazovací metody v nukleární medicíně patří scintigrafie a gamagrafie.^[6] Zobrazování pomocí tomografické scintigrafie patří mezi nejčastěji uplatňované metody nukleární medicíny pro diagnostiku chorob. Jedná se především o jednofotonovou emisní počítačovou tomografii SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) a pozitronovou emisní tomografii PET (*Positron Emission Tomography*).^[7] U obou metod se prostorová informace získává díky lokalizaci rozdílného množství radioaktivity v různých tkáních.^[8]

Počátkem 80. let byla mezi klinické radiologické metody zařazena i tomografie nukleární magnetickou rezonancí, která je dnes známá pod zkratkou MRI (*Magnetic Resonance Imaging*).^[9] Tento název získala později – díky nedůvěře veřejnosti ke slovu „nukleární“ bylo toto z názvu vypuštěno.^[10] Tato metoda je často stavěna do pomyslné

opozice vůči metodám tomografické scintigrafie. Na rozdíl od těchto metod nezatěžuje pacientův organismus vpravením radioaktivity. Dle uspořádání experimentu lze vytvořit obraz odpovídající hodnotám T_1 a T_2 relaxačních časů (**Obr.1**) nebo distribuci vody ve zkoumané tkáni.^[11] Kontrast plynoucí z rozdílných relaxačních časů T_1 a T_2 se dá s výhodou měnit aplikací tzv. kontrastní látky CA (*Contrast Agent*).^[12]

Obr.1: Sagitální řez autorčiny hlavy – T_2 vážený snímek



1.1.1 Radioterapeutika

Radioterapie je definovaná jako fyzikálně-medicínský obor využívající účinků ionizujícího záření na živou tkáň.^[1] Žádané změny může být dosaženo buďto v plném rozsahu, kdy dojde následkem terapie k úplnému vyléčení pacienta (tzv. kurativní terapie, z lat. *cura* = léčení), nebo se pouze pozastaví průběh onemocnění. V tomto případě se jedná o tzv. paliativní terapii (lat. *pallium* = plášť).^[7]

Ve většině případů se jedná především o terapii nádorových onemocnění. Nádorové buňky jsou vlivem záření usmrcovány nebo inaktivovány poškozením jejich DNA, což vede k zamezení jejich dalšího množení. Radioterapie nalézá využití také v léčbě degenerativních a zánětlivých onemocnění.^[1]

Hlavním cílem radioterapie je tedy selektivní likvidace nádorového ložiska. Terapeutické aplikace radionuklidů předpokládají vysokou absorpci v cílové tkáni při minimálním radiačním zatížení okolní zdravé tkáně. Nadměrná produkce záření je tedy krajně

nežádoucí.^[6] Terapeuticky používané radionuklidy emitují záření β^- , perspektivní jsou i některé zářiče alfa či emitory Augerových elektronů. Obecně se jedná o hmotné částice s krátkým dosahem. Nejnižší dosah v tkáni mají Augerovy elektrony (pod 25 nm). Naopak do největší vzdálenosti doputují elektrony produkované ^{90}Y (okolo 4 mm), což odpovídá přibližné vzdálenosti 200 buněk.^[13]

Výjimku tvoří smíšené (β^-/γ) zářiče, které mohou být využity k monitorování průběhu terapie.^[4] Zástupci smíšených zářičů z řady izotopů mědi mohou být izotopy ^{64}Cu (β^+/β^- a γ) nebo ^{67}Cu (β^-/γ). Nízkoenergetické fotony gama ^{67}Cu jsou emitovány při deexcitaci metastabilních izomerů jader zinku (dceřiného nuklidu).^[7] Vybrané radionuklidy vhodné pro využití v radioterapii jsou uvedeny v **Tab.1**.

Tab.1: Radionuklidy používané v radioterapii^[14]

Izotop	Typ rozpadu	Poločas rozpadu	Izotop	Typ rozpadu	Poločas rozpadu
^{32}P	β^-	14,3 d	^{153}Sm	β^-	46,0 h
^{67}Ga	Augerovy e^-/γ	3,3 d	^{166}Ho	β^-	27,0 h
^{67}Cu	β^-/γ	61,8 h	^{177}Lu	β^-	6,7 d
^{77}Br	β^-	57,0 h	^{186}Re	β^-	3,7 d
^{89}Sr	β^-	50,5 d	^{188}Re	β^-	17,0 h
^{90}Y	β^-	64,0 h	^{211}At	α	7,2 h
^{111}Ag	β^-	7,5 d	^{212}Bi	α	10,0 d
^{131}I	β^-	8,0 d	^{225}Ac	α	1,1 h

Podle způsobu aplikace radioaktivity do cílového místa se radioterapeutika metodicky dělí na tři oblasti. Těmi jsou teleterapie, brachyterapie a radioizotopová terapie.

Teleterapie (EBRT – *External Beam RadioTherapy*) využívá ozařování svazky záření z vnějšího ozařovače. Díky fokusaci mnoha svazků paprsků přímo do oblasti nádoru nedochází k poškození okolní tkáně. Radiační zatížení se tak vyhne citlivým oblastem jako je optický nerv, oční čočka či mozkový kmen. Zdrojem vysokoenergetického γ -záření je ^{60}Co s hodnotami energií 1,17 a 1,33 MeV.^[7] Do oblasti teleterapie spadá unikátní radiochirurgický přístroj známý jako Leksellův gama nůž (*Leksell Gamma Knife*).^[7] Používá se při odstraňování nitrolebních lézí, cévních malformací a nádorů v mozku.^[15] Nově se dá tímto přístrojem léčit epilepsie či Parkinsonova choroba.^[16] Leksellův gama nůž byl instalován v pražské nemocnici Na Homolce.^[15] V současnosti se zde provede více než 800 zákroků ročně, což je třikrát více než mezinárodní průměr.^[17]

Brachyterapie spočívá v aplikaci uzavřených radionuklidových zářičů punkcí nebo implantací přímo do cílové tkáně či do její těsné blízkosti.^[7] Při brachyterapii se využívá ^{60}Co , ^{137}Cs , ^{192}Ir či ^{226}Ra v podobě jehel nebo zrn.^[14]

Radioizotopová terapie je založena na aplikaci otevřených zářičů, ve vhodné chemické formě, přímo do organismu.^[7] Vlastní činidlo je následně distribuováno krevním řečištěm do cílového místa. Je nutné, aby poločas rozpadu použitého radioizotopu byl dostatečně dlouhý s ohledem na dobu jeho migrace z krevního oběhu do patologické tkáně.^[15]

1.1.2 Radiodiagnostika

Do oblasti radiodiagnostického stanovení spadají metody planární (2D) a tomografické (3D) scintigrafie. Anatomické zobrazení radiodiagnostickými metodami umožňuje vizuálně hodnotit např. zlomeninu kosti, zúžení cévy, velikost cysty nebo rozsah nádoru. Funkční scintigrafické zobrazení naproti tomu umožňuje zobrazit např. hypoxii, zánět, perfúzi, koncentraci receptorů, přestavbu kosti, intenzitu glykolýzy, vazbu protilátky s antigenem, apod.^[4] Lapidárně lze scintigrafii vymežit konstatováním, že je jedinou metodou, která zobrazuje pouze živou tkáň. Neživou tkáň scintigraficky zobrazit nelze. Velikost lokální akumulace radiofarmaka záleží na intenzitě místních metabolických a funkčních dějů. Případné poruchy funkce lze nejen lokalizovat, ale i často kvantifikovat. Poruchy funkce v mnoha případech předcházejí poruchám struktury. Proto lze patologické děje odhalit metodami nukleární medicíny zpravidla dříve než jinými zobrazovacími postupy. Tyto metody se vyznačují také tím, že vyvolávají minimální interakci záření s tkání.^[18]

Nejstarší a nejjednodušší vyšetřovací metodou je RTG. Užívá Roentgenovo záření o krátké vlnové délce. Při průchodu záření tkání dojde k jeho zeslabení, které je úměrné tloušťce a hustotě prozařované hmoty. K vyhodnocení a zviditelnění prošlého záření se používá např. fotografický papír nebo fotografická deska obsahující halogenidy stříbra. Vzniklý obraz představuje negativní zobrazení hustoty tkáně. Kombinaci klasického Roentgenova vyšetření doprovázeného počítačovým systémem nazýváme počítačovou tomografií (CT – *Computed Tomography*). Obecně je Roentgenovo záření absorbováno měkkými tkáněmi jen velmi slabě, z tohoto důvodu je obtížné rozlišit zdravou měkkou tkáň od tkáně patologické, proto tyto metody neposkytují vysoké rozlišení.^[3]

Mezi nejvýznamnější metody tomografické scintigrafie patří SPECT a PET.

SPECT – Jednofotonová emisní počítačová tomografie (*Single Photon Emission Computed Tomography*). Metoda je založena na detekci fotonů o energii přibližně 100–200 keV emitovaných γ -zářiči. Při vyšetření rotuje detekční scintilační kamera okolo těla pacienta a snímá scintigrafické obrazy z různých úhlů (0–360°). Tok fotonů je převáděn na elektrické impulsy, z nichž se vytváří scintigrafický obraz distribuce radiofarmaka. Vzniklé γ -záření je emitováno všemi směry, a proto se při snímání scintigrafického obrazu zavádí tzv. kolimační projekce. Záření je vystaveno kolimátoru (olověná deska s drobnými rovnoběžnými otvory), díky kterému projdou pouze fotony rovnoběžné s otvory kolimátoru. Z nich se počítačovou rekonstrukcí získá trojrozměrné zobrazení distribuce radiofarmaka. V případě, že by byly otvory kolimátoru příliš velké, lokalizace vzniku γ -záření by byla stanovena nepřesně. Svazek γ -fotonů by z důvodu nepřiměřeně velké plochy kolimačních otvorů dopadl na detektor nerovnoběžně. Naopak, příliš malé otvory v kolimátoru způsobí absorpci γ -záření v těle kolimátoru. V tomto případě by musel být pacient zatížen velmi vysokou dávkou, aby byl signál na detektoru dostatečný. Proto je relativní velikost otvorů v kolimátoru proti neděravé ploše volena citlivě, a je nastavena tak, aby prostorové rozlišení této metody bylo řádově jednotky cm^3 .^[7]

PET – Pozitronová emisní tomografie (*Positron Emission Tomography*). V současné době je tato metoda označována za nejmodernější diagnostický postup v nukleární medicíně.^[3] Je založena na distribuci pozitronového zářiče, který je umístěn mezi protilehlé detektory zapojené do tzv. koincidenčního obvodu. Vzniklé pozitrony anihilují s okolními elektrony. Při anihilaci vznikají ve stejný okamžik dva fotony γ -záření o energii 511 keV, které z místa svého vzniku vyletí v protilehlých směrech (pod úhlem 180°). Jejich současná detekce umožňuje určit původ vzniku fotonů s velkou přesností. Protože pozitrony mají ve tkáních dolet v rozmezí 0,2–3,5 mm než dojde k jejich anihilaci s elektrony, je prostorové rozlišení lepší než u metody SPECT. Nevýhodou metody PET je však vysoká pořizovací cena skeneru. Mimo to vysoká energie anihilačních fotonů je mimo rozsah optimální detekční účinnosti standardních scintilačních krystalů NaI(Tl). Proto se pro jejich detekci používají scintilátory s vyšší hustotou a vyšším atomovým číslem jako je např. $\text{Bi}_4\text{Ge}_3\text{O}_{12}$ (BGO), fluorid barnatý, aj.^[7]

Nejdůležitější oblastí využití PET je lokalizace a zjišťování povahy nádorů. Zobrazuje metabolicky aktivní nádorovou tkáň (na rozdíl od buněk inaktivovaných), proto je tedy možné monitorovat odezvu nádorové tkáně na radioterapii.^[6]

V PET se používají radionuklidy emitující záření β^+ , vhodné vlastnosti mají například ^{11}C , ^{15}N , ^{15}O , ^{18}F , aj. V posledních letech se zaměřuje pozornost také na kationty přechodných kovů, a to především na ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{45}Ti , ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu a ^{64}Cu .^[19] S izotopy ^{66}Ga a ^{76}Br byly provedeny radiochemické a preklinické studie.^[20] Přehled radionuklidů používaných v diagnostice je uveden v **Tab.2**.

Tab.2: Radionuklidy a jejich použití v diagnostice^[19]

Nuklid	Poločas rozpadu	Použití	Nuklid	Poločas rozpadu	Použití
^{11}C	20,4 min	vyšetření mozku PET	^{75}Se	119,8 d	studium proteinů zobrazování jater PET
^{13}N	10,0 min	vyšetření PET	$^{81\text{m}}\text{Kr}$	13,1 s	zobrazování plic SPECT
^{15}O	122,2 s	cévní zásobení mozku PET	^{82}Rb	1,3 min	lokalizační agens myokardu PET
^{18}F	109,8 min	onkologie PET	^{85}Sr	64,8 d	měření metabolismu kostí PET
^{32}P	14,3 d	diagnostika chorob kostí SPECT	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,0 h	zobrazování srdce, plic, kůže, kostí, jater, ledvin SPECT
^{35}S	87,5 d	diagnostika nemocí srdce značení NK SPECT	^{109}Cd	461,4 d	detekce rakoviny pediatrická vyšetření PET
^{47}Ca	162,6 d	buněčné funkce tvorba kostí SPECT	^{111}In	2,8 d	detekce odmítnutí srdečních transplantátů PET
^{51}Cr	27,7 d	studium červených krvinek SPECT	^{123}I	13,2 h	poruchy štítné žlázy PET
^{51}Mn	46,2 min	lokalizační agens myokardu PET	^{125}I	59,4 d	detekce osteoporózy značení léčiv PET
^{58}Co	70,9 d	indikátor zhoubné anémie PET	^{131}I	8,0 d	poruchy štítné žlázy SPECT
^{59}Fe	44,5 d	vyšetření kostní dřeně studium metabolismu železa SPECT	^{127}Xe	36,4 d	zobrazování plic zobrazování neurálních poruch v mozku PET
^{64}Cu	12,7 h	onkologie PET	^{133}Xe	5,2 d	studium plicní ventilace SPECT
^{67}Ga	3,3 d	zobrazování nádorových a zánětlivých lézí PET	$^{191\text{m}}\text{Ir}$	4,9 s	kardiovaskulární angiografie SPECT
^{68}Ga	67,7 min	studie trombózy a aterosklerózy PET	$^{195\text{m}}\text{Pt}$	4,0 d	farmakokinetické studie protnádorových léčiv SPECT

První PET skener v České republice funguje v pražské nemocnici Na Homolce od roku 1999. Tamtéž byl instalován v roce 2003 první hybrid PET/CT. V České republice v roce 2006 připadlo 1,25 PET vyšetření na 1000 obyvatel.^[21]

1.1.3 Radiofarmaka

Celá řada metod nukleární medicíny využívá léčiva značená radioaktivními izotopy, tzv. radiofarmaka. Molekula radiofarmaka se skládá ze dvou složek. První složkou je vlastní indikátor vyšetřované funkce pro zacílení na struktury, jejichž funkci chceme zobrazit (tzv. *targeting*) a druhou složku představuje signální část sloužící pro indikaci polohy molekuly indikátoru (tzv. *signalling*).^[22] Tímto je možné získat cenné informace o anatomii, metabolismu a orgánových funkcích. Radiofarmaka nachází významné uplatnění v kardiologii, neurologii a onkologii.^[23]

Radiofarmaka jsou radionuklidy označené jednoduché anorganické látky, různé organické molekuly, peptidy, proteiny (imunoglobuliny, protilátky), krevní elementy, buňky, apod. Radionuklid je zde v iontové formě, případně vázán kovalentně ve formě komplexu (chelátu).^[24] Radiofarmakum vstupuje do metabolismu způsobem, jenž je dán jeho chemickou strukturou a farmakokinetikou. Znamená to tedy, že každý typ radiofarmaka má v těle odlišný metabolismus a distribuci.^[22] Značené látky se zpracovávají do různých lékových forem k aplikaci jako injekce, plyny, aerodisperze, roztoky a tobolky.

K přípravě radiofarmaka pro lékařské účely se používají pouze umělé radionuklidy. Mezi nejčastější přípravy radiofarmak patří *izotopové výměnné reakce*, kdy je ve sloučenině stabilní izotop nahrazen radioizotopem téhož prvku (např. značení *o*-jodhippurové kyseliny). Dále *chemickou syntézou*, kdy lze cíleným postupem dosáhnout umístění radioaktivních atomů v molekule v požadované poloze a získat selektivně značené sloučeniny s požadovanými vlastnostmi. Případně *biochemickými a enzymatickými syntézami* (kyanokobalamin značený ⁵⁷Co nebo selenomethionin značený ⁷⁵Se).^[25]

Nejužívanější léčiva (emitory γ -záření) ve SPECT v České republice jsou: *o*-jodhipuran sodný (¹³¹I), jodid sodný (¹³¹I), chlorid thalný (²⁰¹Tl), citronan gallito-sodný (⁶⁷Ga) a ¹⁵³Sm-EDTMP.^[26] Mezi komerční klinicky užívaná radiofarmaka patří například DaTSCAN (diagnostika Parkinsonovy nemoci a demence s Lewyho tělísky), MYOVIEW (kardiologie, onkologie), CERETEC (neurologie, značení leukocytů), METASTRON (paliativní terapie kostních metastáz).^[26]

V zobrazovací metodě PET se nejčastěji používá radioaktivní ^{18}F s poločasem rozpadu $\tau = 110$ min. Nejpoužívanějším radiofarmakem je ^{18}F -fluorodeoxyglukóza – FDG.^[27] Po dlouhá léta sloužilo výzkumu mozku a myokardu. Jeho potenciál pro zobrazení nádorů pak v 90. letech podnítl rozvoj celotělových PET skenerů a následný vstup do klinické rutiny.^[28]

1.2 Měď

„Pryštil pak ze žhavých žil do dutin země hromadící se pramen stříbra a zlata, **mědi** a olova.“^[29]

Původ jejího názvu je nejistý, nejpravděpodobnější je spojitost s názvem starověké Médie, na jejímž území se nacházela významná naleziště mědi v Zakavkazí.^[30] Latinský název je již prokazatelně spjat s místem výskytu mědi. Pojmenování *cuprum* je spojeno s ostrovem Kypr (*aes cyprium* – kyperský kov), kde byla měď objevena již starými Římany.^[31] První zmínky o využití mědi jsou historicky datovány okolo roku 5000 př.n.l.^[32] Počátek doby bronzové (3000 př.n.l.) nastal spolu s objevením schopnosti mědi tvořit pevné bronzy.^[33] Mědi její vlastnosti určily civilizační význam.^[34] Příkladem unikátního, v současnosti těžného, ložiska mědi je Olympic Dam na jihu Austrálie. Zásoby Cu (v doprovodu Au a U) jsou odhadovány na 7,7 Gt s tím, že metalogenetickou provincií představuje pás o délce více než 500 km.^[35] V České republice se rovněž nachází relativně bohatá naleziště mědi (**Obr.2**).^[33]

Obr.2: Vzorek recentní mědi z autorčiny soukromé sbírky, lokalita: Jeseníky, Zlaté Hory.



1.2.1 Vlastnosti a použití mědi

Měď se nachází v první vedlejší (I.B) skupině periodické tabulky společně se stříbrem a zlatem. V přírodě se vyskytuje ve dvou stabilních izotopech ^{63}Cu (69,17 %) a ^{65}Cu (30,83 %).^[31] Elektronová konfigurace mědi je $d^{10}s^1$. Ve svých sloučeninách nabývá oxidačních čísel I, II a III. Výjimečně (v některých jednoduchých fluorokomplexech) může nabývat oxidačního čísla IV. Stabilní sloučeniny mědi s nulovým nebo záporným oxidačním číslem nejsou známy.^[36] Z tradičního zařazení mědi do vedlejší podskupiny alkalických kovů bychom mohli očekávat jisté podobnosti. Týkají se především formální stechiometrie sloučenin s atomem mědi v oxidačním stavu I.

Naopak se však od alkalických kovů liší méně účinným stíněním valenčního elektronu s od jádra zaplněnými orbitaly d ve srovnání s orbitaly p . Má vyšší hodnoty ionizačních energií a naopak menší iontové poloměry. Proto má větší teploty tání, hustotu a tvrdost.^[37]

Používá se především na výrobu elektrických vodičů, bronzu a mosazi, jako barvivo (svinibrodská zeleň, Scheelova zeleň), dále pak v mincovnictví, strojírenství, elektronice, či jako katalyzátor.^[32] Zvláštním druhem měděné slitiny je tzv. fosforová bronz obsahující 90 dílů Cu, 9 dílů Sn a 1 díl fosforu. Je tvrdší, velmi tažná, kujná, pružná. Své využití našla při výrobě zvonů a děl.^[38]

Měď je důležitým biogenním prvkem, po železu a zinku je třetím nejrozšířenějším přechodným kovem v lidském těle. Komplexně vázaná vystupuje jako kofaktor důležitých metaloenzymů (ceruloplasmin, metalothionein, galaksooxidasa, aj.).^[39] Jsou známy dvě geneticky podmíněné choroby (Wilsonova choroba a Menkeho syndrom), které souvisí s metabolismem mědi. Měďnaté kationty jsou vysoce toxické pro mikroorganismy, a proto je na jejich bázi založena celá řada algicidních, baktericidních a fungicidních přípravků.^[31]

1.2.2 Izotopy mědi a jejich aplikace v medicíně

Uměle byla připravena řada izotopů (29) v rozmezí nukleonových čísel 52 až 80, s poločasem rozpadu několik stovek nanosekund ($^{69\text{m}}\text{Cu}$, 360 ns) až několik desítek hodin (^{67}Cu , 61,8 h). Příprava radioizotopů mědi probíhá v jaderném reaktoru nebo cyklotronu. Připravují se z izotopů prvků sousedících v periodickém systému, díky tomu jsou jejich častými příměsemi Zn nebo Ni.^[40]

Díky hojnému výskytu izotopů s vhodnými poločasy rozpadu, energií emitovaného záření a typu rozpadu má měď své místo na poli nukleární medicíny. Směrodatné jsou rovněž jejich chemické vlastnosti (koordinální aspekty).^[41]

Nejpoužívanějšími radioizotopy v radioterapeutice a radiodiagnostice jsou ^{64}Cu a ^{67}Cu . Vlastnosti obou radionuklidů jsou srovnatelné, přestože má izotop ^{67}Cu oproti ^{64}Cu nižší terapeutický index (poměr dávky léčiva, který vyvolá léčebný účinek, k dávce způsobující toxický účinek) z důvodu delšího poločasu rozpadu.^[42] Nejdůležitější izotopy mědi potenciálně použitelné v radiomedicíně jsou uvedeny v **Tab.3**.

Tab.3: Vybrané izotopy mědi^[43]

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

Radionuklid ^{64}Cu

Radioizotop ^{64}Cu je díky svým vlastnostem jedním z nejuniverzálnějších radioizotopů mědi, použitelný jak v radioterapii, tak v radiodiagnostice. Poločas rozpadu (12,7 h) je vhodný vzhledem k *in vivo* kinetice používaných makromolekulárních nosičů a navíc je poplatný době přípravy radiofarmaka.^[44] Přeměna probíhá rozpadem β^+ (18 %) o energii E_{max} 655 keV, β^- (38 %, 573 keV), případně EZ (44 %, 511 keV, doprovázeno emisí Augerových elektronů), podíl γ tvoří asi 0,5 %.^[40]

Další výhodou je možná příprava v reaktoru přímou ($^{63}\text{Cu}(n,\gamma)^{64}\text{Cu}$) nebo nepřímou aktivací ($^{64}\text{Zn}(n,p)^{64}\text{Cu}$) na zinkovém terči, kdy je dosahováno vyšší měrné aktivity.^[45] Nejvyšší aktivity jsou dosahovány v cyklotronech ozařováním obohacených niklových $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ nebo zinkových terčů $^{64}\text{Zn}(d,2p)^{64}\text{Cu}$.^[46]

Z medicínského hlediska se používá například ke stanovení retence mědi v játrech a v mozku u pacientů s Wilsonovou chorobou (defekt transportního enzymu mědi).^[47]

Radionuklid ^{67}Cu

Izotop ^{67}Cu má nejdelší poločas rozpadu (61,8 h) ze všech radioaktivních izotopů mědi.^[48] Své využití nachází v radioterapii a v diagnostice rakoviny. Přeměna probíhá rozpadem β^- (o energii E_{\max} 577 keV) na ^{67}Zn , případně na některý z jeho tří jaderných izomerů. Přechod metastabilních izomerů zinku do základního stavu je doprovázen vyzařením γ -fotonů o energii 91, 93 respektive 185 keV.^[40] Díky tomu je použitelný pro sledování distribuce radionuklidu pomocí SPECT.^[47] Jeho příprava v reaktoru je poněkud finančně náročná, neboť reakce $^{67}\text{Ni}(n,p)^{67}\text{Cu}$ vyžaduje velký neutronový tok. V dnešní době se hledají vhodnější alternativy výroby.^[49]

1.3 Fosfor

Fosfor je jedenáctým nejrozšířenějším prvkem v zemské kůře (1120 ppm, 1,12 g/kg)^[32] a šestým nejzastoupenějším v lidském těle ($3,3 \cdot 10^4$ ppm, 33 g/kg).^[50] Celých sto let po objevení byla jeho jediným zdrojem moč.^[51] Do roku 1970 bylo připraveno a studováno okolo 100 000 sloučenin obsahujících fosfor, mnoho z nich se dnes běžně používá v chemii, medicíně, průmyslu, zemědělství a v dalších odvětvích.^[52]

Fosfor získal název podle schopnosti svých par svítět ve tmě, latinský název *phosphorus* znamená „nesoucí světlo“ (*phos* = světlo, *phoros* = nesoucí). I když bylo popsáno kolem 200 krystalických fosfátových minerálů, největší množství fosforu se vyskytuje pouze v jediné minerální skupině, a to v apatitech, které jsou jako jediné průmyslově významné.^[32]

Fosfor má pouze jeden stabilní izotop ^{31}P . Je známo 22 radioaktivních izotopů v rozmezí nukleonových čísel 24 až 46, z nichž nejdůležitější je ^{32}P . Je čistým zářičem beta s poločasem rozpadu 14,26 dní. Stabilní izotop ^{31}P má kvantové číslo $\frac{1}{2}$, čehož se využívá v NMR-spektroskopii. Stereochemie i vazebné poměry fosforu jsou velmi rozmanité. Mezi významné sloučeniny trojmocného fosforu patří fosfiny, které se používají jako ligandy v koordinační chemii.^[31]

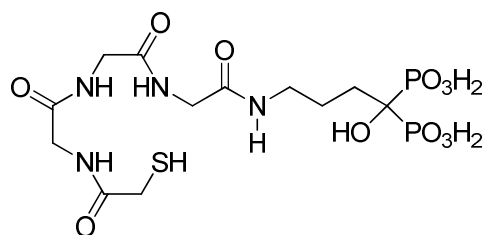
1.3.1 Medicínské aplikace a význam pro lidský organizmus

Fosfor hraje nezastupitelnou roli v biochemických dějích všech živých organizmů. Účastní se přenosu genetické informace (součást nukleových kyselin DNA a RNA), přenosu energie nejen ve formě ATP (při fotosyntéze, metabolismu, nervové a svalové činnosti) a růstu zubů a kostí.^[50] Fosfor je také součástí mozkové hmoty ve formě lecithinů.

Významnou roli při regulaci vápenatých iontů v těle hraje pyrofosfát. Velké uplatnění nachází fosforečnan vápenatý ve struktuře kostí a zubů. Zubní sklovina je prakticky čistý hydroxyapatit a jeho odolnost vůči zubnímu kazu se zvyšuje náhradou OH^- za F^- (fluoridace), při které vzniká pevnější, méně rozpustný, fluorapatit.^[31]

Medicínské aplikace zahrnují také antibiotikum fosfomycin a strukturně podobné sloučeniny, antivirotika na bázi fosfonoacetátu a fosfonoformiátu.^[53] Řada sloučenin fosforu je používána k léčbě osteoporózy, poruch metabolismu vápníku^[54] a Pagetovy nemoci.^[55]

Obr.3: Ligand MAG3-HBP komplexující ^{186}Re



Velký význam mají komplexy bis(fosfonátů) s radionuklidy zejména pro kostní diagnózy pomocí SPECT ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), terapii nebo paliativní léčbu (^{186}Re) kostních metastáz.^[56] Příkladem ligandu schopného vázat ^{186}Re je MAG3-HBP^[57] na **Obr.3**. Bis(fosfonáty) totiž vytváří specifickou vazbu do míst růstu a patologických změn kostí.^[54] Kromě toho řada nemocí (např. infarkt myokardu^[58], cirhóza jater^[59], rakovina prsu^[60], mozková mrtvice^[61]) způsobuje abnormální kalcifikace v měkkých tkáních, ty pak mohou být zobrazovány díky zmíněné specifické adsorpci komplexů bis(fosfonátů) s radionuklidy.^[62]

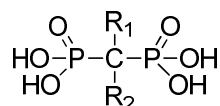
S oblibou se využívá tzv. stavebních kamenů (*building-blocks*), tedy jednoduchých bis(fosfonátů), které lze snadno konjugovat s biomolekulami (např. peptidy), a tím jinak často nespecifické látky selektivně dopravovat a vázat na kostní tkáň.^[52]

1.3.2 Bis(fosfonáty)

Bis(fosfonáty) (**Obr.4**) jsou po aplikaci a průchodu krevním řečištěm adsorbovány zejména na hydroxyapatit v kostech. Podle mechanismu působení na kostní buňky se dělí do dvou hlavních skupin. Do jedné skupiny patří bis(fosfonáty), které obsahují v postranním řetězci dusíkový atom, a do druhé ty, které jej neobsahují. Pouze bis(fosfonáty) obsahující dusíkový atom způsobují poruchy v působení kostních buněk a posléze jejich cílenou smrt (apoptózu), čímž se efektivně zabrání resorpci kostního povrchu. Bis(fosfonáty) neobsahující dusíkový atom jsou obvykle v kostních buňkách metabolizovány na methylenbis(fosfonátová) analoga ATP. Díky nehydrolyzovatelnosti P–C–P vazeb se pak ukládají v buňkách a také způsobují apoptózu buněk (vykazují tedy cytotoxicitu).^[63]

Účinnost bis(fosfonátů) na snížení resorpce kostní hmoty je velmi specifická pro každou sloučeninu. Podání velké dávky málo účinného bis(fosfonátu) sice relativně dobře sníží resorpci kostí, na druhou stranu však může výrazně narušit mineralizaci kostí. Proto existuje snaha o vytvoření sloučeniny s vysokou antiresorpční schopností, ale zároveň bez výrazného vlivu na mineralizaci kostí.^[54] Obecně se předpokládá, že velká afinita bis(fosfonátů) ke kostem je způsobena jejich inkorporací do hydroxyapatitu chemisorpcí probíhající na povrchu kostí.^[64]

Obr.4: Obecný vzorec bis(fosfonátu)



1.3.3 Fosfinové kyseliny

Oxokyseliny fosforu jsou mnohem četnější než u kteréhokoliv jiného prvku a počet oxoaniontů a oxosolí je vyšší snad jen u Si.^[32] Kyseliny fosfinové vznikají nahrazením vodíku kyseliny fosforené (H–PO₂H₂) organickým zbytkem, což vede k obecnému vzorci R–PO₂H₂.^[31] Skupina fosfinových kyselin neustále přitahuje značný zájem jako alternativa skupiny karboxylových kyselin, které jsou potenciálními regulátory, mediátory nebo inhibitory metabolických procesů.

Mnoho typů fosfinových kyselin patří mezi inhibitory metabolických enzymů, např. inhibitory kreatin kinasy, ornitin dekarboxylasy, aminoacyl-t-RNA syntetasy, apod. Tato skupina zahrnuje celou řadu herbicidů (fosfinotricin).^[50]

Některé fosfinové kyseliny působí jako účinní agonisté či antagonisté v receptorech karboxylových kyselin (cholecystokinový receptor, β -adrenergní receptor). Jejich analogy ovlivňují receptory pro inhibiční neurotransmitter kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) a excitační neurotransmitter glutamát.^[65]

1.4 Ligandy vhodné pro komplexaci mědi

Radioizotopy mědi (a ostatních kovů) jsou ve volné formě velmi toxické, navíc mají tendenci ukládat se v různých orgánech a tkáních. Proto se vpravují do těla pacienta v podobě stabilního měďnatého komplexu s vhodným ligandem.^[19] Tyto komplexy musí vykazovat vysokou kinetickou stabilitu *in vivo* a co největší selektivitu komplexace pro daný radionuklid. Tělesné tekutiny totiž obsahují mnoho iontů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , apod.) a konkurenčních ligandů (aminokyseliny, bílkoviny), které mohou mít za následek konkurenční komplexotvorné rovnováhy.^[66] V posledních letech probíhají intenzivní preklinické výzkumy pro využití bifunkčních chelatantů v radioterapeutice a radiodiagnostice.^[67] Dříve byly tyto bifunkční chelatanty aplikovány při sledování léčby Wilsonovy choroby.^[68]

Pro správnou funkci je třeba zvolit bifunkční ligand, který pevně váže kov a zároveň umožňuje vznik kovalentní vazby mezi ním a biologicky aktivní molekulou.^[69] Vzhledem k relativně krátkým poločasům rozpadu izotopů mědi je nutná rychlá komplexace. Radiofarmakum by tak mělo vykazovat co nejvyšší možnou intenzitu záření. Závislost rychlosti komplexace na struktuře jednotlivých ligandů lze zobecnit následujícím způsobem. Nejrychleji se komplexují ligandy lineární, nejpomaleji naopak volné makrocykly. Rychlost komplexace makrocyklu se zvýší navázáním pendantu (karboxylátového, fosfonátového, případně fosfinátového).

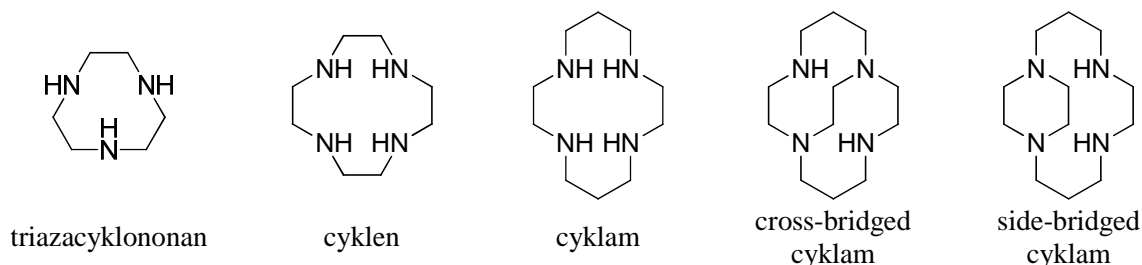
Mezi zástupce chelatantů vhodných pro komplexaci dvojmocné mědi patří polyaminy, polyaminokarboxyláty, polyaminofosfonáty, bis(thiosemikarbazony) a porfyriny.^[44]

1.4.1 Polyazamakrocykly

Polyazamakrocykly (polyaminy) patří mezi nejčastěji užívané chelatanty dvojmocné mědi především díky vysoké kinetické stabilitě jejich komplexů.^[70] Typickými zástupci jsou 1,4,7-triazacyklononan (TACN), 1,4,7,10-tetraazacyklododekan (*cyclen*) a 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan (*cyclam*), **Obr.5**. Vysokou kinetickou inertností a termodynamickou

stabilitou se rovněž vyznačují komplexy derivátů tzv. přemostěného cyklamu (*cross-bridged cyclam* a *side-bridged cyclam*, **Obr.5**).^[32]

Obr.5: Struktury polyazamakrocyclických ligandů

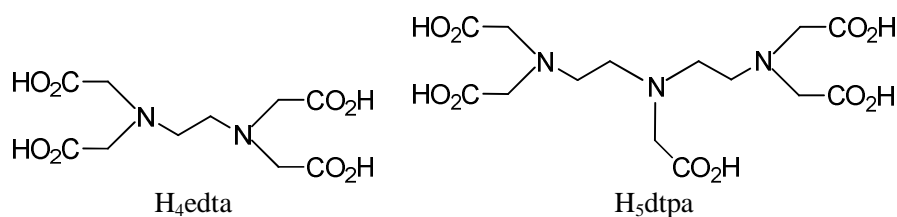


1.4.2 Polyaminokarboxyláty

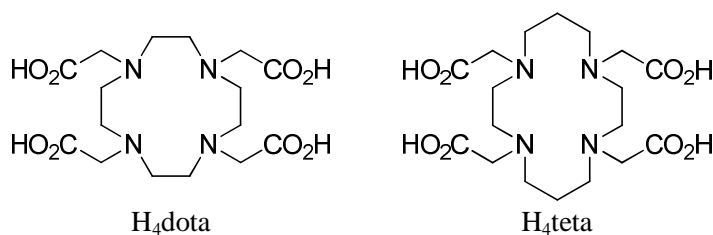
Kromě makrocyclických polyaminokarboxylátů mají význam rovněž lineární polyaminokarboxyláty, mezi nejznámější zástupce patří H_4 edta a H_5 dtpa (**Obr.6**). Jejich komplexace je velmi rychlá. Velkou nevýhodou je ale mnohem nižší kinetická inertnost vzniklého komplexu než v případě makrocyclických skeletů.^[71]

Mezi významné makrocyclické polyaminokarboxyláty patří H_4 dota a H_4 teta (**Obr.7**). Ligand odvozený od cyklamu, H_4 teta, má větší kavitu a tvoří s mědí termodynamicky stabilnější komplexy *in vitro*. Nevýhodou je pomalejší komplexace ve srovnání s lineárními polyaminokarboxyláty a kinetická labilita komplexu $[Cu(teta)]^{2-}$ *in vivo*. Přesto se velmi často používá z důvodu levné přípravy skeletu a rychlé a poměrně selektivní komplexaci.^[72]

Obr.6: Struktury lineárních polyaminokarboxylátů



Obr.7: Struktury makrocyclických polyaminokarboxylátů

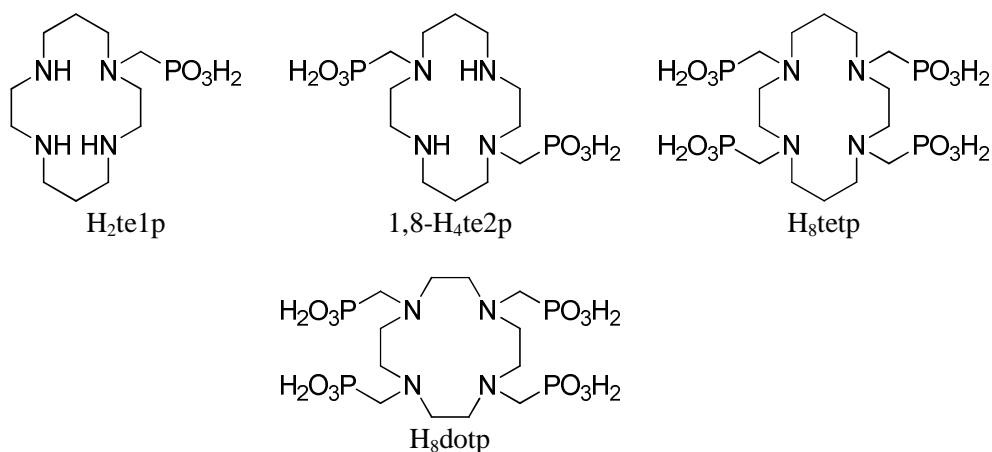


1.4.3 Makrocyclické polyaminofosfonáty a polyaminofosfináty

Tato skupina polyazamakrocyklů nese fosfonovou/fosfinovou skupinu methylfosfonové/methylfosfinové kyseliny jako pendantní substituenty na atomech dusíku.^[73] Vzhledem k afinitě methylfosfonové skupiny k hydroxyapatitu se deriváty s více fosfonátovými skupinami ve zvýšené míře akumulují v kostní tkáni.

Mezi významné makrocyclické polyaminofosfonáty patří H_8dotp , H_2te1p , 1,8- H_4te2p a H_8tetp (**Obr.8**). Ligandy H_8dotp a H_8tetp patří mezi slibné adepty pro diagnostické zobrazování kostí, případně k léčbě kostních metastáz.^[74]

Obr.8: Struktury makrocyclických polyaminofosfonátů

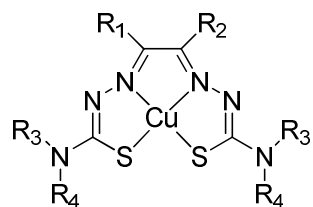


1.4.4 Bis(thiosemikarbazony) a porfyriny

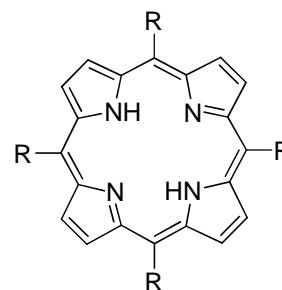
Bis(thiosemikarbazony) (**Obr.9**) jsou sloučeniny tetradentátně vážící Cu^{II} . Komplexy se *in vivo* neselektivně váží na proteiny (značení albuminu v krevním séru), čehož se využívá v radiodiagnostice (sledování krevního oběhu).^[75] Biodistribuce radiofarmaka závisí hlavně na molekulárních vlastnostech komplexu. Z vlastností těchto komplexů je podstatná lipofilita, nízká molekulová hmotnost, vysoká membránová propustnost a nízký redoxní potenciál. Bis(thiosemikarbazony) mohou být upravovány alkylací skeletu a terminálních aminů.^[76]

Mezi nejznámější zástupce porfyrinů patří hemy a cytochromy nacházející se v lidském těle.^[77] Mnohé deriváty porfyrinů jsou schopné komplexovat izotopy různých kovů. Značené porfyriny mají tendenci vázat se na nádorové buňky, případně se kumulovat v tkáních. Snadno se od nich připravují deriváty navázáním substituentů, především na aromatické jádro. Samotné porfyriny se užívají v protinádorové fototerapii. Obecná struktura porfyrinu je uvedena na **Obr.10**.^[44]

Obr.9: Obecná struktura měďnatého komplexu bis(thiosemikarbazonu)



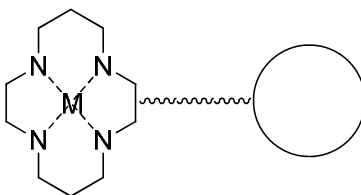
Obr.10: Obecná struktura porfyriu



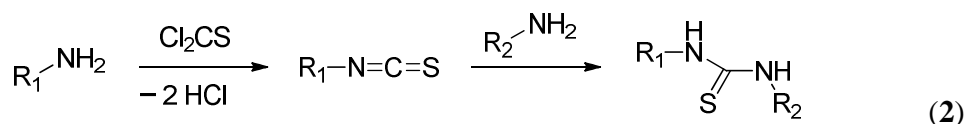
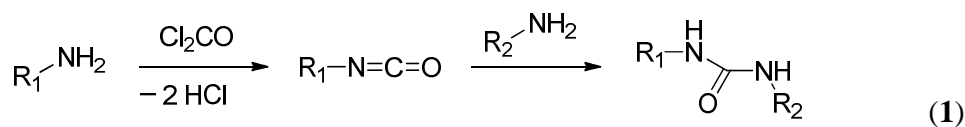
1.5 Biokonjugace

Jedním z hlavních cílů farmakologie je příprava diagnostické látky či léčiva, které by cíleně putovalo do žádané oblasti a neinteragovalo s žádnými jinými tělními strukturami. Tento typ léčiv je znám pod názvem magická kulka (*magic bullet*). Snaha o přiblížení se tomuto ideálnímu modelu se nevyhnula ani látkám založeným na bifunkčních ligandech. V tomto konkrétním případě je žádoucí, aby byl ligand (*komplex*) spojen s tzv. aktivním vektorem, který reprezentují např. monoklonální protilátky, oligosacharidy či menší peptidy hormonální povahy. Nejčastěji využívanými peptidy jsou hormony somatostatin a bombesin spolu s jejich odolnějšími analogy. Spojení mezi komplexem a vektorem zaštituje vhodná spojka (*linker*). Ta je důležitá k zabránění ovlivnění biologických vlastností systému při přímém spojení aktivního vektoru a komplexu. Často používaným linkerem je polyethylenglykol (PEG). Hlavními požadavky jsou stabilita spojení ligandu s vektorem a rovněž selektivní a rychlý způsob vzniku.^[78] Zjednodušené uspořádání magické kulky je uvedené na **Obr.11**.

Obr.11: Magická kulka, systém komplex-linker-vektor



Jednou z možností je spojení komplexu a aktivního vektoru pomocí (thio)močoviny reakcí aminu s (thio)fosgenem a následným spojením iso(thio)kyanátové skupiny s aminem jak to ukazují rovnice (1) a (2).^[79]



1.6 Teoretické pozadí a cíl práce

V předchozích řádcích teoretického úvodu bylo nastíněno potenciální využití bifunkčních chelatantů dvojmocné mědi v nukleární medicíně. Cyklam jako ligand je pro komplexaci mědi nejvhodnější, protože jeho dutina vyhovuje iontovému poloměru mědi (efektivní iontový poloměr Cu^{2+} pro koordinační číslo 6 je 73 pm).^[32] Rentgenostrukturní analýza prokázala, že měďnatý kation je vázán v komplexu čtyřmi ekvivalentními vazbami k atomům dusíku ligandu.^[80] Z velké škály radionuklidů mědi padá volba především na izotopy ^{64}Cu a ^{67}Cu , které nachází uplatnění ve vyšetření pomocí PET a při diagnostice a terapii rakoviny.

Makrocykly bez postranních skupin se vyznačují pomalou komplexací. Přítomnost substituentů (tzv. pendantních ramen) na volných dusících cyklamového skeletu významně urychluje komplexaci s mědí. Postranní pendantní ramena jsou tvořena kupříkladu acetátovými, fosfonátovými a fosfinátovými deriváty.^[81] Mezi faktory ovlivňují kinetickou a termodynamickou stabilitu měďnatých komplexů kromě počtu a druhu pendantních ramen patří také velikost makrocyklu, počet dusíkatých atomů a jejich bazicita.

Vzhledem k výše uvedenému má tato diplomová práce za cíl design, syntézu a studium vlastností potenciale vhodných makrocyclických ligandů založených na 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekanovém skeletu. Ligand **L₁** (**Obr.12**) byl navržen s jedním koordinujícím se aminobenzylfosfinátovým pendantním ramenem. Design tohoto ligandu byl zvolen vzhledem k předpokladu, že koordinující se skupiny pendantních ramen urychlují komplexaci, která u makrocyclických ligandů probíhá ve srovnání s acyklickými ligandy mnohem pomaleji. Další charakteristikou tohoto ligandu je přítomnost amino funkce, která umožňuje studovat modelovou biokonjugaci k primárnímu aminu. Ligand **L₂** (**Obr.13**) nese jedno monofosfinát-bis(fosfonátové) pendantní rameno. Design této látky byl navržen tak, aby se selektivně vázal na povrch kostí. U tohoto ligandu byly rovněž zkoumány termodynamické, kinetické a koordinační vlastnosti jeho komplexů s různými ionty přechodných kovů.

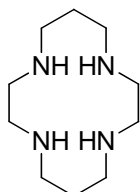
Jako hlavní cíle této práce byly definovány:

Syntéza ligandu a fosforových prekurzorů:

§ 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan (cyklam, **1**)

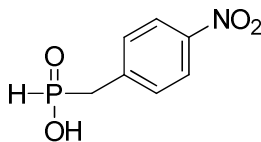
§ 4-nitrobenzylfosfinová kyselina (NBPIN, **I**)

§ monofosfinát-bis(fosfonát) (**V**)



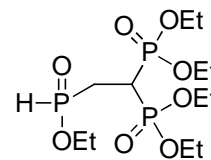
(1)

cyklam (**1**)



(I)

4-nitrobenzylfosfinová kyselina (**I**)



(V)

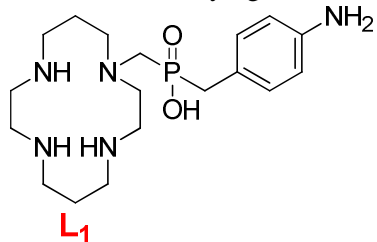
monofosfinát-bis(fosfonát) (**V**)

§ Dále nalezení alternativního způsobu přípravy látky **L₁** vzhledem k postupu uvedenému v bakalářské práci autorky (viz **Schéma 3** v oddíle **2.3**) a postupu syntézy nového ligandu **L₂** (viz **Schéma 4** v oddíle **2.3**)

§ Modelová biokonjugace ligandu **L₁** s primárním aminem (oddíl **3.2**)

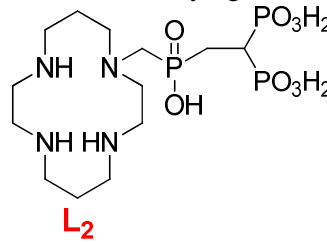
§ Stanovení termodynamických, kinetických a koordinačních vlastností ligandu **L₂** a jeho komplexů s kovy (oddíl **3.3**, **3.4** a **3.5**)

Obr.12: Cílový ligand **L₁**



L₁

Obr.13: Cílový ligand **L₂**



L₂

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Seznam použitých chemikálií

2.1.1 Reagencie

argon, 5.6	Linde
benzyl chloroformiát, 85%	Aldrich
bis(3-aminopropyl)-1,2-ethylendiamin (3,2,3-amin), 98%	Aldrich
diethylamin, 99,5%	Aldrich
ethyl chloroformiát, 98%	Aldrich
ethyl trifluoracetát, 99%	Aldrich
fosfornan amonný	Aldrich
<i>(přečištěn rekrystalizací z horké vody)</i>	
fosfornan sodný, 99%	Aldrich
glyoxaltrimer, hydrát, 97%	Aldrich
chlorid draselný, 99%	Lachema
chlorid nikelnatý, hexahydrát, 98%	Lachema
chlorid měďnatý, dihydrát, 98%	Lachema
hexamethyldisilazan, 98%	Fluka
hydroxid draselný, čistý	Penta
hydroxid sodný, čistý	Penta
kyanid draselný, 96%	Lachema
kyselina chloroctová	Lachema
<i>(přečištěna rekrystalizací za horka z nasyceného vodného roztoku)</i>	
kyselina chlorovodíková, 36% vodný roztok	Penta
kyselina fosforečná, 85%	Penta
kyselina octová, 99%	Penta
ninhydrin, 98%	Lachema
MES, 99%	Aldrich
methylamin, 10% vodný roztok	Lachema
<i>N</i> -ethyl-diisopropylamin, 98%	Merck
<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid, 99%	Fluka
<i>N,N'</i> -dimethyl-4-aminopyridin, 99%	Fluka
<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamid, 95%	Aldrich
palladium na aktivním uhlí, 10%	Aldrich
paraformaldehyd, 95%	Fluka
pentahydrát síranu měďnatého	Lachema
pyridin, 99,5%	Aldrich
<i>p</i> -nitrobenzylbromid, 97%	Aldrich
<i>p</i> -toluensulfonová kyselina, monohydrát, 98%	Aldrich
RaNi (Raney Nickel)	nepůvodní balení
síran sodný, bezvodý, 99%	Penta
<i>t</i> -butyl-akrylát, 98%	Aldrich
[tetraethyl]metylen-bis(fosfonát)	dříve připravený v laboratoři
tetrahydridoboritan sodný, 96%	Aldrich
tetrachlormethan, 98%	Aldrich

thiofosgen, 90%.....	Fluka
triethylamin, 98%	Fluka
trimethylsilyl(ethyl)ether, 98%.....	Penta
trimethylsilylbromid 97%.....	Penta
vodík, 3.0	Linde

2.1.2 Rozpouštědla

acetonitril	Penta
amoniak, 25% vodný roztok.....	Penta
dichlormethan	Fluka
dimethylsulfoxid.....	Lachema
ethanol, 96%, denaturovaný	Lihovar Kolín
ethanol, suchý	Lihovar Kolín
ethyl acetát	Fluka
chloroform	Lachema
isopropanol	Aldrich
methanol	Lachema
tetrahydrofuran	Fluka
toluen	Penta
voda, deionizovaná (získaná reversní osmózou, ROWAPUR 200/100)	PřF UK

Bezvodá rozpouštědla byla získána destilací s P₂O₅ (MeCN, Penta; DCM, Lachema) nebo se sodíkem (THF, Fluka).

2.1.3 Deuterovaná rozpouštědla

CDCl ₃ , 99,8%.....	Aldrich
D ₂ O, 99,95%.....	Chemotrade
DMSO-d ₆ , 99,5%.....	Chemotrade
NaOD, 1M, (připraven přidáním sodíku do D ₂ O)	Chemotrade

2.1.4 Iontoměniče a sorbenty

silikagel, chromatografický (60–230 mesh)	Fluka
silný aniontový iontoměnič (Dowex 1, 100–200 mesh).....	Fluka
silný kationtový iontoměnič (Dowex 50, 50–100 mesh).....	Aldrich

2.2 Metody charakterizace

2.2.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Měření spekter ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, ^{19}F , $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ a ^{31}P bylo realizováno na spektrometrech VNMRS300 (rezonanční frekvence jader: ^1H 299,9 MHz, ^{13}C 75,4 MHz a ^{31}P 121,4 MHz), Varian^{UNITY} INOVA 400 (rezonanční frekvence jader: ^1H 399,9 MHz, ^{13}C 100,6 MHz a ^{31}P 161,9 MHz) a Bruker Avance (III) 600 (rezonanční frekvence jader: ^1H 600,17 MHz, ^{13}C 150,9 MHz a ^{31}P 242,9 MHz). Všechny vedené přístroje jsou dostupné na PŘF UK v Praze.

Hodnoty chemických posunů δ jsou uváděny v jednotkách ppm a interakční („*coupling*“) konstanty J v jednotkách Hz. Hodnoty chemických posunů δ jsou uváděny s přesností na dvě desetinná místa pro ^1H a na jedno desetinné místo pro ^{13}C , ^{19}F a ^{31}P . Interakční konstanty jsou zaokrouhleny na tři platné cifry. Údaje pro konkrétní měření jsou uvedeny u příslušných látek v oddíle vlastní syntézy.

Pro měření byly použity NMR kyvety o průměru 5 mm. ^1H NMR spektra byla měřena v čistých deuterovaných rozpouštědlech (CDCl_3 , D_2O , $\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$). Část ^{31}P NMR spekter byla měřena v surové reakční směsi. Všechna ^{13}C NMR spektra a některá ^{31}P NMR spektra byla naměřena s „*decouplingem*“ vodíkových jader. Teplota měření byla 25 °C, není-li uvedeno jinak.

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

Zkratky pro multiplicitu signálů v NMR spektru jsou: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (kvartet), p (pentet), sp (septet), bs (široký singlet, broad singlet), m (multiplet).

2.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla naměřena na hmotnostním spektrometru Bruker ESQUIRE 3000. Přístroj je vybaven elektrosprejem („*Electrospray Ionization*“ – ESI), který působí jako zdroj iontů, a iontovou pastí („*Ion Trap*“) umožňující detekci příslušných iontů. Vzorky byly rozpuštěny v příslušném rozpouštědle a naředěny (MeCN, MeOH). Spektra byla měřena převážně v pozitivním, ale také v negativním modu.

U charakterizací jednotlivých látek jsou uvedeny pouze signály, které se podařilo interpretovat a které byly dostatečně intenzivní. Údaje pro konkrétní měření jsou uvedeny u příslušných látek v oddíle vlastní syntézy.

2.2.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Při tenkovrstvé chromatografii byly použity destičky typu *Silufol*[®] s širokoporézním silikagelem (*Silpearl*) naneseným na hliníkové fólii (*Kavalier*) se škrobem jako pojivem a hliníkové destičky s vrstvou silikagelu (*Silica gel 60 F₂₅₄*, typ E) impregnované fluorescenčním barvivem a lepené sádrou (Merck).

Po důkladném odpaření mobilní fáze byla detekce provedena 0,5% ethanolickým roztokem ninhydrinu v ethanolu, fosfomolybdenovou solucí ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4), Dragendorffovým činidlem ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, KI, AcOH, H_2O) nebo 5% vodným roztokem modré skalice ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Destičky byly následně vyvolány proudem vzduchu (cca 60 °C) pomocí horkovzdušné pistole. V případě destiček společnosti Merck bylo pro detekci rovněž použito zhášení fluorescence pod UV lampou MINERALIGHT[®] ($\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 366 \text{ nm}$).

Hodnoty retenčního (retardačního) faktoru R_f jsou uváděny s přesností na jedno desetinné místo.

U příslušných látek v oddíle vlastní syntézy je vždy uveden konkrétní použitý typ detekce, mobilní fáze a hodnoty R_f . Nejčastěji používanými mobilními fázemi byla směs isopropanolu, amoniaku a vody či směs isopropanolu, kyseliny octové a vody o objemovém poměru 7:3:3, které jsou označovány zkratkou IPAV a IPOV.

2.2.4 Spektrofotometrická měření

Měření formačních a disociačních kinetik bylo realizováno na UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2401PC. Teplota byla regulována Peltierovým článkem v rozmezí od 25–70±0,05 °C. Data byla zaznamenávána programem UVProbe 2.21. Přístroj je dostupný na PřF UK.

Část měření formačních kinetik při vyšším pH (od 1,92 do 6,21) byla provedena v Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži. Zde byl použit *stopped-flow* reakční analyzátor SX.18MV. Zpracování dat a jejich fitování bylo provedeno pomocí programu Gnuplot.^[82]

2.2.5 Potenciometrické titrace

Titrace byly provedeny v potenciometrické dvouplášťové cele temperované na $25 \pm 0,1$ °C při iontové síle $I(\text{HNO}_3) = 0,1$ M v rozmezí pH cca 1,5–13. Všechny roztoky používané pro titrace byly také temperovány na $25 \pm 0,1$ °C. Pro zamezení absorpce CO_2 ze vzduchu byla během titrací udržována inertní atmosféra konstantním přívodem proudu argonu nad hladinu titrovaného roztoku. Aby nedocházelo k odparu vody z titrovaného roztoku, byl inertní plyn předem nasycen vodní parou průchodem plynovou promývačkou obsahující vodný roztok o stejné iontové síle jako roztok titrovaný. Potenciál byl měřen kombinovanou skleněnou-argentchloridovou elektrodou GK240B na pH metru PHM 240. Titrační roztok byl přidáván automatickou byretou 2 mL ABU 900.

Počáteční objem titrovaného roztoku byl ~ 5 mL, koncentrace ligandu ~ 2 mM a poměr ligand:ion kovu 1:1 a 1:2. Jako titrační roztok byl použit KOH o koncentraci $\sim 0,2$ M. Každá titrace byla opakována třikrát až čtyřikrát. Počet experimentálních bodů v jedné titraci se pohyboval od 30 do 40. Pomocí programu OPIUM^[83] byly z naměřených dat získány protonizační konstanty ligandu a konstanty stability systému ligand:kov. Program OPIUM používá k proložení experimentálních bodů křivkou nelineární regresi s metodou nejmenších čtverců. Hodnoty parametrů elektrody byly získány z kalibrační titrace s 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 Nernstova směrnice, a J_A a J_B koeficienty popisující kyselou a zásaditou chybu. K_W je iontový součin vody a člen $K_W / [\text{H}^+]$ odpovídá koncentraci OH^- iontů v roztoku. Hodnota iontového součinu vody $\text{p}K_W = 13,78$ pro $I(\text{KNO}_3) = 0,1$ M při 25 °C a konstanty stability systémů $\text{M}^{2+}-\text{OH}^-$ byly převzaty z literatury.^[84] Protože hodnoty kalibračních parametrů elektrody se v čase mění, byla vždy provedena kalibrační titrace před i po každé titraci.

Z titrací byly programem OPIUM určeny celkové rovnovážné konstanty stability β . Protonizační konstanta je definována vztahem $\beta_h = [\text{H}_h\text{L}]/\{[\text{H}]^h \cdot [\text{L}]\}$ 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 je pak obecně definován jako $pK(H_nL) = \log\beta_n - \log\beta_{n-1}$.

2.2.6 Elementární analýza

Obsah uhlíku, vodíku a dusíku byl stanoven servisním pracovištěm Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze. Analýza procentuálního zastoupení prvků proběhla na automatickém analyzátoru Perkin Elmer CHN/S Elemental analyser 2400 II. Hodnoty jsou uvedeny v hmotnostních procentech jako aritmetický průměr všech stanovení s přesností na jedno desetinné místo.

2.2.7 Radiokomplexace

Radioaktivní měď ^{61}Cu byla vyrobena z přírodního niklu reakcí (d,x) na izochronním cyklotronu U-120M (SÚJV Dubna) na Ústavu jaderné fyziky AV ČR v Řeži. Ozařováním folie (60 μm) z přírodního niklu (99,9+) svazkem deutronů o vstupní energii 10 MeV při hodnotě proudu 8 μA byla připravena aktivita o hodnotě 492 MBq (EOB). Doba ozařování byla 120 minut. Skutečné množství mědi a nečistot (Zn, Ni a Fe) bylo určeno pomocí AAS na Státním veterinárním ústavu Praha.

Detekce aktivity byla provedena autoradiografickým systémem CYCLONE PLUS (PerkinElmer). Naměřena data byla zpracovávána programem OptiQuantTM. Hodnoty jsou uvedeny v procentech jako aritmetický průměr všech stanovení s přesností na jedno desetinné místo.

2.3 Syntéza

Souhrnné vyobrazení syntézy ligandů je uvedeno ve **Schématu 3** (pro ligand **L₁**) a ve **Schématu 4** (pro ligand **L₂**).

Schéma 3: Navržený postup přípravy látky **L₁**

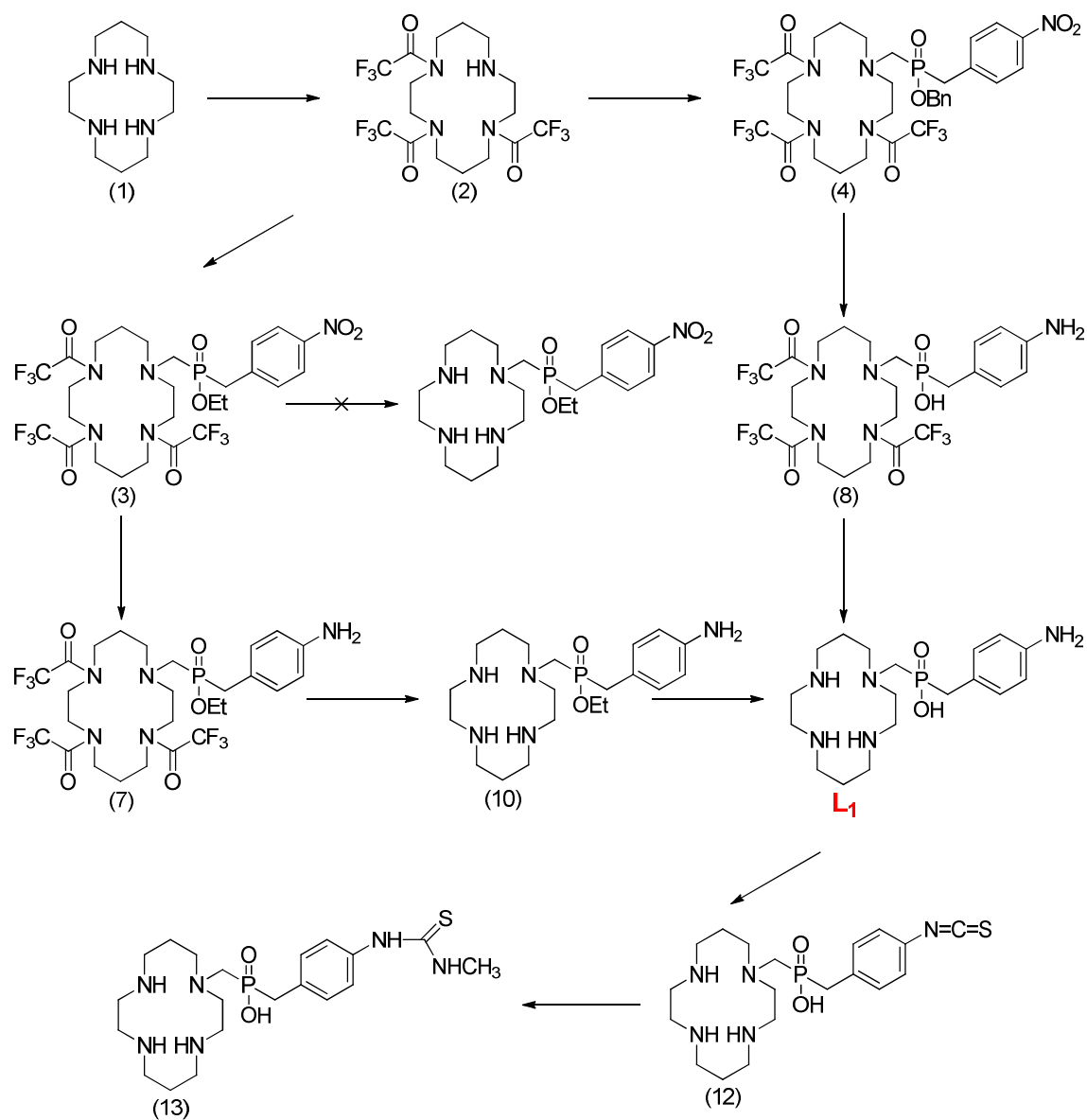
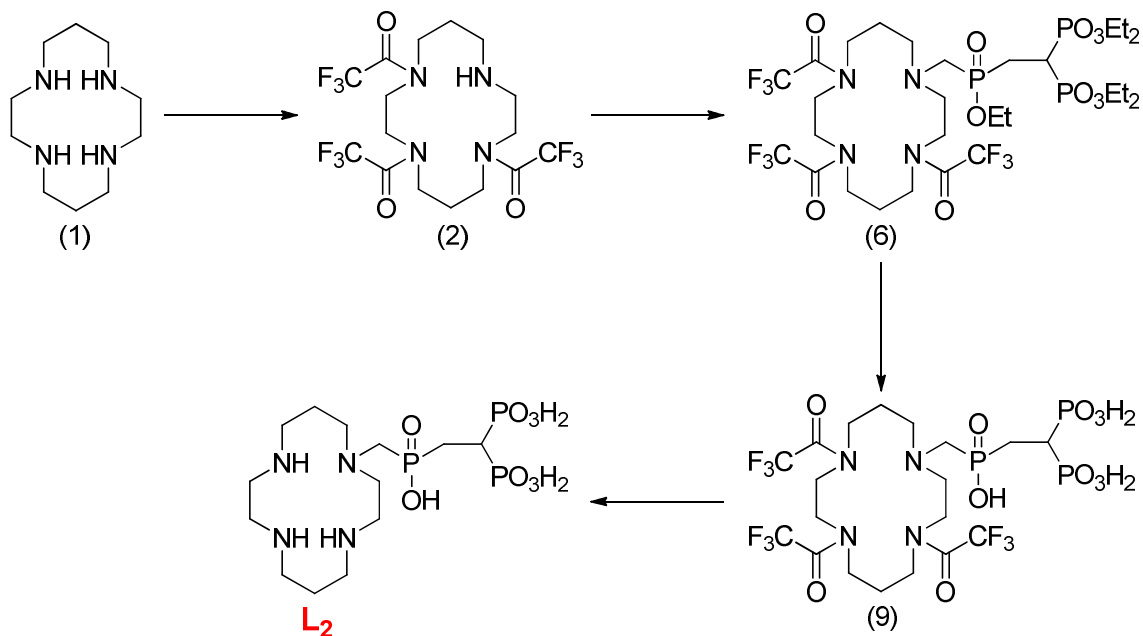


Schéma 4: Navržený postup přípravy látky **L₂**



V textu uvedeném níže se pod pojmem „odpaření na RVO“ rozumí odpaření na rotační vakuové odparce. Teplota lázně se lišila v závislosti na odpařovaném rozpouštědle (viz následující přehled). Dále pod pojmem „amoniak (NH₃)“ je míněn jeho 25% vodný roztok a pod pojmem „kyselina chlorovodíková (HCl)“ její 36% vodný roztok.

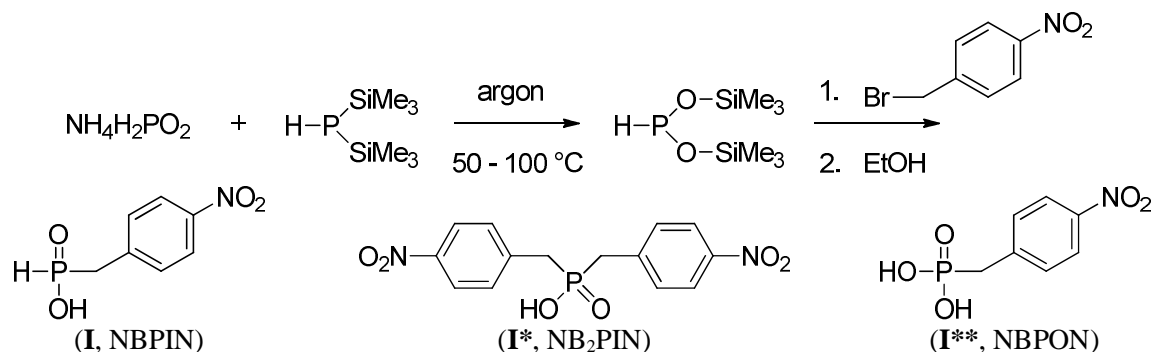
Orientační teplota lázně RVO pro různé druhy rozpouštědel:

EtOH, MeOH.....	45 °C
Směsi obsahující NH ₃ nebo HCl	50 °C
Směsi obsahující vodu	55 °C
Ostatní použitá rozpouštědla	50–55 °C

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

2.3.1 Příprava fosforových prekurzorů

Syntéza látky I (4-nitrobenzylfosfinová kyselina, NBPIN)



Do 500mL trojhrdlé baňky bylo naváženo 10,0 g (120 mmol) rekrystalizovaného fosforanu amonného. Baňka byla opatřena zaváděcí trubičkou s kohoutem (spojena s přívodem argonu), chladičem, na který byla nasazena další trubička s kohoutem (napojena na membránovou vývěvu sloužící jako zdroj vakua) a zátkou, která plnila funkci ventilu při sekuraci. Dále bylo přidáno magnetické míchadlo. Aparatura byla třikrát evakuována a následně naplněna argonem.

Po provedené sekuraci byla zaváděcí trubička na chladiči vyměněna za bublačku s nujolem a zátka za gumové septum. Tyto úkony byly provedeny v silném protiproudu argonu. Přes septum bylo pomocí injekční stříkačky s jehlou přidáno 50,0 mL (237 mmol) hexamethyldisilazanu (HMDS). Proud argonu byl nastaven tak, aby bublačkou procházela cca 1 bublinka za 2 s. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána přes noc v olejové lázni o teplotě $105-110^\circ\text{C}$.

Po ukončení reakce byl zesílen proud argonu a celá aparatura byla vyjmuta z olejové lázně a ponechána vychladnout na laboratorní teplotu. Přes septum bylo injekční stříkačkou přidáno k reakční směsi 100 mL vysušeného DCM. Obsah baňky byl vychlazen v lázni ze směsi ethanolu a suchého ledu na -40°C . Za stálého chlazení byl přes septum přidán roztok 11,8 g (55 mmol) 4-nitrobenzylbromidu (NBB) ve 200 mL suchého DCM. Bylo nutné dbát, aby v injekční stříkačce, jíž byl roztok přidáván, nebyla žádná vzduchová bublina. Po přidání veškerého roztoku byla chladičí lázeň zvolna ohřána na laboratorní teplotu. Reakční směs byla míchána dalších 12 hodin pod mírným proudem argonu.

Další den byl proud argonu značně zesílen a reakční směs byla převedena pomocí kanyly do kádinky obsahující 250 mL ethanolu. Zbytek roztoku byl z původní reakční baňky

vymyt dalšími cca 50 mL EtOH. Obě etanolové frakce byly spojeny a vzniklá suspenze byla odpařena dosucha na RVO v předem zvážené 500 mL kulaté baňce. Žlutý odparek byl rozpuštěn ve 400 mL vroucí vody (50–100 mL vody na 5,0 g produktu). Většina produktu se rozpustila, malé množství zůstalo nerozpuštěné, jednalo se hlavně o disubstituovanou sloučeninu **I***. Roztok byl za horka zfiltrován na přehřáté fritě S2 do 1L kulaté baňky. Po ochlazení filtrátu byla očekávána krystalizace 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny (**I**). K té ovšem nedošlo. Filtrát byl převeden do 1L dělicí nálevky a bylo přidáno 20 mL koncentrované HCl a 200 mL chloroformu. Po důkladném protřepání byla oddělena vodná a organická fáze. Organická fáze byla odpuštěna a uchována v Erlenmeyerově baňce. Vodná fáze byla dosucha odpařena na RVO. K odparku bylo přidáno 100 mL 10% HCl a 100 mL chloroformu a směs byla důkladně zamíchána. Takto byla ponechána stát přes víkend.

Vykrytalizovaná 4-nitrobenzylfosfinová kyselina (**I**) byla odfiltrována na fritě S2, promyta malým množstvím studené vody a po důkladném prosání vzduchem dosušena ve vakuovém exsikátoru nad P₂O₅.

V organické fázi se po dvou dnech vyloučila nažloutlá sraženina. Podle ³¹P NMR spektra se jednalo o produkt **I** (90% čistota). Sraženina byla přefiltrována na fritě S3 a rekrystalizována z horké vody.

Upozornění: Nitrobenzylbromid je látka, která silně dráždí pokožku, obzvlášť pokud je ve formě roztoku. Proto je nutné používat ochranné rukavice a s roztoky pracovat pouze v dobře táhnoucí digestoři.

Výtěžek (4-nitrobenzylfosfinová kyselina, **I**):

3,9 g o čistotě 98 %, nečistota: NBPON (2 %);

1,2 g o čistotě 90 %, nečistoty: NBPON (4 %), H₃PO₃ (3 %) a H₃PO₄ (2 %)

Charakterizace:

¹H-NMR (NaOD): δ 2,9–3,1 (m, více signálů kvůli částečné výměně za D, 2H, P–CH₂);

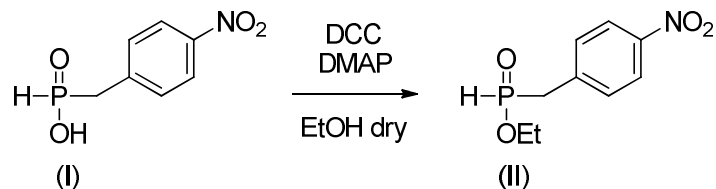
6,97 (d, 1H, P–H, ¹J_{PH} = 523); 7,42 (d, 2H, arom, J = 8,4); 8,18 (d, 2H, arom, ³J_{HH} = 8,4)

³¹P{¹H}-NMR (NaOD): δ 24,8 (s)

³¹P-NMR (NaOD): δ 24,7 (d, 1P, P–H, ¹J_{PH} = 523)

Syntéza látky II (ethyl ester kyseliny 4-nitrobenzylfosfinové, NBPINOEt)

Reakce s DCC, DMAP v bezvodém EtOH



Získaná NBPIN (**I**) byla následnou reakcí převedena na svůj ethyl ester (**II**). Do baňky o objemu 250 mL bylo naváženo 3,7 g (15 mmol) NBPIN, spolu s 3,7 g (1,2 ekvivalentu, 18 mmol) DCC a 30 mg (0,05 ekvivalentu, 0,2 mmol) DMAP ve 100 mL suchého EtOH. Reakční směs byla míchána přes noc.

V baňce vznikla suspenze žluté kapaliny s bílou sraženinou. Ta byla zfiltrována na fritě S3, část byla odebrána do vialky a rozpuštěna v CHCl_3 .

Tato vialka byla ponechána v digestoři, dokud se neodpařil veškerý CHCl_3 . Následně byl vzorek rozpuštěn v CDCl_3 a byl připraven vzorek na ^1H a ^{31}P NMR. Tato látka byla posléze identifikována jako vedlejší produkt *N,N'*-dicyklohexylmočovina (DCU).

Přefiltrovaný roztok byl odpařen na RVO do sucha, odparek opět rozpuštěn v EtOH a následně ještě jednou přefiltrován na fritě S3. Do kyvety byl odebrán vzorek na ^{31}P NMR. Poté byl obsah baňky znovu odpařen na RVO. Byl získán produkt ve formě nažloutlého oleje.

Výtěžek (ethyl ester 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny, **II**):

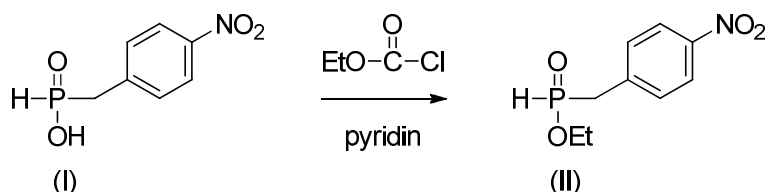
3,84 g o čistotě 91 %, nečistoty: NBPIN (7 %) a stopy NB_2PIN (2 %)

Charakterizace:

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (EtOH): δ 35,1 (s)

^{31}P -NMR (EtOH): δ 35,1 (d sp, 1P, P-H, $^1J_{\text{PH}} = 559$, $^2J_{\text{PH}} \sim ^3J_{\text{PH}} \sim 9,4$)

Reakce s ethyl chloroformiátem^[85]



Získaná NBPIN (**I**) byla následnou reakcí převedena na svůj ethyl ester (**II**). Do 250mL baňky bylo naváženo 2,6 g (12,9 mmol) látky **I**. K ní bylo přilito 100 mL suchého DCM a k suspenzi bylo přidáno pomocí injekční stříkačky 1,6 mL (1,3 ekvivalentu, 16,8 mmol) ethyl chloroformiátu. Na zábrus byl nasazen chladič a během dvaceti minut bylo přikapáno 1,7 mL (1,8 ekvivalentu, 20,8 mmol) pyridinu z injekční stříkačky. Reakční směs se během přidávání báze zahřívala a docházelo ke generování plynu. Po přidání veškeré báze došlo k vyčeření reakční směsi. Poté byl chladič opatřen zátkou a směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě.

Dále byla reakční směs extrahována 4x 80 mL nasyceného vodného roztoku NaCl, 3x 80 mL CHCl₃ a 2x 80 mL 5% vodného roztoku NaHCO₃. Organická fáze byla následně vysušena MgSO₄ a po odfiltrování odpařena na RVO. Poté byla látka odpařena 2x z 50 mL toluenu a 2x z 50 mL suchého EtOH. Do kyvety byl odebrán vzorek na ³¹P NMR. Po odpaření byl získán produkt ve formě nažloutlého oleje.

Výtěžek (ethyl ester 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny, **II**):

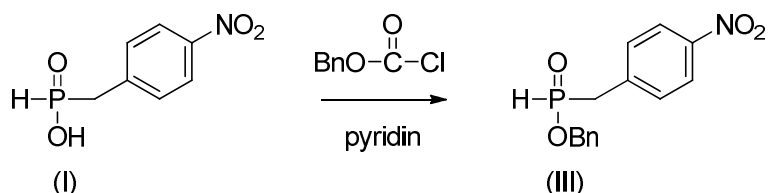
2,42 g o čistotě 91,2 %, nečistota: NBPIN (8,8 %)

Charakterizace:

³¹P{¹H}-NMR (EtOH): δ 35,1 (s)

³¹P-NMR (EtOH): δ 35,1 (d sp, 1P, P-H, ¹J_{PH} = 559; ²J_{PH} ~ ³J_{PH} ~ 9,4)

Syntéza látky **III** (benzyl ester kyseliny 4-nitrobenzylfosfinové, NBPINOBN)



Získaná NBPIN (**I**) byla následnou reakcí převedena na svůj benzyl ester (**III**). Do 250mL baňky bylo naváženo 2,6 g (12,9 mmol) látky **I**. Do ní bylo přilito 100 mL suchého

DCM a k suspenzi bylo přidáno pomocí injekční stříkačky 2,4 mL (1,3 ekvivalentu, 18,9 mmol) benzyl chloroformiátu. Na zábrus byl nasazen chladič a během dvaceti minut bylo přikapáno 1,9 mL (1,8 ekvivalentu, 23,2 mmol) pyridinu z injekční stříkačky. Reakční směs se během přidávání báze zahřívala a docházelo ke generování plynu.

Po přidání veškeré báze nedošlo k očekávanému vyčeření reakční směsi. Proto bylo přidáno ještě 1,2 mL (0,65 ekvivalentu, 8,4 mmol) benzyl chloroformiátu a 1 mL (1 ekvivalent, 12,2 mmol) pyridinu. Poté byl chladič opatřen zátkou a směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě.

Druhý den došlo k vyčeření reakční směsi. Dále byla reakční směs extrahována 4x 80 mL nasyceného vodného roztoku NaCl, 3x 80 mL CHCl₃ a 2x 80 mL 5% vodného roztoku NaHCO₃. Organická fáze byla následně vysušena MgSO₄ a po odfiltrování odpařena na RVO. Poté byla látka odpařena 2x z 50 mL toluenu a 2x z 50 mL suchého EtOH. Do květy byl odebrán vzorek na ³¹P NMR. Po odpaření byl získán produkt ve formě světle oranžového oleje.

Výtěžek (benzyl ester 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny, **III**):

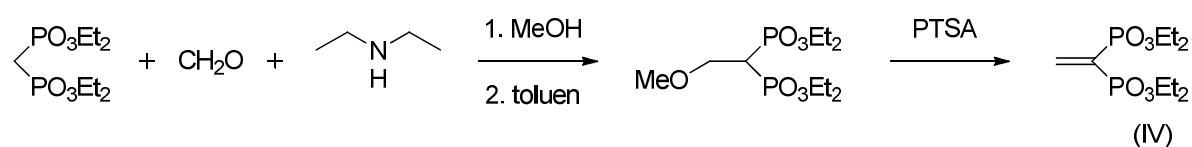
3,31 g o čistotě 93,0 %, nečistota: NBPIN (7,0 %)

Charakterizace:

³¹P{¹H}-NMR (EtOH): δ 32,3 (s)

³¹P-NMR (EtOH): δ 32,1 (d sp, 1P, P-H, ¹J_{PH} = 556; ²J_{PH} ~ ³J_{PH} ~ 18,3)

Syntéza látky IV {[tetraethyl]vinyliden-1,1-bis(fosfonát)}^[86]



Do 500mL baňky bylo naváženo 11,8 g (40 mmol) [tetraethyl]metylen-bis(fosfonátu) spolu s 6,3 g (7 ekvivalentů, 210 mmol) paraformaldehydu. Dále bylo přidáno injekční stříkačkou 4,3 mL (1,8 ekvivalentu, 70 mmol) diethylaminu a obsah baňky byl rozpuštěn ve 200 mL MeOH. Směs byla míchána po dobu 12 hodin, poté byla odpařena na RVO a pro odstranění zbytků MeOH bylo odpařování opakováno s toluenem.

Vzniklý methoxy-meziprodukt byl rozpuštěn v toluenu (200 mL) a bylo přidáno 0,3 g (1,6 mmol) monohydrátu *p*-toluensulfonové kyseliny. Poté byl obsah baňky míchán po dobu dalších 12 hodin.

Reakční směs byla odpařena na RVO a vakuovou destilací byl získán produkt ve formě bezbarvého oleje. Byl odebrán vzorek na NMR a MS spektra.

Výtěžek {[tetraethyl]vinyliden-1,1-bis(fosfonát), **IV**}:

10,3 g o čistotě 89 %, nečistoty: ve $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR spektru se nachází 5 dalších píků, které zauímají přibližně 10 % z celkové intenzity ve spektru a nebyly interpretovány.

Charakterizace:

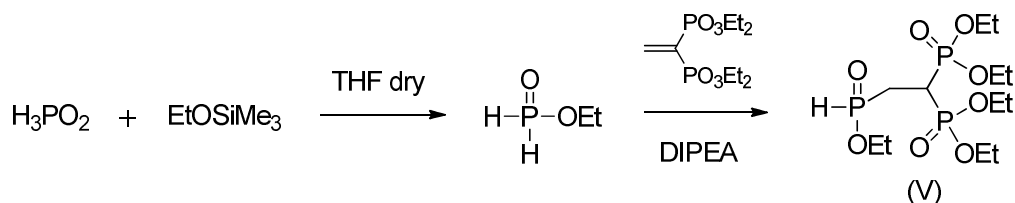
MS (+): 323,2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, teor. 323,2)

^1H -NMR (CDCl_3): δ 1,29 (t, 12H, $-\text{CH}_3$, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$); 4,09 (m, 8H, $\text{O}-\text{CH}_2$); 6,92 (m, 2H, $\text{C}=\text{CH}_2$)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3): δ 13,0 (s)

^{31}P -NMR (CDCl_3): δ 13,0 (s, 2P, $\text{P}-\text{C}-\text{P}$)

Syntéza látky **V** [monofosfinát-bis(fosfonát)]^[87]



Nejdříve byla připravena kyselina fosforová, která je vstupní komponentou pro syntézu látky **V**. Byl připraven roztok fosforanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) tak, že bylo 15,0 g (142 mmol) rozpuštěno v 50 mL destilované vody. Následně byl roztok nalit na sloupec silného kationtového iontoměničce v H^+ cyklu a bylo odpuštěno tolik destilované vody, aby byl fosforan zcela ve styku s iontoměničcem. Poté byl systém ponechán 20 minut v klidu.

Následně byl obsah kolony pozvolna eluován destilovanou vodou. Eluát byl jímán v okamžiku, kdy začal reagovat kyselě a jímání bylo ukončeno při zvýšení hodnoty pH. Získaný zředěný roztok kyseliny fosforené byl zahuštěn na RVO při teplotě nepřevyšující 40°C . Poslední zbytky vody byly odstraněny odpařením s toluenem na RVO. Byl odebrán vzorek na ^{31}P NMR.

Tavenina H_3PO_2 (bezbarvá krystalická látka) byla získána ve výtěžku 59 % (14,1 g).

Charakterizace:

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (EtOH): $\delta = 12,8$ (s)

^{31}P -NMR (EtOH): $\delta = 12,8$ (t, 1P, $\text{P}-\text{H}$, $^1J_{\text{PH}} = 561$)

Do 250mL baňky bylo naváženo 3,2 g (48 mmol) kyseliny fosforové. Poté bylo přidáno injekční stříkačkou 14,9 mL (2 ekvivalenty, 96 mmol) trimethylsilyl(ethyl)etheru v suchém THF (60 mL). Reakční směs byla míchána po dobu 2 hodin a poté byl odebrán vzorek na ^{31}P NMR spektrum. Konverze na ethyl ester kyseliny fosforové byla kvantitativní. Poté bylo k reakční směsi přidáno v jednom kroku v injekční stříkačce 6,0 g (20 mmol) vinyliden(bis)fosfonátu (**IV**) a 6,18 g (48 mmol) *N*-ethyl-diisopropylaminu. Následně byla reakční směs míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě.

Dále byl obsah baňky odpařen na RVO. Získaný olej byl rozpuštěn v 15 mL DCM a extrahován vodou (15 mL). Vodná fáze byla dvakrát re-extrahována 15 mL DCM. Všechny tři organické frakce byly slity do jedné baňky a její obsah byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 , který byl následně odfiltrován na fritě S3. Po odfiltrování pevné složky a odpaření na RVO byl získán produkt ve formě viskózního bezbarvého oleje, který byl použit v následujícím kroku bez další purifikace.

Výtěžek [monofosfinát-bis(fosfonát), **V**]:

7,9 g o čistotě 98,5 %

Charakterizace:

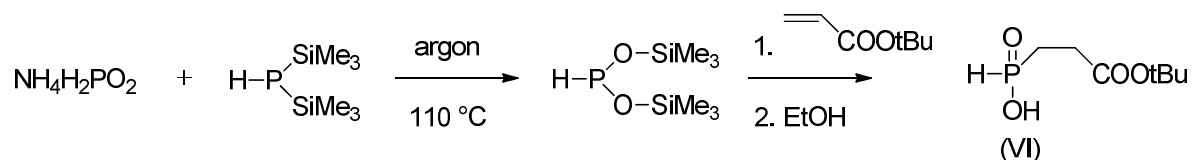
MS (+): 394,8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, teor. 394,1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,37 (m, 15H, $-\text{CH}_3$); 2,31 (m, 2H, $\text{P-CH}_2\text{-CH}$); 2,84 (m, 1H, P-CH-P); 4, 18 (m, 10H, O-CH_2); 7,34 (d, 1H, P-H , $^1J_{\text{PH}} = 577$)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (CDCl_3): δ 22,0 (d, 1P, P-CH-P , $^3J_{\text{PP}} = 34$); 22,2 (d, 1P, P-CH-P , $^3J_{\text{PP}} = 21$); 35,8 (dd, 1P, $\text{CH}_2\text{-P}$, $^3J_{\text{PP}} = 34$, $^3J_{\text{PP}} = 21$)

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3): δ 22,1 (m, 2P, P-CH-P); 35,8 (d, 1P, P-H , $^1J_{\text{PH}} = 577$)

Syntéza látky **VI** (*t*-butyl ester karboxyethyl-fosfinové kyseliny)



Do 250mL trojhrdlé baňky bylo naváženo 5,0 g (60 mmol) rekrystalizovaného fosforanu amonného. Baňka byla opatřena zaváděcí trubičkou s kohoutem (spojena s přívodem argonu), chladičem, na který byla nasazena další trubička s kohoutem (napojena na membránovou vývěvu sloužící jako zdroj vakua) a zátkou, která plnila funkci ventilu při

sekuraci. Dále bylo přidáno magnetické míchadlo. Aparatura byla třikrát evakuována a následně naplněna argonem.

Po provedené sekuraci byla zaváděcí trubička na chladiči vyměněna za bublačku s nujolem a zátka za gumové septum. Tyto úkony byly provedeny v silném protiproudu argonu. Přes septum bylo pomocí injekční stříkačky s jehlou přidáno 50,0 mL (2,5 ekvivalentu, 145 mmol) hexamethyldisilazanu (HMDS). Proud argonu byl nastaven tak, aby bublačkou procházela cca 1 bublinka za 2 s. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána přes noc v olejové lázni o teplotě 105–110 °C.

Po ukončení reakce byl zesílen proud argonu a celá aparatura byla vyjmuta z olejové lázně a ponechána vychladnout na laboratorní teplotu. Přes septum bylo injekční stříkačkou přidáno k reakční směsi 50 mL vysušeného DCM. Za stálého míchání byl přes septum přidán roztok 3,5 g (27 mmol) *t*-butyl akrylátu ve 20 mL suchého DCM. Bylo nutné dbát, aby v injekční stříkačce, jíž byl roztok přidáván, nebyla žádná vzduchová bublina. Reakční směs byla míchána dalších 12 hodin pod mírným proudem argonu.

Další den byl proud argonu značně zesílen a reakční směs byla převedena pomocí kanyly do kádinky obsahující 250 mL ethanolu. Zbytek roztoku byl z původní reakční baňky vymyt dalšími cca 50 mL EtOH. Obě ethanolové frakce byly spojeny a vzniklá suspenze byla odpařena dosucha na RVO v předem zvážené 500 mL kulaté baňce. Odparek byl rozpuštěn ve směsi 100 mL 1% HCl a 100 mL CHCl₃. Bíle zakalená chloroformová směs byla oddělena v dělicí nálevce a vodná fáze byla promyta 2x 100 ml CHCl₃. Organické fáze byly spojeny, byly k nim přidány 3 lžičky bezvodého síranu sodného a malé množství aktivního uhlí. Po odfiltrování pevných složek a odpaření na RVO byl získán produkt ve formě bezbarvého oleje. *Upozornění:* Akryláty jsou karcinogenní látky, které silně dráždí pokožku, obzvlášť pokud jsou ve formě roztoku. Proto je nutné používat ochranné rukavice a s roztoky pracovat pouze v dobře táhnoucí digestoři.

Výtěžek (*t*-butyl ester karboxyethyl-fosfinové kyseliny, **VI**):

23,9 g, 74 %

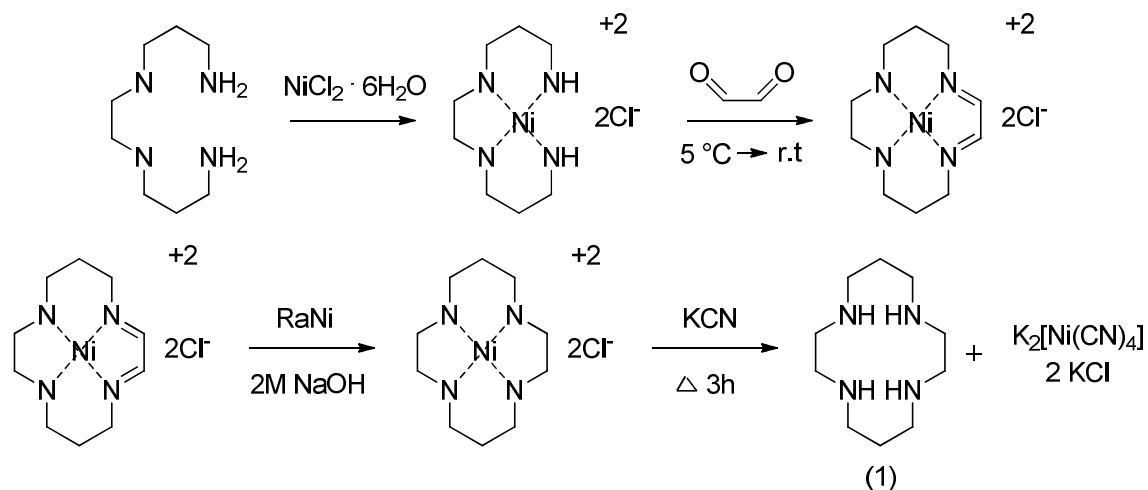
Charakterizace:

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,38 (s, 9H, CH₃); 1,91 (m, 2H, CH₂); 2,45 (m, 2H, CH₂); 7,10 (d, 1H, P–H, ¹J_{PH} = 556); 12,56 (s, 1H, P–OH)

³¹P{¹H}-NMR (CDCl₃): δ 31,0 (s)

³¹P-NMR (CDCl₃): δ 31,8 (d, 1P, P–H, ¹J_{PH} = 584)

2.3.2 Syntéza látky 1 (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan, cyklam)^[88]



Do kádinky o objemu 2 L bylo přidáno 20,0 g (110 mmol) bis(3-aminopropyl)-1,2-ethylendiaminu (3,2,3-amin), který byl následně rozpuštěn v 500 mL destilované vody. Za stálého míchání bylo přidáno 27,3 g (1 ekvivalent, 110 mmol) $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Kádinka s intenzivně fialově zabarveným roztokem byla ponořena do ledové tříště a chlazená na teplotu nižší než 5 °C. Dále bylo smícháno 12,0 g (57 mmol) trimeru glyoxalhydrátu se 120 mL destilované vody. Vzniklá suspenze byla zahřívána na 65 °C a míchána do úplného rozpuštění.

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

Následující den bylo k reakční směsi přidáno 500 mL vodného roztoku NaOH (2M). K takto připravenému roztoku bylo za stálého intenzivního míchání přidáno po částech 25,0 g Raneyova niklu (RaNi) jako katalyzátoru, přičemž byl pozorován vývoj vodíku. Vzniklá suspenze byla míchána přes noc při laboratorní teplotě.

Následovala zdlouhavá filtrace komplexu v roztoku přes vlhkou papírovou kaši (připravena rozmícháním kousků filtračního papíru v destilované vodě) na fritě S3. K filtrátu, získanému v předchozím kroku, bylo přidáno 50,0 g (57 mmol) KCN. Roztok byl převeden do 2L baňky s kulatým dnem a zahříván k varu po dobu 3 hodin pod zpětným chladičem. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl vzniklý cyklam extrahován chloroformem (1 L). Extrakt byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 , přefiltrován na fritě S3 a zahuštěn na RVO na takový

objem, aby právě docházelo ke krystalizaci produktu. Zahuštěný produkt byl přelit velkým nadbytkem MeCN (trojnásobek objemu suspenze). Vzniklý produkt byl odsát na fritě S3, promyt MeCN a sušen proudem vzduchu po dobu 1 hodiny. Bílý prášek byl přes noc dosušen v evakuovaném exsíkátoru nad KOH.

Další část produktu byla získána odpařením matečních louhů a následnou rekrystalizací z vroucího MeCN.

Výtěžek (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan, **1**):

5,9 g, 25 %

Charakterizace:

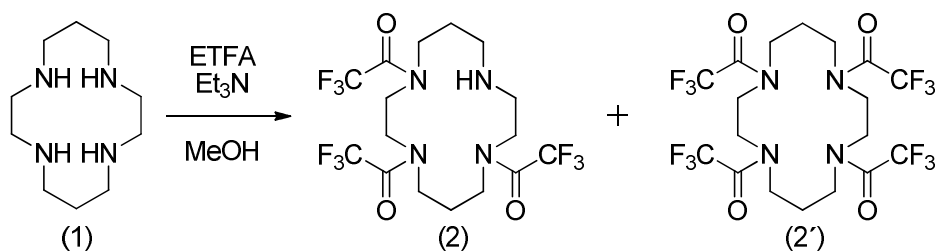
TLC: fialová skvrna; $R_f = 0,0$ ve všech amoniakálních mobilních fázích, $R_f = 0,5$ v soustavě EtOH:CH₃COOH:H₂O (6:1:8)

MS (+): 200,8 ([M+H]⁺, teor. 201,2)

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,71 (p, 4H, CH₂-CH₂-CH₂, ³J_{HH} = 5,1); 2,69 (t, 8H, N-CH₂-CH₂-CH₂, ³J_{HH} = 5,1); 2,71 (s, 8H, N-CH₂-CH₂-N)

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

2.3.3 Syntéza látky **2** (1,4,8-tris(trifluoracetyl)-1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan)^[89]



Do injekční stříkačky bylo nabráno 2,4 mL (4 ekvivalenty, 20 mmol) ETFA, která byla v průběhu 5 minut přidána po kapkách do míchající se směsi 1,0 g cyklamů (5 mmol, **1**) a 0,7 mL Et₃N (1 ekvivalent, 5 mmol) ve 4,0 mL MeOH ve 25 mL baňce. Při této proceduře postačovalo pouze chlazení ve vodní lázni, reakce není výrazně exotermická. Směs byla míchána přes noc (dle literatury^[89] k reakci postačí pět hodin).

Následně byla směs odpařena na RVO do sucha a průhledná sirupovitá látka byla rozpuštěna v minimu ethyl-acetátu. Směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií přes sloupec SiO₂ (80 mL). Po nanesení látky byl sloupec proplachován ethyl-acetátem přibližně

do poloviny objemu 100 mL baňky. Poté byl roztok odpařen na RVO a kolona byla ještě jednou propláchnuta obdobným způsobem do stejné baňky. Část byla odebrána jako vzorek pro MS a obsah baňky byl opět odpařen na RVO do sucha.

Výtěžek (1,4,8-tris(trifluoracetyl)-1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan, **2**):

2,4 g, 98 %

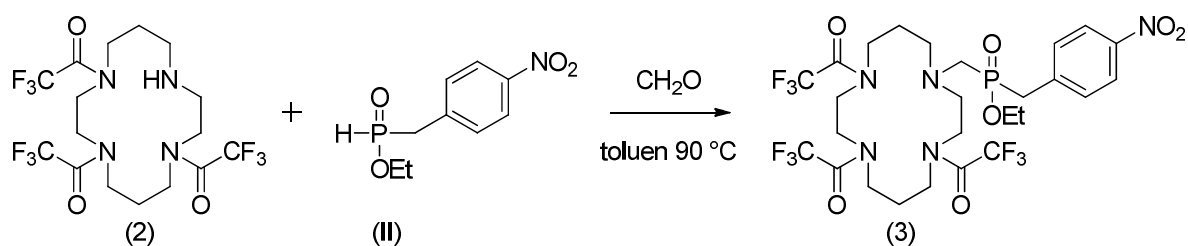
Charakterizace:

MS (+) 2: 511,0 ($[M+Na]^+$, teor. 511,1)

1H -NMR ($CDCl_3$): δ 3,85-3,25 (m, 12H); 2,90-2,80 (m, 2H); 2,74-2,50 (m, 2H); 2,30-1,90 (m, 2H); 1,85-1,63 (m, 2H); 1,25-0,60 (m, 1H)

2.3.4 Navázání fosforového pendantu

Mannichova reakce s ethyl esterem NBPIN



Látka **2** (2,0 g; 4,1 mmol) z předchozí reakce byla rozpuštěna v 30 mL toluenu. Ethyl ester NBPIN (**II**, 2,8 g, 3 ekvivalenty, 12,3 mmol) připravený v předchozích krocích byl odpařen na RVO do sucha a smíchán s chráněným cyklamem v toluenu. Za účelem minimalizace obsahu vody v toluenu byla směs zahřívána k varu s Dean-Starkovou pastí (Dean-Stark Trap) při teplotě lázně $135\text{ }^\circ\text{C}$. Tento postup ovšem nebyl vhodný, směs bouřlivě vypěnila ještě před dosažením požadované teploty.

Roztok byl převeden do 100mL baňky a směs byla zahřívána na $90\text{ }^\circ\text{C}$. V průběhu hodiny bylo za stálého míchání přidáno 0,6 g paraformaldehydu (1,3 ekvivalentu, 20 mmol). Poté byla reakční směs míchána přes víkend a nadále zahřívána na $90\text{ }^\circ\text{C}$.

V baňce se po reakci rozdělily dvě fáze. Ve spodní části baňky se vyskytoval sytý oranžový olej nerozpustný v $CHCl_3$ a nad ním žlutý toluenový roztok. Navíc ve spodní olejové fázi vykrytalizovaly bílé jehlice, které byly rozpustné v DMSO. Část byla odebrána na stanovení pomocí MS. Jednalo se o čtyřikrát substituovaný cyklam (**2'**). Směs byla ještě jednou zahřívána, k homogenizaci nedošlo. Toluenová fáze byla odpařena na RVO do sucha a olejová fáze byla rozpuštěna v EtOH. Byl odebrán vzorek na ^{31}P NMR a MS.

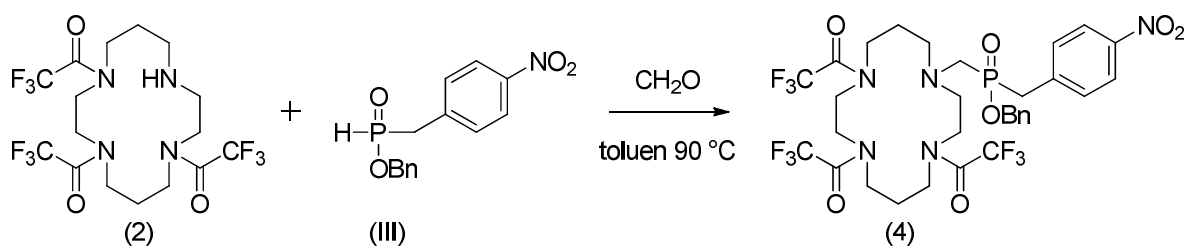
Výtěžek (látka 3):

5,6 g, o čistotě 30 %, nečistoty: viz dále

Charakterizace:

MS (+): 752,3 ($[M+Na]^+$, teor. 752,2); pro čtyřikrát trifluoracetylem substituovaný cyklam: 607,2 ($[M+Na]^+$, teor. 607,1)

^{31}P -NMR (EtOH): δ 47,2-49,3 (1P, $P-CH_2-N$, několik píků, patrně různé konformery v důsledku rigidity acylovaného makrocyklu, souhrnná intenzita ~30 %), jako další látky byly v reakční směsi identifikovány ethyl hydroxomethyl(nitrobenzyl)fosfinát (s, 40,7; 45 %), nitrobenzylfosfinová kyselina (d, 23,9, $^1J_{PH} = 532$; 15 %), nitrobenzylfosfonová kyselina (t, 19,1, $^2J_{PH} = 21$; 10 %).

Mannichova reakce s benzyl esterem NBPIN

Látka **2** (2 g; 4,1 mmol) byla rozpuštěna v 30 mL toluenu. Benzyl ester NBPIN (**III**, 3,6 g, 3 ekvivalenty, 12,3 mmol) připravený v předchozích krocích byl odpařen na RVO do sucha a smíchán s chráněným cyklamem v toluenu ve 100mL baňce. Směs byla zahřívána na 90 °C. V průběhu hodiny bylo za stálého míchání přidáno 0,6 g paraformaldehydu (1,3 ekvivalentu, 20 mmol). Poté byla reakční směs míchána přes víkend a nadále zahřívána na 90 °C.

Následně byla toluenová fáze odpařena na RVO do sucha a olejová fáze byla rozpuštěna v EtOH. Byl odebrán vzorek na ^{31}P NMR a MS.

Výtěžek (látka 4):

4,1 g, o čistotě 27 %, nečistoty: viz dále

Charakterizace:

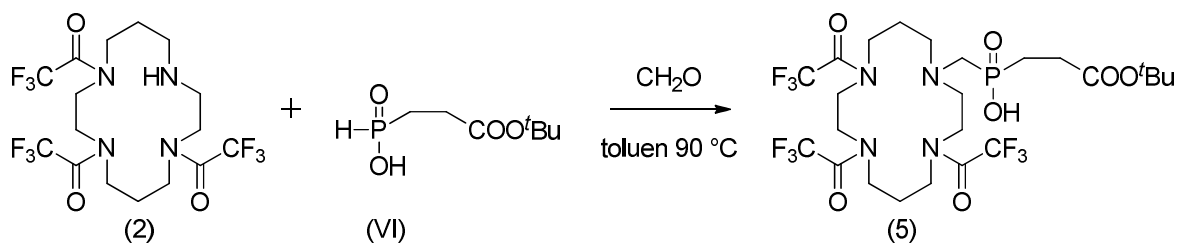
MS (+): 814,2 ($[M+Na]^+$, teor. 814,1)

MS (-): 790,0 ($[M-H]^-$, teor. 790,1)

^{31}P -NMR (EtOH): δ 37,8 (s, 1P, $P-CH_2-N$) s integrální intenzitou 25 %, jako další látky byly ve spektru identifikovány benzyl hydroxomethyl(nitrobenzyl)fosfinát (s, 44,5; 23 %),

nitrobenzylfosfinová kyselina (d, 25,8, $^1J_{\text{PH}} = 532$; 32 %), nitrobenzylfosfonová kyselina (t, 17,9, $^2J_{\text{PH}} = 21$; 9 %).

Mannichova reakce s *t*-butyl esterem karboxyethyl-fosfinové kyseliny



Látka **2** (2 g; 4,1 mmol) byla rozpuštěna v 30 mL toluenu ve 100mL baňce. Dále byl k chráněnému cyklamu přidán *t*-butyl ester karboxyethyl-fosfinové kyseliny (**VI**, 2,4 g, 3 ekvivalenty, 12,3 mmol). Směs byla zahřívána na 90 °C. V průběhu hodiny bylo za stálého míchání přidáno 0,6 g paraformaldehydu (1,3 ekvivalentu, 20 mmol). Poté byla reakční směs míchána přes víkend a nadále zahřívána na 90 °C.

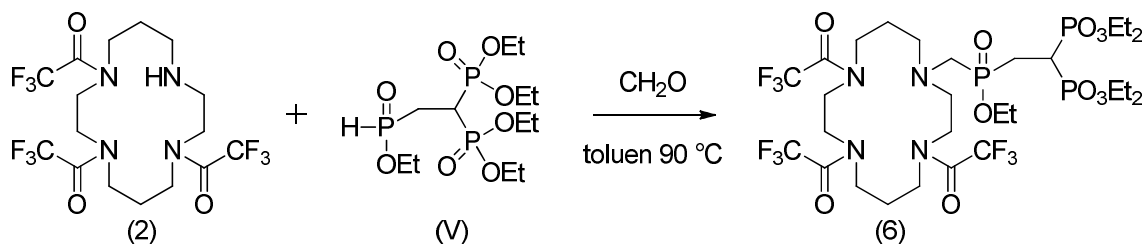
Následně byla toluenová fáze odpařena na RVO do sucha a olejová fáze byla rozpuštěna v EtOH. Byl odebrán vzorek na ^{31}P NMR a MS.

Charakterizace:

V **MS** spektru se vyskytoval signál chráněného cyklamů bez navázaného fosforového pendantu. Signál **MS(+)**: 511,1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, teor. 511,0). Pík odpovídající chráněnému cyklamu s jedním fosforovým pendantem (694,5) se ve spektru nevyskytoval.

V ^{31}P -NMR spektru se nacházel pík se stejným chemickým posunem jako v případě *t*-butyl ester karboxyethyl-fosfinové kyseliny. Navíc nebyl ve spektru pozorován dublet P–H vazby, což značí, že došlo k naoxidování fosfinové kyseliny. Díky tomu neproběhlo k navázání pendantu na makrocyklus Mannichovou reakcí.

Mannichova reakce s monofosfinátem-bis(fosfonátem)



Látka **2** (2 g; 4,1 mmol) byla rozpuštěna v 30 mL toluenu ve 100mL baňce. Dále byl k chráněnému cyklamu přidán monofosfinát-bis(fosfonát) (**V**, 4,8 g, 3 ekvivalenty, 12,3 mmol). Směs byla zahřívána na 90 °C. V průběhu hodiny bylo za stálého míchání přidáno 0,6 g paraformaldehydu (1,3 ekvivalentu, 20 mmol). Poté byla reakční směs míchána přes víkend a nadále zahřívána na 90 °C.

Následně byla toluenová fáze odpařena na RVO do sucha a olejová fáze byla rozpuštěna v EtOH. Byl odebrán vzorek na ^{31}P NMR a MS.

Výtěžek (látka **6**):

4,3 g o čistotě 60 %

Charakterizace:

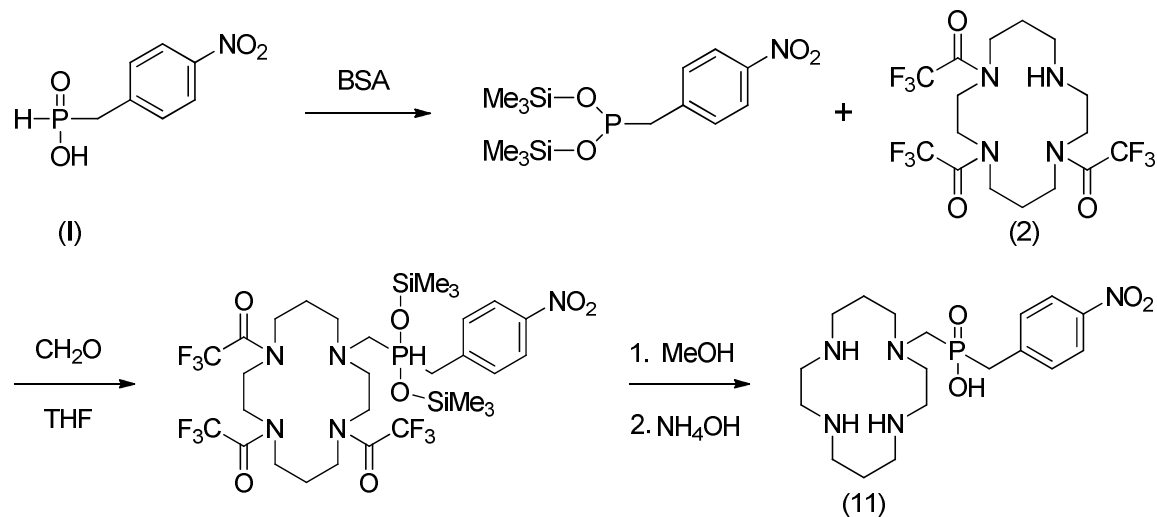
MS (+): 918,0 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, teor. 917,6)

MS (-): 893,7 ($[\text{M}-\text{H}]^+$, teor. 893,6)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (EtOH): δ 26,1 (d, 1P, $P\text{-CH-P}$, $^3J_{\text{PP}} = 23$); 26,5 (d, 1P, $P\text{-CH-P}$, $^3J_{\text{PP}} = 28$); 54,3 (dd, 1P, $\text{CH}_2\text{-P}$, $^3J_{\text{PP}} = 23$, $^3J_{\text{PP}} = 28$)

^{31}P -NMR (EtOH): δ 26,3 (bs, 2P, $P\text{-CH-P}$); 54,3 (s, 1P, $P\text{-CH}_2\text{-N}$)

Mannichova reakce s trimethylsilylesterem NBPIN generovaným pomocí BSA



Do trojhrdlé baňky byly naváženy 3 ekvivalenty (12 mmol) NBPIN (**I**). Po provedené sekuraci aparatury byly přidány 3 ekvivalenty (44 mmol) BSA, látka **2** (2 g, 4 mmol) v suchém THF a 4 ekvivalenty paraformaldehydu (60 mmol). Reakční směs byla míchána dva dny.

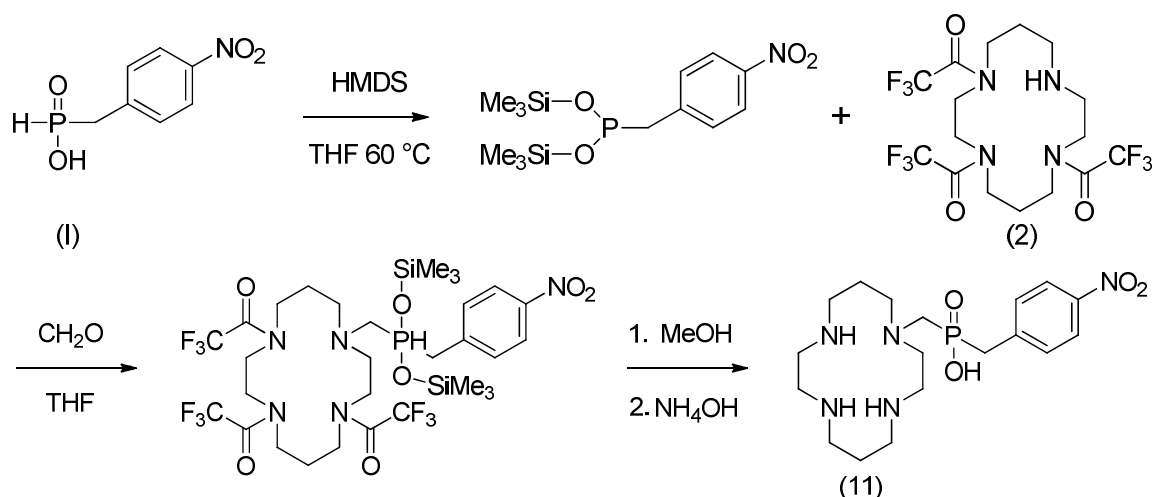
Při této syntéze byla testována oxidační a hydrolytická stabilita směsi pomocí ^{31}P NMR spekter po přidání MeOH.

Charakterizace:

V MS spektru se vyskytoval signál ochráněného cyklamu bez navázaného fosforového pendantu. Signál MS(+): 200,8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, teor. 201,2). Pík odpovídající chráněnému cyklamu s jedním fosforovým pendantem (729,2) se ve spektru nevyskytoval.

V ^{31}P -NMR spektru po hydrolyze MeOH zmizel pík v oblasti 150 ppm. Což značí, že došlo k hydrolyze nebo směs zreagovala s paraformaldehydem. Ve spektru se vyskytovaly signály mnoha látek, ve směsi převažoval NBPON jako produkt oxidace.

Mannichova reakce s trimethylsilylesterem NBPIN generovaným pomocí HMDS



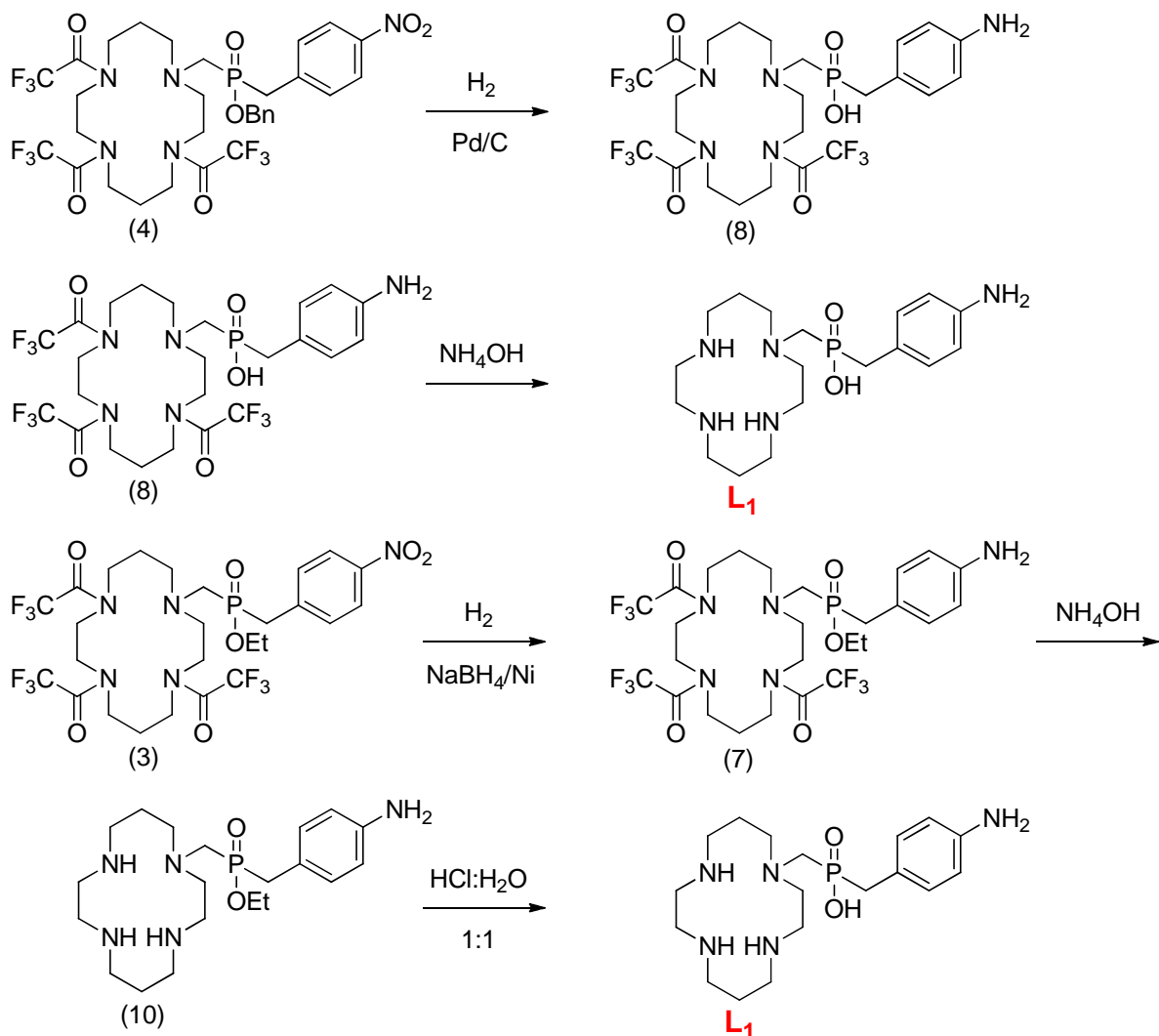
Do trojhrdlé baňky byly přidány 2 mmol NBPIN (I). Po provedené sekuraci byl přidán bezvodý THF, HMDS (2 ekvivalenty, 5 mmol) a směs byla zahřívána na 60 °C a míchána přes víkend. Poté byl odebrán vzorek pro změření ^{31}P -NMR spektra.

Charakterizace:

V ^{31}P -NMR spektru se nacházelo mnoho signálů různých látek. Nad nimi markantně převažoval signál fosfonátu. Vzhledem k tomu již nebyl k reakční směsi přidáván makrocyklus.

2.3.5 Příprava látky L₁

Dalším krokem přípravy žádané látky L₁ byla redukce nitrobenzylové skupiny na aminobenzylovou.



Redukce vodíkem za přítomnosti Pd/C

Přibližně 0,3 g látky **3** ve formě surové směsi (v EtOH) bylo převedeno do 50mL baňky s rovným dnem. Poté bylo přidáno 0,1 g palladia na uhlí. Ke směsi byl přidán přibližně stejný objem EtOH. Do baňky bylo vloženo magnetické míchadlo a zábrus byl namazán silikovým tukem. Baňka byla důkladně sekurována a poté k ní byl připojen balónek napuštěný vodíkem. Vodík byl pomocí kohoutu vpuštěn do baňky se směsí, párkrát bylo spojení přerušeno a hadička byla z baňky vytažena, aby se vyrovnal tlak plynu. Poté byl spoj zajištěn svorkou a směs byla míchána přes víkend při laboratorní teplotě.

Poté byl roztok přefiltrován od katalyzátoru přes dvojitý skládaný filtrační papír do 100mL baňky. Následně bylo pomocí TLC v IPAV (7:1:1) potvrzeno, že hydrogenace s největší pravděpodobností proběhla a tak byla získána látka **7**. Ninhydrinem se skvrna zbarvila fialově a odlišovala se svým odstínem od výchozí látky reakce. Následně byl odebrán vzorek na ^1H NMR spektrum. Byla pozorována změna vzdálenosti a posun aromatického A-B systému oproti výchozímu spektru. Původní A-B systém se ve spektru již nevyskytoval. Tato skutečnost poukazovala na úspěšnou redukci nitroskupiny na aminoskupinu.

Pokus o redukci látky **4** byl proveden zcela analogicky jako v případě látky **3**. V tomto případě došlo ovšem k odštěpení celé pendantní skupiny.

Redukce vodíkem za přítomnosti NaBH_4/Ni

Přibližně 1,5 g nažloutlého oleje (**3**) bylo rozpuštěno v minimu destilované vody a k ní bylo přidáno přibližně stejné množství EtOH. K vzniklému roztoku byl přilít 5% roztok NaOH (pH upraveno na hodnotu 12). Do trojhrdlé 100ml baňky byl navážen hexahydrát chloridu nikelnatého (49 mg, 0,21 mmol, 0,1 ekv.) a následně pod zvýšeným proudem argonu rozpuštěn v přibližně 10 mL destilované vody. K vzniklému roztoku nikelnaté sole byl poté přisypán tetrahydridoboritan sodný (77 mg, 2,0 mmol, 1 ekv.). V okamžiku přidání došlo okamžitě k aktivaci (zčernání obsahu) a ihned byl přidán bazický roztok látky **3**. Po 15 minutách míchání byla přisypána další část NaBH_4 (77 mg, 2,0 mmol, 1 ekv.). Během následujících 2 hodin bylo postupně přidáno dalších 5 ekv. NaBH_4 a vzniklá reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě a pod mírným proudem argonu 24 h.

Poté byla reakční směs filtrována přes dvojitý filtrační papír a proplachována směsí destilované vody a ethanolu v poměru 1:1. Vzniklý filtrát byl odpařen na RVO do sucha. Odparek byl rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a vzniklý roztok byl nanesen na silný kationtový iontoměnič v H^+ -cyklu ((Dowex 50, 50–100 mesh, 100 mL). Kolona byla vyplachována větším množstvím destilované vody (750 mL). Produkt byl následně z kolony eluován směsí $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1. Látka **7** byla získána v podobě žlutého oleje.

Do baňky s látkou **7** rozpuštěnou v EtOH byl přidán koncentrovaný NH_3 v takovém množství, aby byla směs silně bazická (cca pH 9). Obsah baňky byl míchán půl hodiny, směs se viditelně vyčeřila, poté byla odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v H_2O . TLC s touto směsí již vykazovalo přítomnost ochráněného makrocycly (fialová barva po detekci

ninhydrinem, intenzivně modrá barva po detekci roztokem modré skalice). Následně byla směs přečištěna sloupcovou chromatografií na iontoměniči. Byl zvolen silný kationtový iontoměnič (Dowex 50, 50–100 mesh, H⁺ cyklus, 100 mL). Po nanesení vzorku byla kolona propláchnuta 400 mL EtOH:H₂O a následně 400 mL H₂O do Erlenmeyerovy baňky. Poté byla požadovaná látka eluována roztokem HCl:H₂O (1:1) do 250mL baňky a následně odpařena na RVO. TLC (IPAV, 7:1:1) neprokázalo přítomnost nesubstituovaného cyklu (fialová skvrna s $R_f = 0$). Na destičce byla ovšem patrná skvrna s $R_f = 0,3$. Ta mohla odpovídat jednou substituovanému cyklamem.

Následně byla směs přečištěna přes silný aniontový iontoměnič (Dowex 1, 100–200 mesh, OH⁻ cyklus, 100 mL). Po nanesení vzorku byla kolona propláchnuta 400 mL EtOH:H₂O a následně 400 mL H₂O do Erlenmeyerovy baňky.

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

Podle NMR spekter byla kyselina na cyklu stále esterifikovaná, proto byla směs ponechána hydrolyzovat za stálého míchání asi s 60 mL roztoku HCl:H₂O (1:1). Reakční směs byla zahřívána na 100 °C s nasazeným nezapojeným chladičem přes noc.

Poté byla směs odpařena do sucha. Dle TLC bylo opět nutné přečistit látku přes sloupcovou chromatografií na iontoměniči. Látka byla nanesena na silný kationtový iontoměnič (Dowex 50, 50–100 mesh, H⁺ cyklus, 100 mL). Následně byl sloupec propláchnut 1 L H₂O. Požadovaná látka byla eluována směsí HCl:H₂O (1:1) do 250mL baňky a následně odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v H₂O, část byla převedena do 25mL baňky, odpařena a rozpuštěna v D₂O na ¹H a ³¹P NMR.

Dle NMR spekter deesterifikace proběhla. Tato spektra ovšem spolu s TLC stále poukazovala na výskyt jiných látek jako nečistot. Proto byl vzorek opět přečištěn přes sloupcovou chromatografii na iontoměniči. Tentokrát na silném aniontovém iontoměniči (Dowex 1, 100–200 mesh, OH⁻ cyklus, 100 mL). Následně byl sloupec propláchnut 1 L H₂O. Požadovaná látka byla eluována směsí HCl:H₂O (1:1) do 250mL baňky a následně odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v H₂O, část byla převedena do 25mL baňky, odpařena a rozpuštěna v D₂O na ¹H a ³¹P NMR.

Vzorek byl kvantitativně převeden do předem zvážené 25mL baňky a odpařen. Jeho hmotnost činila 90 mg. Následně byl rozpuštěn v minimu destilované vody a byla provedena

TLC v soustavě IPA V (7:3:3). V této soustavě se jednotlivé látky separovaly dobře, ale vzhledem k tomu, že je isopropanol těžko odpařitelný, byla hledána jiná soustava pro následné přečištění na sloupci SiO₂. Nakonec byla nalezená vhodná alternativa, a to směs NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1). Následně byl připraven sloupec SiO₂ a byl propláchnut EtOH:NH₃ (5:1). Poté byla provedena eluce směsí EtOH:NH₃:H₂O (5:1:2), kdy byla jímána frakce do 100mL kulaté baňky. Požadovaný produkt byl na závěr eluován NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1) rovněž do 100mL kulaté baňky. Frakce byla odpařena.

Následně byla směs přečištěna přes silný aniontový iontoměnič (Dowex 1, 100–200 mesh, OH⁻ cyklus, 100 mL). Po nanesení vzorku byla kolona propláchnuta 400 mL EtOH:H₂O a následně 400 mL H₂O do Erlenmeyerovy baňky.

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

Výtěžek (ligand L₁):

150 mg o čistotě 99,7 %

Charakterizace:

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

MS (+): 406,2 ([M+Na]⁺, teor. 406,5)

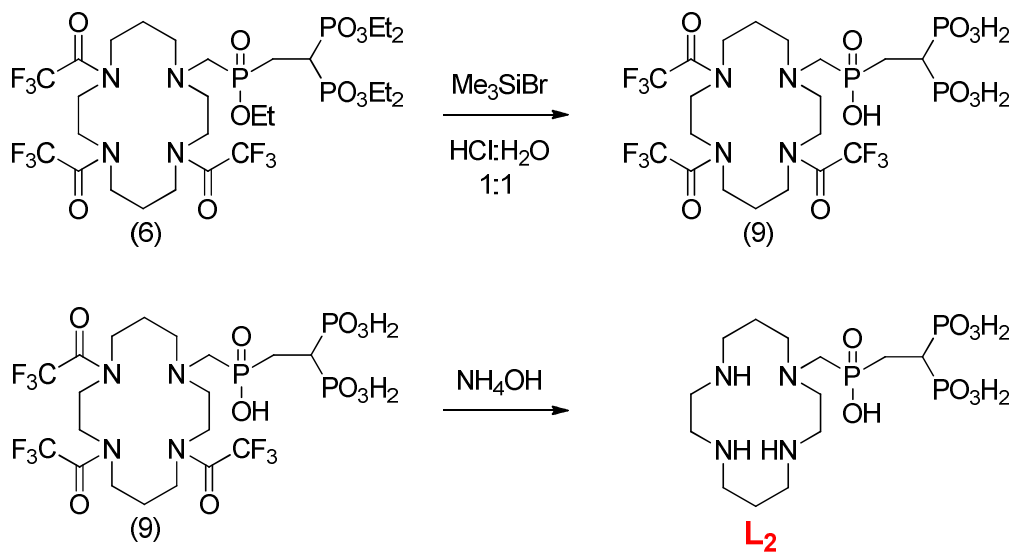
¹H-NMR (D₂O): δ 1,95 (m, 2H); 2,19 (m, H); 2,76 (t, 2H); 2,97 (m, 2H); 3,24 (m, 2H); 3,26 (t, 2H); 3,27 (d, H); 3,31 (t, 2H); 3,36 (t, 2H); 3,54 & 3,57 (m, 2 x 2H); 7,53 (d, arom, 2H); 8,24 (d, arom, 2H)

¹³C-NMR (D₂O): δ 22,0 (s, 1C); 23,1 (s, 1C); 38,6 (d, 1C, ¹J_{CP} = 82); 41,6 (s, 1C); 43,6 (s, 1C); 44,0 (s, 1C); 44,5 (s, 1C); 44,9 (s, 1C); 45,7 (s, 1C); 51,3 (d, 1C, (d, ¹J_{CP} = 108); 54,2 (d, 1C, ³J_{CP} = 6); 55,8 (d, 1C, ³J_{CP} = 6); 124,59 (s, 2C, arom); 131,2 (d, 2C, ³J_{CP} = 6, arom); 142,9 (d, 1C, ³J_{CP} = 8, arom); 148,96 (s, 1C, arom)

³¹P{¹H}-NMR (D₂O): δ 37,8 (s)

³¹P-NMR (D₂O): δ 35,2 (t; ²J_{PH} = 16,5)

2.3.6 Příprava látky L₂



Látka **6** (4,3 g, 4,8 mmol) ve 250 mL baňce byla důkladně odpařena do sucha na RVO. Látka byla rozpuštěna ve 100 mL suchého MeCN a vzniklý roztok byl intenzivně míchán na magnetické míchačce. Baňka byla důkladně obalena z vnější strany alobalem pro zabránění působení světla na reakční směs. Injekční stříkačkou bylo přidáno 3,2 mL trimethylsilylbromidu (20, 9 mmol, 5 ekv.) a baňka byla ihned uzavřena skleněnou zátkou. Reakční směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě.

Po uplynutí reakční doby byla skleněná zátka a zábrus baňky důkladně otřen buničinou (odstranění vygenerovaného HBr) a meziprodukt v baňce byl odpařen na RVO do sucha. Odparek byl poté rozpuštěn v 50 mL bezvodého acetonitrilu. Vzniklý roztok byl rychle vylit do předem připravené kádinky s 500 mL destilované vody. Poté byl obsah baňky přelit do 1 L kulaté baňky a následně odpařen na RVO do sucha. Odparek byl znovu rozpuštěn v 500 mL destilované vody a následně odpařen na RVO (postup byl opakován 3x). Následně byl odebrán vzorek na NMR a MS. Dle spekter došlo pouze k částečné esterifikaci, která byla způsobena malým množstvím přidaného Me₃SiBr (jsou třeba aspoň 3 ekvivalenty na každou ethylovou skupinu). Proto byla látka převedena do 250ml baňky a byla rozpuštěna v koncentrované kyselině chlorovodíkové (100 ml). Po dobu 24 hodin byl obsah zahříván k varu pod zpětným chladičem při teplotě 55 °C. Následně byl obsah baňky odpařen na RVO a postup byl ještě jednou opakován. Poté byl produkt odpařen na RVO a byly odebrány vzorky na NMR a MS spektra.

Dle spekter bylo opět nutné přečistit látku přes sloupcovou chromatografii na iontoměniči. Látka byla nanesa na silný kationtový iontoměnič (Dowex 50, 50–100 mesh, H⁺ cyklus). Následně byl sloupec propláchnut 1 L H₂O. Požadovaná látka byla eluována směsí HCl:H₂O (1:1) do 250mL baňky a následně odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v H₂O, část byla převedena do 25mL baňky, odpařena a rozpuštěna v D₂O na ¹H a ³¹P NMR.

Poté byl olejovitý produkt **L₂** odpařen do sucha, naškrábán a triturován v suchém THF. Dále byl obsah baňky převeden do centrifugační zkumavky a zcentrifugován při 8000 otáčkách během 15 minut. Supernatant byl odsán Pasteurovou pipetou, bylo dolito čerstvé rozpouštědlo, promícháno v ultrazvukové lázni a postup byl opakován ještě pětkrát. Poté byl produkt vysušen ve vakuovém exsikátoru.

Výtěžek (ligand **L₂**):

900 mg o čistotě 99,9 %

Charakterizace:

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno): C₁₃H₃₃P₃N₄O₈·3,5HCl·1,5H₂O: C 25,30 (25,14), H 6,33 (6,41), N 9,00 (9,02), Cl 18,78 (18,98)

TLC: fialová skvrna; R_f = 0,0 ve všech soustavách, dokonce i ve velmi polárních obsahujících amoniak nebo kyselinu octovou

MS (+): 467,8 ([M+H]⁺, teor. 467,4)

MS (-): 465,5 ([M-H]⁻, teor. 465,4)

¹H-NMR (D₂O): δ 2,19 (s, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,29 (s, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,63 (s, 1H); 3,18 (s, 4H); 3,40 (s, 6H); 3,46 (s, 4H); 3,51 (s, 4H); 3,59 (s, 6H)

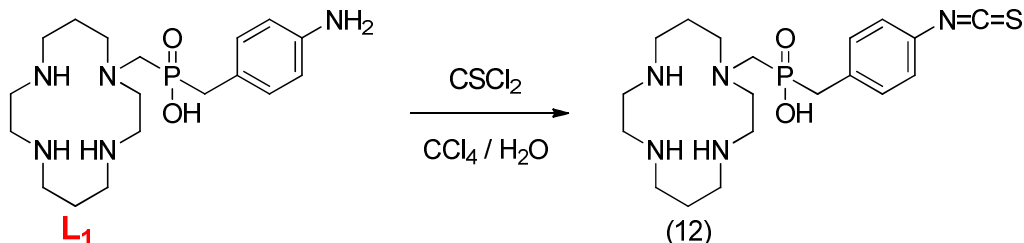
¹³C{¹H}-NMR (D₂O): δ 21,63 (s, 1C, CH₂-CH₂-CH₂); 22,24 (s, 1C, CH₂-CH₂-CH₂); 22,60 (d, 1C, P-C-C, ¹J_{CP} = 15), 27,16 (s); 41,17 (s); 42,18 (s); 43,41 (s); 43,42 (s); 43,98 (s); 44,55 (s); 53,19 (t, 1C, N-C-P, ¹J_{CP} = 98); 54,72 (s); signál terciárního uhlíku (P-C-P) nebyl ve spektru pozorován

³¹P{¹H}-NMR (D₂O): δ 18,9 (s), 33,4 (s)

³¹P-NMR (D₂O): δ 19,4 (d, 2P, PO₃H₂, ²J_{PH} = 22,2); 34,7 (s, 1P, PO₂H)

2.4 Modelová biokonjugace ligandu L₁

Obr.14: Syntéza prekurzoru pro isothiokyanátový kaplink s ligandem L₁



V 50mL baňce bylo rozpuštěno 100 mg (0,5 mmol) ligandu L₁ v 5 mL 0,1M HCl (pH elektrodou byla zkontrolována hodnota pH menší než 1). Roztok byl poté podvrstven 5 mL tetrachlormethanu a bylo přidáno (v dobře táhnoucí digestoři) 120 μ L (1,6 mmol, cca 3 ekv.) thiofosgenu. Za stálého intenzivního míchání byla dvoufázová reakční směs při laboratorní teplotě ponechána přes noc k doreagování. Míchání bylo tak rychlé, aby se obě fáze promíchávaly. Tetrachloromethanová fáze byla druhý den odsáta injekční stříkačkou a vodná fáze s pevnými částicemi produktu byla odpařena na RVO dosucha a byl odebrán vzorek na NMR a MS. K dalšímu použití byl produkt uschován v lednici. Schéma vzniku prekurzoru je uvedeno na **Obr.14**.

Upozornění: Thiofosgen je jedovatá a velmi zápachající látka. Proto je nutné pracovat s ní obezřetně, rychle a veškeré zbytky ihned likvidovat roztokem čpavku v lihu (1:2).

Výtěžek (látka **12**):

80 mg o čistotě 99,5 %

Charakterizace:

MS (+): 426,8 ([M+H]⁺, teor. 426,6)

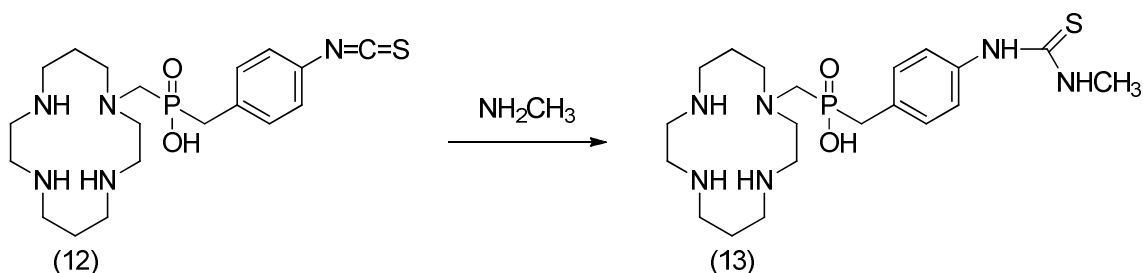
MS (-): 424,6 ([M-H]⁻, teor. 424,6)

³¹P{¹H}-NMR (D₂O): δ 46,4 (s)

³¹P-NMR (D₂O): δ 46,4 (t; ²J_{PH} = 16,5)

Modelovou molekulou pro isothiokyanátový kaplink byl zvolen methylamin. Schéma reakce je uvedeno na **Obr.15**. Do 25mL baňky s 80 mg látky **12** byl přidán vodný roztok methylaminu. Směs byla míchána po dobu 15 minut, poté byla odpařena na RVO a byl odebrán vzorek na MS.

Obr.15: Isothiokyanátový kaplink látky **12** s methylaminem



Výtěžek (látka **13**):

50 mg

Charakterizace:

MS (+): 457,9 ($[M+H]^+$, teor. 457,6)

MS (-): 455,7 ($[M-H]^-$, teor. 455,6)

2.5 Termodynamické vlastnosti komplexů

2.5.1 Potenciometrické titrace ligandu L_2

Pomocí potenciometrických titrací byly stanoveny hodnoty protonizačních konstant volného ligandu L_2 a dále protonizační konstanty a konstanty stability jeho komplexů s ionty Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} a Ca^{2+} . Titrace s kovy byly provedeny ve dvou poměrech ligand:kov 1:1 a 1:2. Koncentrace ligandu byla 0,002 M. Titrace byly provedeny ve směru z kyselého (0,003M HNO_3) do bazického prostředí (0,217M KOH) v rozmezí pH 1,5–13. Všechna měření byla prováděna při teplotě $25 \pm 0,1$ °C a iontové síle 0,1M KNO_3 .

2.6 Kinetické vlastnosti komplexů

2.6.1 Formační kinetika ligandu L_2

Měření na UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2401PC

Pro měření formačních kinetik byly připraveny zásobní roztoky fosforečnanového a chloracetátového pufru. Koncentrace obou pufrů byla 0,033 M. Roztok kyseliny fosforečné byl připraven naředěním 95,1 mg 85% kyseliny fosforečné ve 25mL odměrné baňce (0,033 M). Ve 25mL odměrné baňce byl připraven 0,033M roztok kyseliny chloroctové (78,0 mg).

Dále bylo připraveno 100 mL zásobního roztoku chloridu draselného (1,49 g) o koncentraci 0,20 M, jež slouží k udržení konstantní iontové síly měřeného roztoku. K úpravě pH všech zmíněných pufrů bylo použito 5% roztoku hydroxidu draselného. Bazický roztok

byl připraven rozpuštěním 5,0 g KOH ve 100 mL destilované vody. V 10mL odměrné baňce byl připraven 50mM roztok dihydrátu chloridu měďnatého (85,2 mg).

Roztok ligandu L_2 o koncentraci 1 mM byl připraven rozpuštěním 4,7 mg ligandu L_2 v destilované vodě a následným naředěním na objem 10 mL v odměrné baňce.

Rychlost vzniku měďnatého komplexu ligandu L_2 byla sledována spektrofotometricky při vlnové délce 306 nm, teplotě $25,0 \pm 0,1$ °C, koncentraci ligandu 100 μ M a s iontovou silou 0,1 M (KCl) při různých hodnotách pH.

Aby mohlo být využito kinetiky pseudoprvního řádu vůči ligandu, bylo nejdříve potřeba prověřit lineární závislost k_{obs} na koncentraci měďnatých kationů v roztoku. Tato závislost byla měřena pro pH 2,4. Reakční směs obsahovala 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 a 10 μ L roztoku $CuCl_2$, přičemž bylo dále přidáno vždy 300 μ L chloracetátového pufru, 100 μ L roztoku ligandu, 500 μ L roztoku KCl a voda tak, aby výsledný objem byl 1,000 mL. Do 1cm křemenné kyvety byly nejdříve napipetovány veškeré složky kromě chloridu měďnatého. Kyveta byla následně temperována v karuselu spektrofotometru. Poté bylo rychle přidáno uvedené množství chloridu měďnatého, roztok byl promíchán otočením kyvety a měření bylo ihned spuštěno.

Vlastní měření postupovalo analogicky. Do 1cm křemenné kyvety byly postupně pipetovány požadované objemy jednotlivých zásobních roztoků. Reakční směs se skládala vždy ze 100 μ L ligandu, 300 μ L pufru a 500 μ L roztoku KCl. Hodnota pH pufrů byla zjištěna pomocí pH elektrody a upravena 5% roztokem KOH. Následně byla kyveta s reakční směsí temperována v karuselu spektrofotometru po dobu 5 minut.

Poté bylo přidáno 100 μ L zásobního roztoku $CuCl_2$ a kyveta byla promíchána otočením, vrácena do karuselu spektrofotometru a ihned bylo spuštěno kinetické měření. Doba měření byla volena podle složení reakční směsi v rozmezí několika sekund až jednotek minut.

Po ukončení kinetického experimentu byla zjištěna konečná hodnota pH roztoku v měřící kyvetě. Hodnota pH použitá pro výpočty byla získána jako aritmetický průměr výchozí hodnoty pH (výchozí pH všech komponent v kyvetě vyjma měďnatých iontů) a konečné hodnoty pH (pH po ukončení kinetického měření).

Měření na stopped-flow reakčním analyzátoru SX.18MV

Pro měření formačních kinetik byly připraveny zásobní roztoky fosforečnanového, chloracetátového, acetátového a MES pufru. Koncentrace všech pufrů byla 0,02M. Roztok kyseliny fosforečné byl připraven naředěním 115,3 mg 85% kyseliny fosforečné v 50mL odměrné baňce (0,02 M). V 50mL odměrné baňce byl připraven 0,02M roztok kyseliny chloroctové (94,5 mg). Roztok kyseliny octové byl připraven naředěním 60,7 mg 99% kyseliny octové v 50mL odměrné baňce (0,02 M). V 50mL odměrné baňce byl připraven 0,02M roztok MES (195,2 mg).

Dále bylo připraveno 250 mL zásobního roztoku chloridu draselného (1,86 g) o koncentraci 0,10 M, jež slouží k udržení konstantní iontové síly měřeného roztoku. K úpravě pH všech zmíněných pufrů bylo použito 5% roztoku hydroxidu draselného. Bazický roztok byl připraven rozpuštěním 5 g KOH ve 100 mL destilované vody. Ve 100mL odměrné baňce byl připraven 2mM roztok chloridu měďnatého (34,1 mg).

Roztok ligandu L_2 o koncentraci 0,04 mM byl připraven rozpuštěním 1,9 mg ligandu L_2 v 0,1M roztoku chloridu draselného spolu s příslušným pufrem o koncentraci 0,02 M na objem 100 mL v odměrné baňce.

Rychlost vzniku měďnatého komplexu ligandu L_2 byla sledována spektrofotometricky při vlnové délce 306 nm, teplotě 25,0 °C, koncentraci ligandu 20 μ M a s iontovou silou 0,1 M (KCl) při různých hodnotách pH.

Hodnota pH pufrů byla zjištěna pomocí pH elektrody a upravena 5% roztokem KOH. Pro zjištění konečného pH byla v malých vialkách připravena analogická reakční směs, která byla měřena po 5 minutách (po ukončení komplexace).

Používaný přístroj provádí automatické dávkování chloridu měďnatého a ostatních komponent nezbytných pro měření. Pomocí pístů byly nadávkovány příslušné objemy a poté bylo měření automatizováno.

Hodnota pH použitá pro výpočty byla získána jako aritmetický průměr výchozí hodnoty pH (výchozí pH všech komponent vyjma měďnatých iontů) a konečné hodnoty pH (pH po ukončení kinetického měření v připravených vialkách).

2.6.2 Disociační kinetika komplexu Cu-L₂

Odměrný roztok hydroxidu sodného (0,103 M) byl ofaktorován titrací navážky dihydrátu kyseliny šťavelové. Tímto roztokem byla titrována kyselina chloristá, stanovená koncentrace činila 5,43 M.

K udržení konstantní iontové síly (5,0 M) roztoků byl zvolen roztok chloristanu sodného. Ve 250mL odměrné baňce bylo rozpuštěno 193,13 g chloristanu sodného, výsledná koncentrace byla 5,5 M. V **Tab.5** jsou uvedeny složení roztoků pro měření disociačních kinetik komplexu Cu-L₂.

Tab. 5: Složení roztoků pro měření disociačních kinetik Cu-L₂

$c(\text{HClO}_4)$ [M]	$V(\text{HClO}_4)$ [μL]	$V(\text{NaClO}_4)$ [μL]	$V(\text{Cu-L}_2)$ [μL]
4,89	900	0	100
3,99	735	165	100
3,01	555	345	100
2,01	370	530	100
1,00	185	715	100
0,75	140	760	100
0,50	92	808	100

Měďnatý komplex Cu-L₂ pro kinetická měření byl připraven následujícím postupem.

Do malé lékovky bylo naváženo 27,5 mg ligandu L₂. Ligand byl následně rozpuštěn ve 4 mL destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 10,1 mg (1 ekv.) dihydrátu chloridu měďnatého. Následně bylo upraveno pH vzniklého roztoku 5% roztokem NaOH na hodnotu pH 4 a pH 10. Oproti předpokladům vzniká při rozdílných pH pouze jeden izomer. Vzniklá reakční směs byla ponechána míchat při laboratorní teplotě přes noc. Poté byla čistota ověřena pomocí TLC: $R_f = 0,0$ ve všech amoniakálních i octanových mobilních fázích.

Poté byl vzniklý roztok kvantitativně převeden do 10mL odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou. Byl připraven komplex o koncentraci 5,9 mM.

Nejdříve byla proměřena absorpční křivka komplexu (závislost absorbance na vlnové délce) pro určení nejvhodnější vlnové délky. Do 1cm křemenné kyvety (objem 1 mL) byla napipetována kyselina chloristá a roztok chloristanu sodného. Vzniklá reakční směs byla následně v karuselu spektrofotometru vytemperována na teplotu 40 °C (měření bylo provedeno i při teplotách 50 °C, 60 °C a 70 °C s tolerancí přibližně $\pm 0,1$ °C).

Poté byla kyveta vyjmuta z prostoru spektrofotometru, rychle bylo přidáno 100 μL roztoku komplexu Cu-L₂. Vzniklý roztok byl promíchán otočením kyvety. Kyveta bylo co nejrychleji vrácena do karuselu spektrofotometru a kinetické měření bylo spuštěno.

Byla měřena závislost absorbance při 306 nm na čase. Doba experimentu byla měněna v závislosti na rychlosti disociace komplexu v rozmezí desítek minut až po jednotky hodin.

2.6.3 Radiokomplexace ligandu L_2 s ^{61}Cu

Niklová fólie, která byla ozařována svazkem urychlených deutronů, byla po ukončení reakce rozpuštěna v 1 mL asi 40% HNO_3 (TraceSELECT Ultra, 65%, Fluka). Poté byl roztok odpařen do sucha na RVO. Následně byl rozpuštěn v 1 mL koncentrované HCl (TraceSELECT Ultra, 30%, Fluka). Tento krok byl zopakován ještě dvakrát. Poté byl odparek rozpuštěn v 8M HCl a nanesen na kolonu 7x50 mm naplněnou ionexem (Biorad, AG 1-X8, 100–200 mesh) kondiciovaným v 8M HCl . Kolona byla promyta 8M HCl , přítomný nikl protekl spolu s mobilní fází. Radioaktivní měď ve formě tetrachloridoměďnatého komplexu zůstala zachycena na iontoměničce. Eluce mědi byla provedena 5 mL H_2O (Smart2Pure UV/UF, vodivost 18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$). Eluát byl odpařen do sucha a rozpuštěn v 1 mL 0,05M HCl . Takto připravený roztok byl následně použit k vlastnímu experimentu.

Pro experiment bez přidaného nosičový bylo ponecháno 310 μL radioaktivní mědi, pro nosičový experiment 620 μL . Dále bylo odebráno 50 μL na stanovení AAS a 10 μL na určení radiochemické čistoty.

Poté byl připraven zásobní roztok ligandu L_2 v různých poměrech. Bylo naváženo 4,55 mg ligandu L_2 a ten byl rozpuštěn v 1 mL H_2O v plastové zkumavce. Byl získán roztok o výchozí koncentraci ligandu $9,06 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Následně bylo odebráno 100 μL do další zkumavky a tento objem byl naředěn 900 μL H_2O . Analogicky bylo připraveno 6 zkumavek desítkovým ředěním až po koncentraci ligandu $9,06 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Následně byly připraveny tři pufrůy o pH 4, 5,5 a 7,4. Pro pH 4 a 5,5 byl zvolen 1M octan sodný (8,203 g octanu sodného na 100 mL), který byl titrován na požadované pH 80% kyselinou octovou. Pro pH 7,4 byl zvolen 1M dihydrogenfosforečnanový pufr. Bylo naváženo 13,6 g KH_2PO_4 a ten byl rozpuštěn ve 100 mL H_2O . Na požadovanou hodnotu pH byl roztok titrován 5M NaOH . Rovněž bylo připraveno 100 mL mobilní fáze. Byla zvolena směs IPOV 1:1:1 spolu s 0,2 g NaCl .

Dále byl připraven roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Bylo naváženo 1,131 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, toto množství bylo kvantitativně převedeno do 100mL odměrné baňky a objem byl doplněn H_2O po rysku. Z takto připraveného roztoku bylo odebráno 20 μL do 10mL odměrné baňky.

Následně bylo přidáno 620 μL roztoku radiomědi v 0,05M HCl. Odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Byl připraven roztok o koncentraci mědi $9,06 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Následně byla připravena série zkumavek a do nich se postupně pipetovalo 10 μL roztoku ligandu, 10 μL pufru a na závěr 10 μL roztoku radiomědi s nosičem. V těchto 10 μL byla aktivita přibližně 100 kBq. Reakční směs ve zkumavkách byla ponechána po dobu 90 minut v klidu. Následně bylo na start TLC destičky postupně nanášeno vždy 0,5 μL roztoku radiomědi s nosičem a vedle 1 μL z připravené reakční směsi. Takto byla získána soustava TLC experimentů, kde se zohledňoval především faktor poměru kov:ligand a vliv pH. Byl připraven experiment pro poměr kov: ligand 1:100, 1:10 a 1:1 (při pH 7,4). Rovněž byly porovnávány podmínky pH při stejném poměru kov: ligand (1:100) při pH 4, 5,5 a 7,4.

Poté následoval experiment bez přidaného nosiče. Byly připraveny zkumavky a do nich se postupně pipetovalo 10 μL roztoku ligandu, 10 μL pufru o pH 7,4 a na závěr 10 μL radiomědi bez přidaného nosiče. Tato reakční směs byla ponechána po dobu 90 minut v klidu. Následně bylo na start TLC destičky postupně nanášeno vždy 0,5 μL roztoku radiomědi bez přidaného nosiče a vedle 1 μL z připravené reakční směsi. Takto byla získána soustava TLC experimentů, kde se zohledňoval především faktor nadbytku ligandu.

Takto připravené TLC destičky byly ponořeny do cely s mobilní fází a ponechaly se volně vyvíjet. Čelo mobilní fáze bylo označeno 0,5 μL radiomědi v pravém horním rohu. Destičky byly ponechány v digestoři, dokud se neodpařila mobilní fáze. Poté byly přelepeny lepící páskou a detekovány.

Autoradiografický systém CYCLONE PLUS funguje na podobném principu jako radiofotoluminiscenční dozimetry. Nejdříve byla destička potažená tenkou vrstvou fosforu BaFBr: Eu^{2+} po dobu 2 minut vystavena intenzivnímu bílému světlu s odfiltrovanou UV složkou. Poté byla destička položena na TLC destičky a uzavřena v pouzdře, které nepropouští světlo. Povrch detekční destičky se vyznačuje tím, že má v elektronovém pásu pasti, v nichž je zachycen elektron excitovaný ionizujícím zářením. Poté bylo ve tmě otevřeno pouzdro a vyvíjecí destička byla vsazena do kotouče a umístěna do přístroje. V něm byly zachycené elektrony uvolňovány ze svých pastí excitací laserem. Při deexcitaci je vyzářen foton o jiné vlnové délce a ten byl změřen. Poloha, ze které je foton vyzářen a celkový počet fotonů (intenzita) vyzářených z daného místa byla zaznamenána přístrojem. Takto změřené záznamy byly na závěr vyhodnoceny programem OptiQuantTM. Destička byla připravena k dalšímu měření vždy po vystavení bílému světlu, kdy došlo k obnovení záznamové schopnosti.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Příprava prekurzorů

3.1.1 Syntéza látky I

Prvním prekurzorem k syntéze cílového ligandu je 4-nitrobenzylfosfinová kyselina (**I**, NBPIN). Jedná se o dvoukrokovou syntézu. Reakce musí probíhat v inertní atmosféře, neboť jak bis(trimethylsilyloxy)fosfin (BTSP), tak silylestery fosfinových kyselin jsou velice citlivé na vlhkost (dochází k hydrolyze trimethylsilylové skupiny) a oxidaci (bis(trimethylsilyloxy)fosfin je samozápalný). Z tohoto důvodu nebyl také meziprodukt bis(trimethylsilyloxy)fosfin izolován.

BTSP je možné alkylovat do dvou stupňů, proto mimo žádaného produktu **I** (4-nitrobenzylfosfinová kyselina, NBPIN) vzniká v průběhu reakce také bis(4-nitrobenzyl)-fosfinová kyselina (**I***, NB₂PIN). Její vznik je možné omezit použitím dvojnásobného nadbytku BTSP oproti 4-nitrobenzylbromidu (NBB). V přítomnosti oxidačních činidel (kyslíku) může docházet k oxidaci fosfinové skupiny za vzniku 4-nitrobenzylfosfonové kyseliny (**II****, NBPON).

Při zahřívání reakční směsi v HMDS (105–110 °C) nesmí teplota přesáhnout jeho bod varu a to 120 °C. Když teplota lázně dosáhne cca 80 °C, začíná se uvolňovat velké množství amoniaku, který způsobí rychlejší proudění plynu přes bublačku.

V jednom případě nedošlo dle očekávání ke krystalizaci produktu (NBPIN) po ochlazení filtrátu. Z tohoto důvodu byl filtrát extrahován 20 mL HCl ve 200 mL CHCl₃. Po odpaření vodné fáze bylo k odparku přidáno 100 mL 10 % HCl a 100 mL chloroformu. Za 3 dny cílený produkt **I** vykrytalizoval. Organická fáze, která byla použita při extrakci, poskytla další množství produktu. Po dvou dnech se v chloroformu vyloučila bílá sraženina, která byla rekrystalizována z horké vody. Jednalo se o pro další syntézu dostatečně čistý produkt **I** (čistota 90 %).

3.1.2 Syntéza látky II

Reakce s DCC, DMAP v bezvodém EtOH

Esterifikace 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny (NBPIN, **I**) probíhá kvantitativně, kromě požadavků na reagentie (bezvodý EtOH) záleží také na délce reakce. Přibližně po dvou dnech lze dle ³¹P NMR spektra pozorovat téměř 100% konverzi NBPIN (**I**) na NBPINOEt (**II**).

Tuto reakci vždy doprovází vyloučení DCU (z DCC), které neprobíhá kvantitativně. Obsah baňky po reakci je nutné několikanásobně odpařit na RVO do sucha, odparek rozpustit v EtOH a vyloučenou DCU následně zfiltrovat na fritě. Při první filtraci je vyloučeno asi 75 % DCU, při druhé celkově kolem 83 %, po třetí 88 % a po čtvrté 91 %. Následné filtrace už oscilují kolem hodnoty 95 % a to poměrně neměně.

I přes tento opakovaný postup DCU zůstává v malém množství jako nečistota v připraveném ethylesteru. V několika případech bylo pozorováno její vyloučení z reakční směsi po následné Mannichově reakci.

Reakce s ethylchloroformiátem

Esterifikace 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny (NBPIN, **I**) probíhá kvantitativně. Tato reakce se zdá být výhodnější než poslední zmíněná reakce. Hlavním důvodem je absence DCU, která v některých případech provázela i další syntetické kroky.

Zbytků 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny je možno se zbavit extrakcí do 5% vodného roztoku NaHCO_3 ; požadovaný produkt (ester) za daných podmínek zůstává v organické fázi (CHCl_3). Fosfonáty lze následně odextrahovat mírně obazičtěným nasyceným vodným roztokem NaCl.

3.1.3 Syntéza látky III

Esterifikace 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny (NBPIN, **I**) vede k reakci na benzyl ester 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny (NBPINOBN, **III**). Po přidání benzylchloroformiátu a báze nedošlo k vyčeření reakční směsi. Proto byl přidán další objem těchto reagentů. Po jejich přidání se roztok vyčeřil. S největší pravděpodobností je nutné v této reakci přidat již na začátku větší nadbytek báze (pyridin), protože dochází k generování HCl, což má za následek zpomalení reakce.

Zbytků 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny je možno se zbavit extrakcí do 5% vodného roztoku NaHCO_3 ; požadovaný produkt (ester) za daných podmínek zůstává v organické fázi (CHCl_3). Fosfonáty lze následně odextrahovat mírně obazičtěným nasyceným vodným roztokem NaCl. Případný BnOH by se dal odstranit destilací s vodní parou.

3.1.4 Syntéza látky IV

Příprava [tetraethyl]vinyliden-1,1-bis(fosfonátu) (**IV**), jakožto vstupní komponenty pro přípravu dalšího fosforového prekursoru (**V**), je dvoukrokovou syntézou. V prvním kroku je z [tetraethyl]metylen-bis(fosfonátu), paraformaldehydu a diethylaminu generován methoxy-meziprodukt, který není izolován. Tento meziprodukt dále reaguje v druhém kroku syntézy s *p*-toluensulfonovou kyselinou za vzniku žádaného produktu **IV**.

Odpařování s toluenem pro odstranění zbytků MeOH v reakční směsi by mělo proběhnout vícenásobně z důvodu postupného ustavování rovnováhy.

3.1.5 Syntéza látky V

Monofosfinát-bis(fosfonát) je důležitým fosforovým prekurzorem pro syntézu ligandu **L₂**. Jedná se o dvoukrokovou syntézu. Nejdříve byla připravena kyselina fosforová jako vstupní komponenta prvního kroku syntézy. Kyselina fosforová se připravuje iontovou výměnnou reakcí fosforanu sodného na silném kationtovém iontoměničci. Reakcí kyseliny fosforové a trimethylsilyl(ethyl)etheru byl generován ethyl ester kyseliny fosforové. Konverze byla kvantitativní během dvou hodin. Druhým krokem syntézy byla reakce ethyl esteru kyseliny fosforové a vinyliden(bis)fosfonátu (**IV**) spolu s *N*-ethyl-diisopropylaminem.

Produkt vykazoval syntetickou čistotu. V jednom případě bylo ovšem třeba produkt přechistit. Byla použita chromatografie na silikagelu (mobilní fáze: EtOAc:EtOH 3:1, $R_f = 0,4$). Produkt byl extrahován do DCM. Do vody byly extrahovány nečistoty obsažené ve výsledné reakční směsi.

3.1.6 Syntéza látky VI

Dalším fosforovým prekurzorem je *t*-butyl ester karboxyethyl-fosfinové kyseliny (**VI**). Jedná se o dvoukrokovou syntézu. V prvním kroku je z fosforanu amonného a hexamethyldisilazanu *in situ* generován reaktivní bis(trimethylsilyloxy)fosfin (BTSP). Druhým krokem je jeho adice na dvojnou vazbu *t*-butyl akrylátu a následná hydrolýza silylesterů ethanolem.

Zákonitosti a specifika syntézy spolu s vlastnostmi meziproduktů jsou blíže popsány v odstavci **3.1.1**.

3.1.7 Syntéza látky 1

Syntéza hlavního prekursoru cyklamu (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekanu) byla uskutečněna několikakrokovou templátovou syntézou z 3,2,3-aminu (1,5,8,12-tetraazadodekanu) na Ni^{2+} kationtu. Za účelem přípravy cyklického komplexu bylo reagováno s glyoxalem a vzniklé dvojné vazby byly redukovány vodíkem v přítomnosti Raneyova niklu. Pro dekomplexaci niklu z makrocyclu a získání volného cyklamu byl použit kyanid draselný. Při přípravě bylo postupováno dle optimalizovaného postupu uvedeného v literatuře^[88], meziproducty nebyly během přípravy izolovány.

Velmi nízký výtěžek reakce (25 %) je přisuzován s největší pravděpodobností ztrátové extrakci chloroformem. Přechod produktu do chloroformu probíhá velmi neochotně z důvodu jeho dobré rozpustnosti ve vodě. Proto je vhodné provádět extrakci vícenásobně za účelem získání vyššího výtěžku.

3.1.8 Syntéza látky 2

Nesymetrické ochránění volného cyklamu ve třech polohách za vzniku 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,8-tris(trifluoracetylu) bylo publikováno v literatuře.^[89] Výtěžek reakce byl vysoký (98 %), původní literatura^[89] uvádí podobný výtěžek a to 92%. Navíc bylo zjištěno, že reakce při přidavku ETFA není výrazně exotermická a postačí proto pro chlazení pouze vodní lázeň, ne ledová.

Spolu s produktem (**2**) vznikají při reakci v malé míře také další dvě látky. Jedná se o čtyřikrát (**2'**) a dvakrát substituovaný cyklam. Jejich přítomnost ve směsi byla potvrzena hmotnostní spektrometrií.

Produkt (**2**) postupoval do dalších reakcí za přítomnosti látky **2'**, která se naruší od disubstituovaného produktu nedá odstranit sloupcovou chromatografií na sloupci SiO_2 . Prochází tedy podobně jako produkt **2** spolu s mobilní fází (ethyl acetát). Rozsáhlejší vznik čtyřikrát substituovaného cyklamu (**2'**) je omezen přidavkem Et_3N .^[89]

Čtyřikrát substituovaný cyklam (**2'**) se může delším stáním vyloučit v reakční směsi ve formě bílých krystalků, ve většině případů tento jev však nebyl pozorován. Krystalky jsou částečně rozpustné v chloroformu, nejlépe však v DMSO (naměřeno MS). Naopak se nerozpouštějí v H_2O , EtOH ani v NH_3 . Přítomnost této látky v reakční směsi ovšem nijak neovlivňuje výtěžku v dalších krocích syntézy, protože všechny dusíkové heteroatomy jsou již

obsazeny. Navíc je přítomna pouze v nepatrném, stopovém, množství a tak nebyla existence této látky nijak zohledňována.

3.1.9 Mannichovy reakce

K zavedení fosforového pendantní ramene na makrocyklus byla použita Mannichova reakce v prostředí toluenu. Za účelem snížení obsahu vody v toluenu bylo zamýšleno využití Dean-Starkovy pasti. Tato metoda se ovšem neukázala jako vhodná, neboť za varu směs bouřlivě pění. Proto byl obsah baňky zahříván pouze na 90 °C a paraformaldehyd byl přidáván postupně.

Standardní poměr fosforového prekurzoru ku makrocyklu byl 3:1. S ohledem na tuto skutečnost se ve ^{31}P NMR spektrech primárně hledal pík odpovídající třetinové intenzitě původního prekurzoru. Mannichova reakce s ethyl a benzyl estery nitrobenzylfosfinové kyseliny a také s monofosfinátem-bis(fosfinátem) (**II**, **III** a **V**) probíhá spolehlivě.

Mannichova reakce s *t*-butyl esterem karboxyethyl-fosfinové kyseliny (**VI**) neproběhla. Zřejmě byly zvoleny nevhodné podmínky pro Mannichovu reakci (toluen, 90 °C).

Reakce se silylačními činidly probíhaly v inertní argonové atmosféře. V prvním případě bylo použito BSA a ve druhém HMDS. Navázání fosfinátového pendantu bylo opět docíleno Mannichovou reakcí. Měřená ^{31}P NMR spektra měla rozšířenou škálu do oblasti kolem 150 ppm, kde byl očekáván výskyt silylovaného meziprojektu.

V rámci syntézy s BSA byla zkoumána oxidační a hydrolytická stabilita ve směsi před hydrolyzou silylů. Dle ^{31}P NMR spekter se v průběhu 24 hodin složení směsi nezměnilo. Stále se vyskytoval ostrý pík v oblasti δ 151,2 a nebyl pozorován vznik jiných signálů. Meziprojekt se tedy jeví jako oxidačně stálý. Ovšem po hydrolyze silylů došlo k současnému odštěpení celého pendantu. Ve směsi se poté vyskytoval cyklus pouze ve formě volného cyklamu. Signál **MS(+)**: 200,8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, teor. 201,2).

Podobným směrem se ubírala reakce s HMDS. Použitý THF obsahoval zřejmě stopy vody a tak se ve směsi vyskytoval převážně zoxidovaný fosfonát. Z tohoto důvodu už nebyla k reakční směsi přidávána látka **2**.

3.1.10 Syntéza látky L₁

Příprava cílové látky L₁ vychází z Mannichovy reakce chráněného cyklamů (2) spolu s ethyl esterem NBPIN (II). Získaná látka 3 byla podrobena hydrogenaci (redukce nitrobenzylu na aminobenzyl) a následné bazické (odchránění cyklamového skeletu) a kyselé hydrolýze (odštěpení esterové funkce fosforového pendantního ramene).

Přítomnost nitrobenzylu na fosfinátovém pendantním rameni způsobuje odtahování elektronů z N–C–P vazby a tím způsobuje větší labilitu pendantu na cyklu. Z tohoto důvodu směřovala syntéza k redukci nitrobenzylu na aminobenzyl, který naopak N-C-P vazbu stabilizuje a pendant se tak stal odolnějším vůči hydrolýze.

Hydrogenace nitrobenzylu byla uskutečněna pomocí vodíku a palladia na aktivním uhlí a také pomocí vodíku za přítomnosti NaBH₄ a niklu. Pro syntézu je vhodnější redukce s borohydridem sodným, která nezpůsobuje odštěpení pendantního ramene. Naopak redukce s palladiem působila nešetrně. Přibližně v polovině realizovaných redukcí způsobila odštěpení pendantního ramene. Je proto vhodnější tuto redukci zahájit s menším množstvím Pd/C, reagovat delší dobu a v případě neúplného doreagování doplnit vodík a malé množství čerstvého katalyzátoru.

Pomocí TLC v IPA V (7:1:1) je možné snadno potvrdit, že hydrogenace s největší pravděpodobností proběhla. V ninhydrinu se skvrna zbarví fialově a odlišuje se svým odstínem od výchozí látky reakce. Dále je možné potvrdit redukce pomocí ¹H NMR spekter. Při redukci nitroskupiny na aminoskupinu dojde ke změně aromatického A–B systému ve vodíkovém spektru.

Následné bazické odchránění cyklamů probíhá velmi ochotně už v případě zředěného amoniaku (5%). Hydrolýza ethyl esterové skupiny probíhá v prostředí HCl:H₂O (1:1). Po těchto reakcích následovala série chromatografií na iontoměničích. Požadovaná látka byla z iontoměničů eluována vždy roztokem HCl:H₂O (1:1). Na závěr byl produkt přečištěn přes sloupec silikagelu v soustavě NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1). Cílový produkt (L₁) měl v soustavě NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1) R_f = 1,2 a byl ze sloupce SiO₂ eluován směsí NH₃:EtOH:H₂O (1:1:1).

3.1.11 Syntéza látky L₂

Příprava cílové látky vychází z Mannichovy reakce chráněného cyklamů (2) spolu s monofosfinátem-bis(fosfonátem) (V). Získaná látka 6 byla podrobena hydrolýze ethyl

esterových skupin. Při reakci byly zvoleny pouze dva ekvivalenty na každou ethyl esterovou skupinu. V tomto případě nebyla hydrolyza úplná a reakční směs musela být následně zahřívána k varu v koncentrované HCl. Optimalizací byly určeny 3 ekvivalenty trimethylsilylbromidu na každou ethyl esterovou skupiny (celkem tedy 15 ekvivalentů). Při reakci s trimethylsilylbromidem je nutné, aby na obsah baňky nepůsobilo světlo. Tomu se dá zabránit obalením reakční baňky alobalem. Dále je kladen důraz na použití vysoce bezvodého rozpouštědla (MeCN). Při reakci se v okolí zábrusu vygenerovala kyselina bromovodíková, která byla před zpracováním reakční směsi v baňce otřena buničinou. Hydrolyza silylesterů v MeOH probíhala bouřlivě, proto je vhodné volit větší objem kádinky. Při odpařování směs významně pěnila.

Následně byla látka přečištěna přes silný kationtový iontoměnič a eluována směsí HCl:H₂O (1:1). Olejovitý produkt **L**₂ byl odpařen do sucha, naškrábán a triturován v suchém THF a vysušen ve vakuovém exsikátoru. Ligand **L**₂ na vzdušné vlhkosti mění své skupenství z pevné látky na olej. Proto musí být produkt uchován v uzavřené lahvičce.

3.2 Modelová biokonjugace ligandu **L**₁

Aromatický amin ligandu **L**₁ je ideálním prekurzorem pro zavedení isothiokyanátové skupiny. Jako model byl zvolen methylamin, především proto, že se jedná o dostupnou a jednoduchou látku, produkt reakce je ve vodě rozpustný. Samotná syntéza isothiokyanátového prekurzoru je velmi snadná a rychlá jednkroková reakce.

Ligand **L**₁ byl rozpuštěn v 0,1M HCl a následně byl roztok podvrstven tetrachlormethanem a byl přidán thiofosgen. Reakční směs byla míchána při vysokých otáčkách, aby došlo k neustálému promíchávání vodné a organické fáze. Látka s isothiokyanátovou skupinou (**12**) je nestabilní a proto musí být uchovávána v lednici.

Jako vedlejší produkt se vyskytoval spolu s žádanou látkou analog látky **12**, na němž thiofosgen můstkoval dva atomy dusíku makrocyklu [**MS** (+): 469,9 ([M+H]⁺, teor. 469,6), **MS** (-): 467,7 ([M-H]⁻, teor. 467,6)].

Isothiokyanátový kaplink probíhal prostým přidáním vodného roztoku methylaminu k látce **12**. Biokonjugace byla sledována pomocí MS. Ve spektru byly pozorovány dva intenzivní signály. Nejintenzivnější signál patřil očekávané látce **13** [**MS** (+): 457,9 ([M+H]⁺, teor. 457,6), **MS** (-): 455,7 ([M-H]⁻, teor. 455,6)]. Dále vznikla rovněž isothiokyanátová

skupina na doprovodné látce s thiomčovinným můstkem na dvou atomech dusíku makrocyklu [**MS** (+): 499,8 ($[M+H]^+$, teor. 499,6), **MS** (-): 497,6 ($[M-H]^-$, teor. 497,6)].

Z tohoto jednoduchého experimentu plyne, že je ligand **L**₁ vhodný pro isothiokyanátový kaplink s primárními aminy.

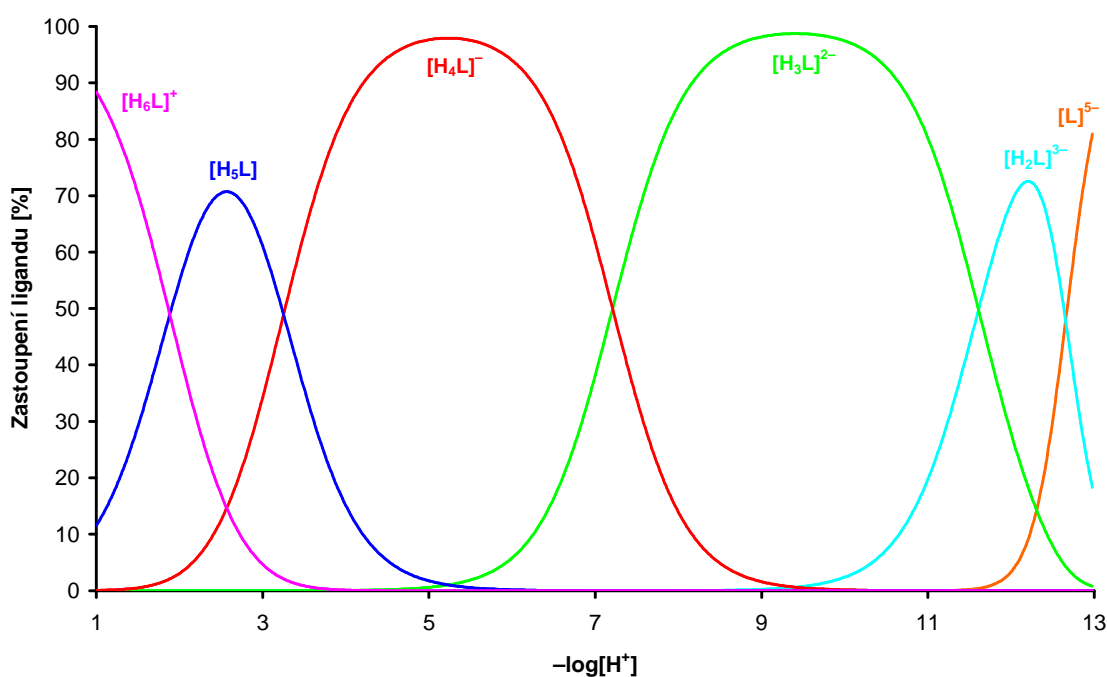
3.3 Potenciometrické titrace ligandu L_2

Hodnota $\log\beta_2$ (25,31) odpovídá simultánnímu přístupu dvou protonů (obou s formálním pK_a 12,66), a spolu s pK_a 11,61 odpovídá protonizaci dvou makrocyclických aminoskupin a první protonizaci bis(fosfonátu). Takovéto hodnoty jsou pro cyklamové deriváty i pro bis(fosfonáty) zcela běžné^[90]. K dalším protonizacím pak dochází s odpovídajícími konsektivními konstantami $\log K = pK_a$ 7,21 a 3,25, což jsou hodnoty typické pro druhou a třetí (de)protonizaci bis(fosfonátových) derivátů, a zjevně tedy dochází k další protonizaci pendantní skupiny. Poslední naměřená konstanta popisující protonizaci do šestého stupně (odpovídající pK_a 1,89) pak přísluší patrně další protonizaci makrocyclického skeletu, neboť pK_a jak fosfinátové skupiny, tak i bis(fosfonátové) skupiny v prvním disociačním stupni, bývají typicky o cca jednotku nižší, zatímco protonizace cyklamových derivátů do třetího stupně typicky nastává s $pK_a \sim 2$.^[81,91]

Distribuční diagram je uveden na **Obr.16**, hodnoty protonizačních konstant v **Tab.6**.

Konstanty stability ligandu L_2 a jeho komplexů s kovy jsou uvedeny v **Tab.7**. Srovnání konstant stability studovaného ligandu s příbuznými ligandy je uvedeno v **Tab.8**. Hodnoty konstant stability rostou v obvyklém pořadí odpovídajícím trendu v Irvingově-Williamsově řadě, tj. $Ca^{2+} < Mn^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+}$.

Obr.16: Distribuční diagram ligandu L_2 ($c_{lig} = c_M = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ KOH, 25°C)



Tab.6: Celkové protonizační konstanty ligandu L_2 ($I = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH, 25°C)

h	ligand L_2		cyklam ^[92]		te1P ^[91]		te2P ^[93]		teta ^[94]	
	$\log\beta_h$	pK_{Ah}	$\log\beta_h$	pK_{Ah}	$\log\beta_h$	pK_{Ah}	$\log\beta_h$	pK_{Ah}	$\log\beta_h$	pK_{Ah}
1	–	–	11,29	11,29	12,49	12,49	–	–	10,58	10,58
2	25,31(7)	2x12,66	21,48	10,19	24,25	11,76	26,41	26,41	20,75	10,17
3	36,92(7)	11,61	23,09	1,61	30,30	6,05	33,19	6,78	24,84	4,09
4	44,13(7)	7,21	26,00	1,91	32,72	2,42	38,55	5,36	28,19	3,35
5	47,38(7)	3,25	–	–	–	–	39,70	1,15	–	–
6	49,27(7)	1,89	–	–	34,88	2,16	–	–	–	–

Tab.7: Konstanty stability komplexů ligandu L_2 ($I = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH, 25°C)

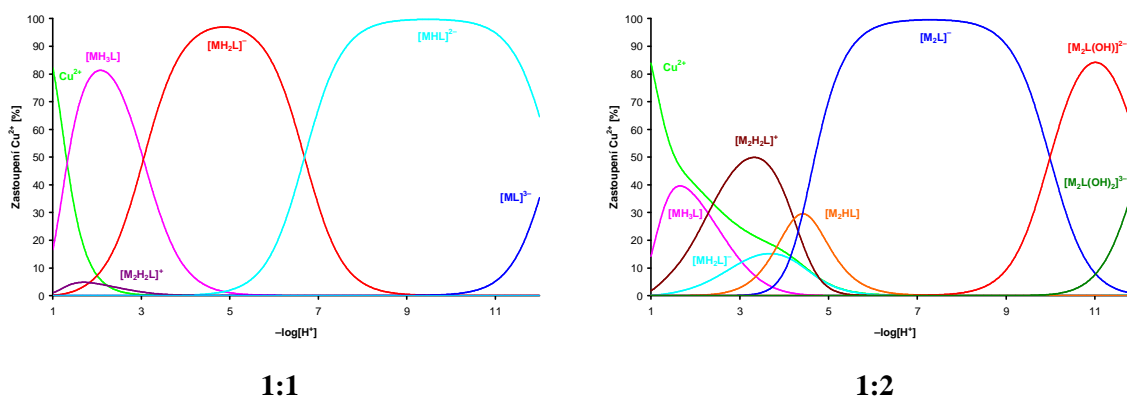
$\log\beta$	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Mn^{2+}	Ca^{2+}
MH_4L	–	–	46,46(6)	46,30(4)
MH_3L	48,11(3)	42,87(2)	41,91(5)	40,29(3)
MH_2L	45,06(3)	38,06(4)	–	30,46(4)
MHL	38,38(6)	30,69(4)	23,69(9)	18,45(4)
ML	26,11(6)	17,50(10)	12,18(7)	–
$\text{M}_2\text{H}_2\text{L}$	48,07(5)	–	–	–
M_2HL	43,85(8)	36,90(2)	29,67(7)	–
M_2L	39,44(5)	28,19(4)	20,16(8)	9,47(5)
$\text{M}_2\text{L(OH)}$	29,45(7)	18,27(3)	–	–
$\text{M}_2\text{L(OH)}_2$	17,41(7)	–	–	–

Tab.8: Srovnání konstant stability komplexů ligandu L_2 s příbuznými ligandy ($I = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH, 25°C)

Ion	ligand L_2	cyklam ^[95]	te1P ^[91]	te2P ^[81]	teta ^[95]
Cu^{2+}	26,11(6)	27,20	27,34	25,40	21,74
Zn^{2+}	17,50(10)	15,50	21,03	20,35	16,62
Mn^{2+}	12,18(7)	–	11,81	12,35	11,50
Ca^{2+}	–	–	3,07	5,26	8,42

Na Obr.17, 18, 19 a 20 jsou uvedeny distribuční diagramy systémů ligand L_2 – M^{2+} v poměrech 1:1 a 1:2.

Obr.17: Distribuční diagramy systémů ligand L_2 -Cu v poměrech 1:1 a 1:2 ($c_{\text{lig}} = 2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_M = 2$ a $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH, 25°C)

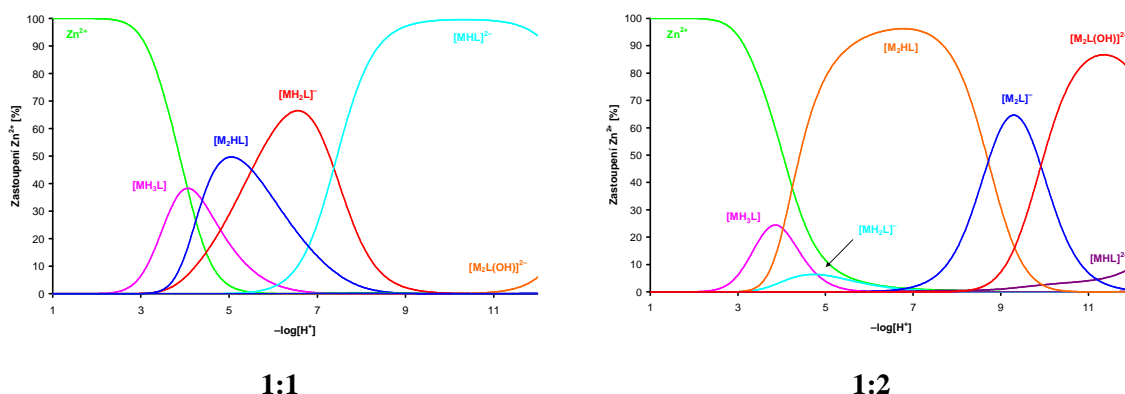


Prvním studovaným systémem byl komplex Cu-L_2 . Z distribučních diagramů je patrné, že se na začátku (pH 1) vyskytuje částice $[\text{MH}_3\text{L}]$ v přibližném zastoupení 15 % pro oba poměry ligand:kov. Její zastoupení narůstá s rostoucím pH a přibližně od pH ~2 její zastoupení klesá.

U poměru 1:1 narůstá prakticky od počátečního pH zastoupení částice $[\text{MH}_2\text{L}]^-$, která při pH 5 dosahuje zastoupení téměř 100 %. Od tohoto pH dochází k nárůstu částice $[\text{MHL}]^{2-}$, která dosahuje maximálního zastoupení v rozmezí pH 8–11. Od pH 10 můžeme pozorovat nárůst zastoupení částice $[\text{ML}]^{3-}$. V kyselé oblasti (pH 1–3) se s nepatrným zastoupením tvoří částice $[\text{M}_2\text{H}_2\text{L}]^+$.

U poměru 1:2 je zastoupení částice $[\text{M}_2\text{H}_2\text{L}]^+$ pochopitelně již mnohem výraznější než v poměru 1:1. Kolem pH ~3 dosahuje tato částice zastoupení 50 %. V menší míře vznikají částice $[\text{MH}_2\text{L}]$ a $[\text{M}_2\text{HL}]^+$. Od pH 4 dochází k nárůstu zastoupení částice $[\text{M}_2\text{L}]^-$, která kolem pH 7 dominuje a její zastoupení se blíží 100 %. Při vyšších hodnotách pH (bazická oblast) dochází k vzniku hydroxidokomplexů $[\text{M}_2\text{L}(\text{OH})]^{2-}$ a $[\text{M}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{3-}$.

Obr.18: Distribuční diagramy systémů ligand L_2 -Zn v poměrech 1:1 a 1:2 ($c_{\text{lig}} = 2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_M = 2$ a $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH, 25°C)

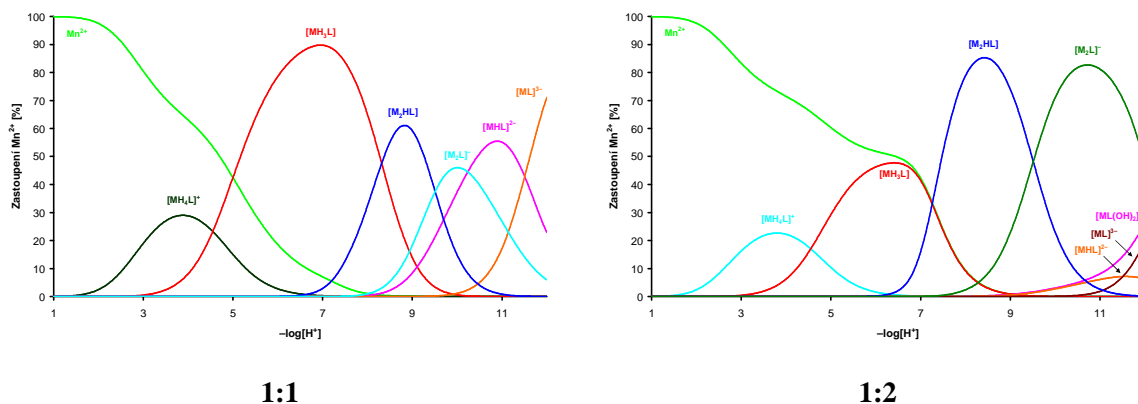


Dalším studovaným systémem byl komplex L_2 -Zn. U obou poměrů dochází kolem pH ~ 3 k nárůstu zastoupení částice $[MH_3L]$ s maximálním zastoupením 40 % (pro poměr 1:1).

Se zvyšujícím se pH se v systému (1:1) nachází také částice $[M_2HL]$ a $[MH_2L]^-$ s maximálním zastoupením až 70 %. Přibližně od pH 6 začíná narůstat zastoupení částice $[MHL]^{2-}$, která v bazické oblasti pH zcela dominuje a dosahuje 100% zastoupení. Nad pH 11 vzniká rovněž malé množství částice $[M_2L(OH)]^{2-}$.

U poměru 1:2 se částice $[MH_3L]$, $[MH_2L]^-$ a $[MHL]^{2-}$ vyskytují v nízkém procentuálním zastoupení. Od pH 4 vzniká majoritní částice $[M_2HL]$, která v neutrální oblasti pH dosahuje maximálního zastoupení. Dále vzniká částice $[M_2L]^-$ s maximálním zastoupením 65 % (pH cca 9,5). Od pH 9 narůstá zastoupení částice $[M_2L(OH)]^{2-}$, která při pH 11,5 dosahuje zastoupení kolem 85 %.

Obr.19: Distribuční diagramy systémů ligand L_2 -Mn v poměrech 1:1 a 1:2 ($c_{\text{lig}} = 2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_M = 2$ a $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH, 25°C)

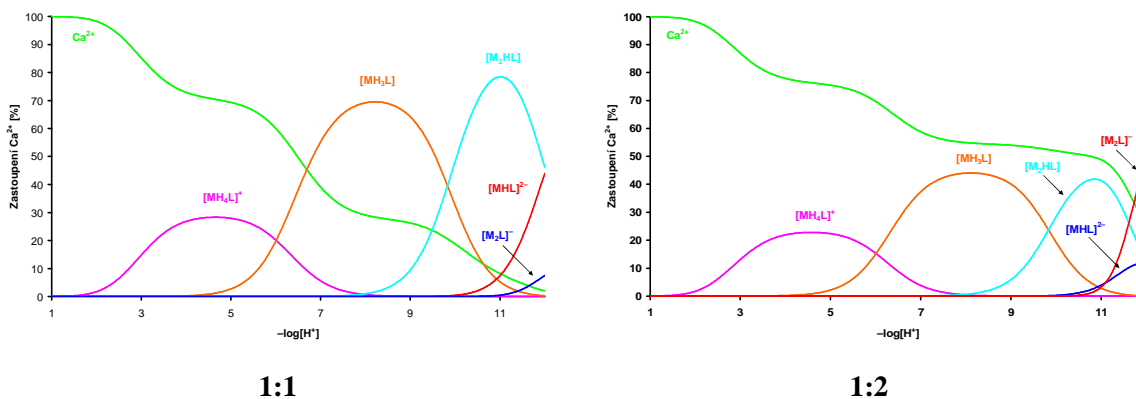


Třetím studovaným systémem byl komplex L_2 -Mn.

U poměru 1:1 dochází kolem pH 2 k nárůstu zastoupení částice $[MH_4L]^+$, která dosahuje pouze 30% zastoupení. Dále od pH 3 narůstá zastoupení částice $[MH_3L]$, která dosahuje svého maxima při pH 7 (90 %). Se zvyšujícím se pH vznikají v systému také částice $[M_2HL]$, $[M_2L]^-$, $[MHL]^{2-}$ se zastoupením v rozmezí od 50 do 60 %. Od pH 10 dochází k nárůstu zastoupení částice $[ML]^{3-}$.

U poměru 1:2 jsou naopak nejzastoupenějšími částicemi $[M_2HL]$ a $[M_2L]^-$ dosahující téměř 90% zastoupení. Částice $[MH_4L]^+$ a $[MH_3L]$ se dle očekávání vyskytují v systému v nižším zastoupení než v případě poměru 1:1. Od pH 10 dochází k nárůstu částic $[ML]^{3-}$, $[MHL]^{2-}$ a $[ML(OH)_2]^{5-}$.

Obr.20: Distribuční diagramy systémů ligand L_2 -Ca v poměrech 1:1 a 1:2 ($c_{\text{lig}} = 2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_M = 2$ a $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $I = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)



Posledním studovaným systémem byl komplex L_2 -Ca. V případě komplexu s vápníkem poměr ligand:kov nehraje tak významnou roli jako v předchozích případech. Oba distribuční diagramy prezentují stejné typy částic pouze s jinými poměry.

Srovnáním všech distribučních diagramů systémů ligand L_2 -M je patrný následující trend. V případě L_2 -Cu dochází ke vzniku komplexních částic již v oblasti kyselého pH, v případě L_2 -Zn pro změnu v neutrální oblasti. Oproti tomu v případech systémů L_2 -Mn a L_2 -Ca dochází k nejvýraznější komplexaci až od slabě bazické oblasti. Ze srovnání odpovídajících pK_a s hodnotami volného ligandu lze usoudit, že v protonizovaných komplexech o stechiometrii 2:1 a 1:1 jsou měďnatý a zinečnatý kation komplexovány do dutiny makrocyclu (čemuž odpovídá i intenzivní modrofialová barva měďnatého komplexu). Oproti tomu jsou protony v analogických částicích s manganatým a vápenatým iontem lokalizovány na aminoskupinách makrocyclu, tj. tyto ionty jsou koordinovány pouze prostřednictvím bis(fosfonátového) pendantu, a k jejich vstoupení do dutiny makrocyclu dochází až ve významně bazickém prostředí, pokud vůbec.

3.4 Formační a disociační kinetiky ligandu L₂

Zpracování dat a jejich fitování bylo provedeno pomocí programu Gnuplot^[82]. Závislost absorbance na čase pro formační kinetiky byla fitována dle rovnice (3):

$$A(t) = A_{\infty}(1 - e^{-k_{\text{obs}}t}). \quad (3)$$

Vypočtená konstanta pseudoprvního řádu k_{obs} byla vydělena analytickou koncentrací měďnatých iontů c_{Cu} ve vzorku, tím byla zjištěna rychlostní konstanta druhého řádu ${}^{\text{fCu}}k_2$ ($v = {}^{\text{fCu}}k_2 c_{\text{Cu}} c_{\text{L}}$). Získané ${}^{\text{fCu}}k_2$ pro různé hodnoty pH systému Cu–L₂ byly fitovány rovnicí (4), která zohledňuje reaktivitu jednotlivých protonizovaných forem ligandu přítomných v roztoku v rozsahu pH, ve kterém byla měřena kinetická data (viz též **Obr.16**). Data byla fitována s použitím vážícího schématu $1/y^2$. Rovnice (4) odpovídá mechanismu znázorněnému ve **Schématu 5**.

$${}^{\text{fCu}}k_2 = \frac{{}^{\text{fCu}}k_{\text{H}_3\text{L}} + {}^{\text{fCu}}k_{\text{H}_2\text{L}} \times K_4 \times [\text{H}^+] + {}^{\text{fCu}}k_{\text{HL}} \times K_4 \times K_5 \times [\text{H}^+]^2}{1 + K_4 \times [\text{H}^+] + K_4 \times K_5 \times [\text{H}^+]^2 + K_4 \times K_5 \times K_6 \times [\text{H}^+]^3}. \quad (4)$$

Konstanty K_4 , K_5 a K_6 jsou konsektivní protonizační konstanty, jejichž hodnota byla získána potenciometricky (viz **Tab.6**).

Závislost absorbance na čase pro disociační kinetiky byla fitována kinetikou pseudoprvního řádu podle následující rovnice (5):

$$A(t) = A_0 e^{-k_{\text{obs}}t} + A_{\infty}. \quad (5)$$

Závislost k_{obs} na koncentraci kyseliny byla fitována podle rovnice (6):

$${}^{\text{dCu}}k_{\text{obs}} = \frac{{}^{\text{dCu}}k + K_{\text{Cu}} \times [\text{H}^+]}{1 + K_{\text{Cu}} \times [\text{H}^+]}, \quad (6)$$

kde k_1 odpovídá rychlostní konstantě a K protonizační konstantě popisující rovnováhu, ve které vzniká částice podléhající kyselé katalyzované disociaci (viz **Schéma 6**).

Pro analýzu závislosti rychlostních konstanty k_1 na teplotě byla použita Arrheniova (7) a Eyringova rovnice (8):

$$k(T) = Q e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (7)$$

$$k(T) = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}, \quad (8)$$

kde R je univerzální plynová konstanta ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), Q je předexponenciální faktor v Arrheniově rovnici, k_B je Boltzmanova konstanta ($1,38\cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$) a h je Planckova konstanta ($6,63\cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$). Parametry ΔS^\ddagger a ΔH^\ddagger jsou aktivační entropie a aktivační entalpie.

Pro popis rovnovážné konstanty K s teplotou byla použita rovnice (9):

$$K(T) = e^{\frac{\Delta S^0}{R}} e^{-\frac{\Delta H^0}{RT}}, \quad (9)$$

kde parametry ΔS^0 a ΔH^0 jsou změna entropie a entalpie rovnovážné reakce.

Schéma 5: Mechanismus vzniku komplexu Cu–L₂

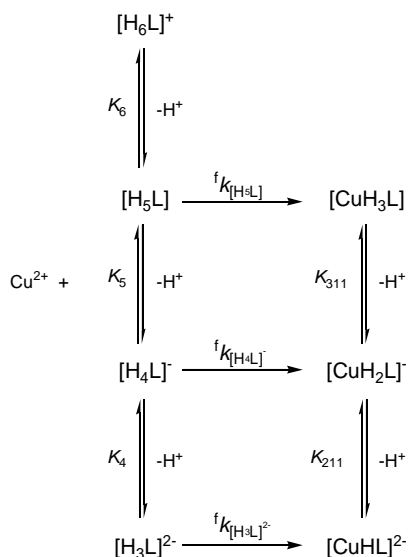
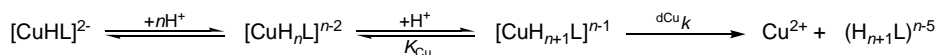


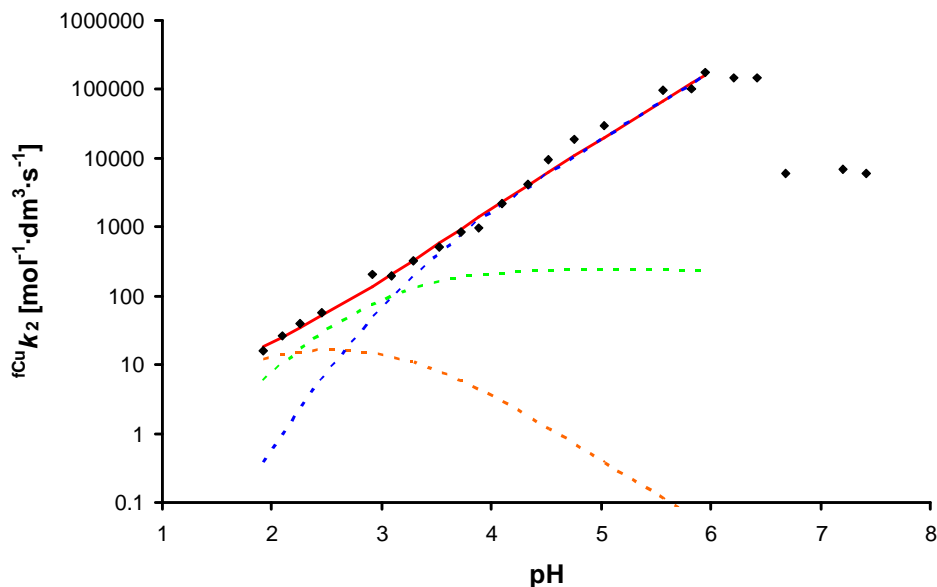
Schéma 6: Mechanismus disociace komplexu Cu–L₂



3.4.1 Formační kinetiky ligandu L₂

Získané ${}^{\text{fCu}}k_2$ pro různé hodnoty pH byly vyneseny do grafu na **Obr.21**. Data byla proložena rovnicí (4) odpovídající účasti tří různě protonizovaných forem ligandu na komplexační reakci podle mechanismu uvedenému ve **Schématu 5**. Hodnoty získaných rychlostních konstant studovaných ligandů a jejich analogů jsou uvedeny v **Tab.9**.

Obr. 21: Závislost $f_{\text{Cu}}k_2$ na pH (teplota $25,0\pm 0,1$ °C, iontová síla 0,1 M KCl). Čárkované linie uvádějí příspěvky reaktivity jednotlivých protonizovaných částic ligandu: H_3L^{2-} : modrá; H_4L^- : zelená; H_5L : oranžová; celkový fit je znázorněn plnou červenou čarou. Body odpovídající pH > 6 nebyly do fitování zahrnuty.



Tab.9: Rychlostní konstanty $f_{\text{Cu}}k_2$ [$\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{s}^{-1}$] studovaných systémů a analogů

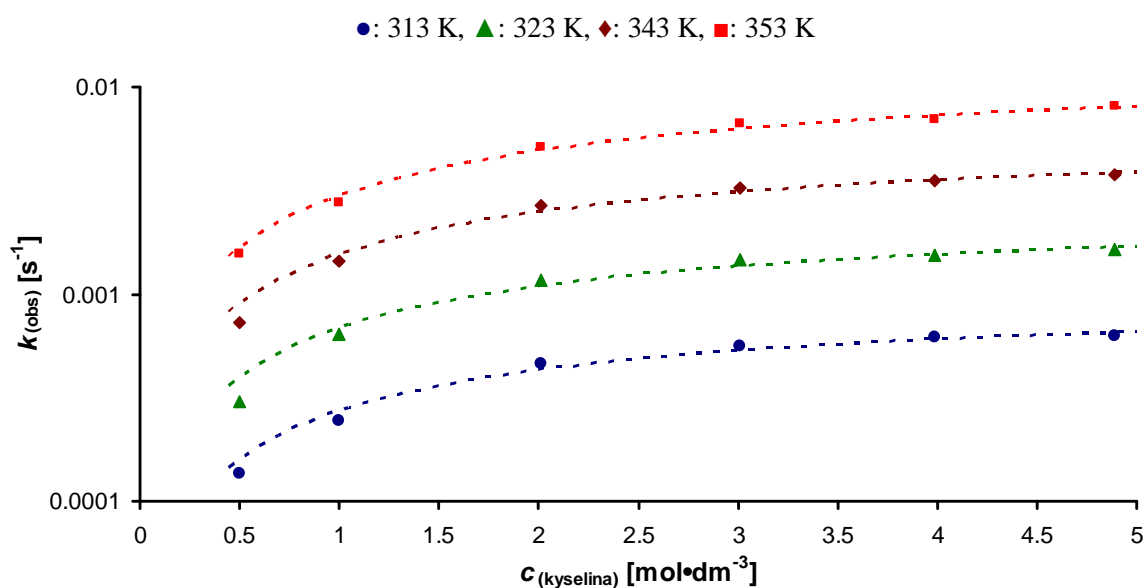
	$f_{\text{Cu}}k_{\text{H6L}}$	$f_{\text{Cu}}k_{\text{H5L}}$	$f_{\text{Cu}}k_{\text{H4L}}$	$f_{\text{Cu}}k_{\text{H3L}}$	$f_{\text{Cu}}k_{\text{H2L}}$	$f_{\text{Cu}}k_{\text{HL}}$
Cu-L₂	–	23(8)	$2,5(9)\cdot 10^2$	$3,1(3)\cdot 10^6$	–	–
Cu-cyklam^[96]	–	–	–	–	0,135	$1,05\cdot 10^6$
Cu-te2p^[81]	–	–	0,17	$1,38\cdot 10^3$	$1,97\cdot 10^5$	–
Cu-Me²te2p^[97]	–	–	0,04	$2,8\cdot 10^3$	$2,8\cdot 10^6$	–

Na **Obr.21** je uveden graf závislost $f_{\text{Cu}}k_2$ na pH. Modrá čára představuje příspěvek částice H_3L^{2-} , zelená čára odpovídá částici H_4L^- a oranžová zase příspěvku částice H_5L . Červená čára představuje souhrn příspěvků všech částic. Přibližně od pH ~6 dochází ke změně trendu křivky. V systému se zřejmě od tohoto pH vznikají hydroxidospécie, které tvoří polynukleární komplexy. Tyto komplexy obvykle zapříčiní zrychlení reakce, ale pokud mají polymerní charakter, může dojít ke zbrždění reakce z důvodu velké kompaktnosti částic. Byla pozorována velmi vysoká hodnota rychlostní konstanty $f_{\text{Cu}}k_2$ částice H_3L^{2-} (srovnatelná s konstantou vypočtenou pro analogické částice s dvěma protonizovanými aminoskupinami makrocyclu u příbuzných derivátů). Do matematického modelu byl pokusně zahrnut rovněž vliv částice H_2L . Její příspěvek ovšem prakticky nemění výsledek fitování – částice H_2L do mechanismu ve studované oblasti pH zřetelně nepřispívá.

3.4.2 Disociační kinetiky ligandu L₂

Získané hodnoty rychlostních konstant k_{obs} byly vyneseny v závislosti na koncentraci kyseliny chloristé pro jednotlivé teploty. Tyto body byly proloženy fitováním dle rovnice (6) a graf závislosti systému Cu–L₂ je uveden na **Obr.22**. V **Tab.10** jsou uvedeny konstanty k_{obs} a poločasy disociace studovaných komplexů. Porovnání s analogy studovaných komplexů je uvedeno v **Tab.11**.

Obr.22: Závislost k_{obs} na koncentraci kyseliny chloristé při různých teplotách;



Tab.10: Poločas disociace komplexu Cu–L₂

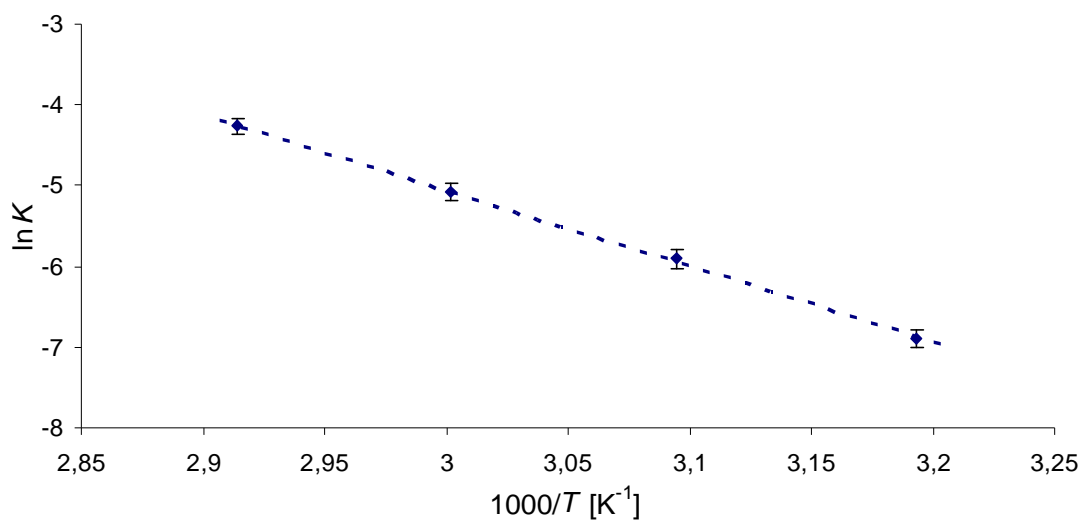
$c(\text{HClO}_4)$ [mol·dm ⁻³]	313 K		323 K		333 K		343 K	
	k_{obs} [s ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]	k_{obs} [s ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]	k_{obs} [s ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]	k_{obs} [s ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]
4,89	$6,24 \cdot 10^{-4}$	18,5	$1,63 \cdot 10^{-3}$	7,1	$3,74 \cdot 10^{-3}$	3,1	$8,04 \cdot 10^{-3}$	1,4
3,99	$6,16 \cdot 10^{-4}$	18,7	$1,55 \cdot 10^{-3}$	7,5	$3,56 \cdot 10^{-3}$	3,2	$6,97 \cdot 10^{-3}$	1,7
3,01	$5,63 \cdot 10^{-4}$	20,5	$1,46 \cdot 10^{-3}$	7,9	$3,27 \cdot 10^{-3}$	3,5	$6,65 \cdot 10^{-3}$	1,7
2,01	$4,62 \cdot 10^{-4}$	25,0	$1,17 \cdot 10^{-3}$	9,9	$2,66 \cdot 10^{-3}$	4,3	$5,14 \cdot 10^{-3}$	2,2
1	$2,46 \cdot 10^{-4}$	47,0	$6,40 \cdot 10^{-4}$	18,0	$7,33 \cdot 10^{-4}$	15,7	$1,57 \cdot 10^{-4}$	7,4
0,5	$1,36 \cdot 10^{-4}$	85,2	$3,05 \cdot 10^{-4}$	37,9	$6,40 \cdot 10^{-4}$	18,0	$6,40 \cdot 10^{-4}$	18,0

Tab.11: Poločas disociace komplexu Cu-L₂ a modelových makrocyklů

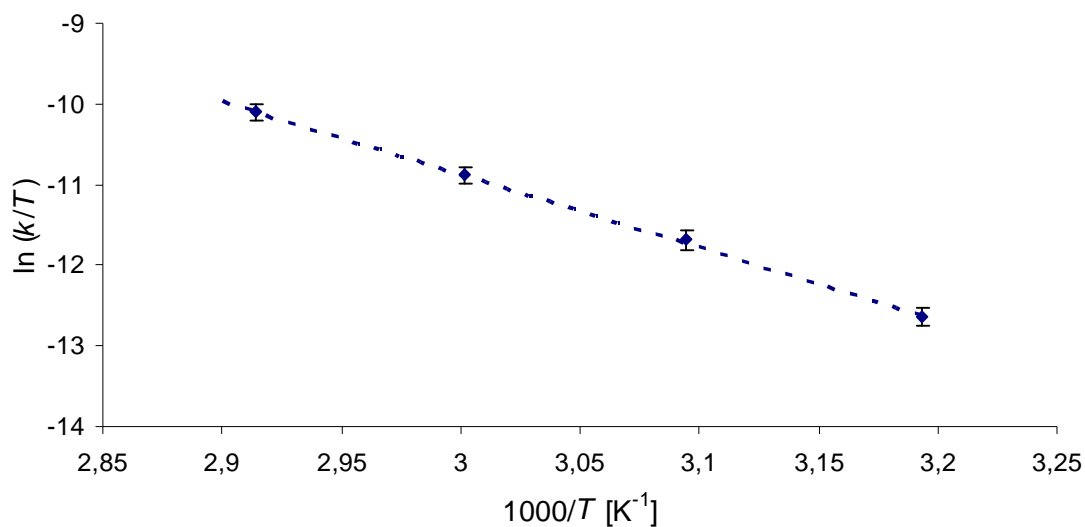
	<i>T</i> [°C]	<i>I</i> [M]	<i>c</i> (H ⁺) [M]	<i>k</i> _{obs} [s ⁻¹]	<i>t</i> _{1/2}
Cu-L ₂	40	5 ClO ₄ ⁻	1	2,46·10 ⁻⁴	47,0 min
Cu-L ₂	25 [#]	5 ClO ₄ ⁻	1	7,09·10 ⁻⁵	2,7 hod
Cu-cyklam ^[96]	25	5 ClO ₄ ⁻	1	5,52·10 ⁻⁴	20,9 min
Cu-cyklen ^[98]	25	5 ClO ₄ ⁻	1	2,54·10 ⁻⁴	45,5 min
Cu-teta ^[99]	25	5 Cl ⁻	5	2,01·10 ⁻⁶	4 dny
Cu-te2p ^[81]	25	5 ClO ₄ ⁻	1	6,08·10 ⁻⁴	19 ± 3 min

extrapolováno z dat zjištěných při vyšších teplotách

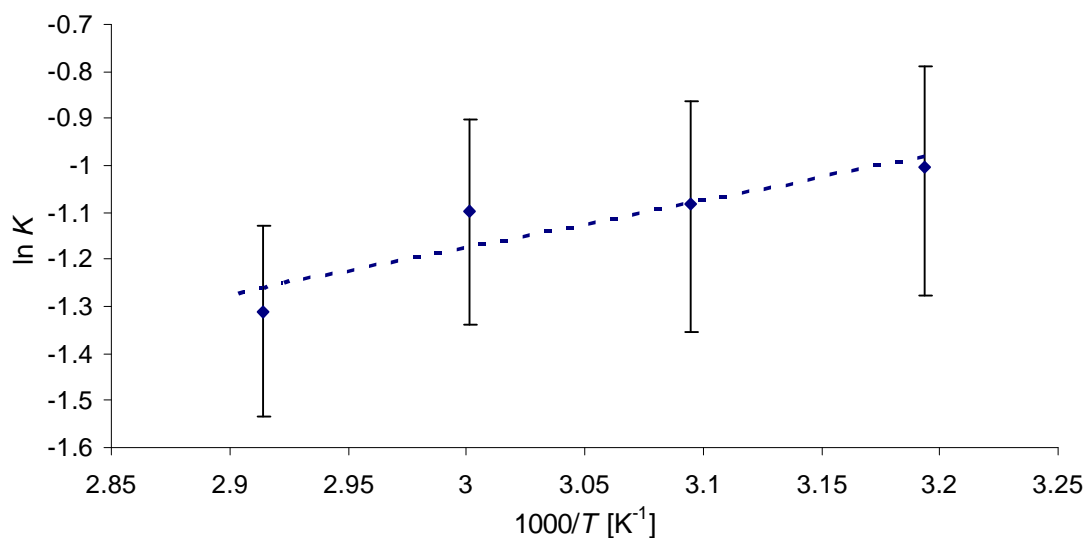
Hodnoty rychlostních konstant *k*₁ a rovnovážné konstanty *K* jsou vyneseny v grafech na **Obr.23**, **Obr.24** a **Obr.25** v linearizovaných formách rovnic (7), (8) a (9) proti reciproké hodnotě *T*.

Obr.23: Teplotní závislost rychlostní konstanty *k*₁ linearizované dle Arrheniovy rovnice

Obr.24: Teplotní závislost rychlostní konstanty k_1 linearizované dle Eyringovy rovnice



Obr.25: Linearizovaná teplotní závislost rovnovážné konstanty



Výsledné hodnoty disociačních kinetických parametrů jsou uvedeny v **Tab.12**. Vypočtené aktivační parametry a jejich směrodatné odchylky jsou uvedeny v **Tab.13** a parametry fitu K na teplotě jsou uvedeny v **Tab.14**.

Tab.12: Vypočtené hodnoty disociačních kinetických parametrů pro Cu–L₂

T [K]	k_1 [$s^{-1} \cdot dm^3 \cdot mol^{-1}$] $\cdot 10^3$	K
313	1,02	0,37
323	2,71	0,34
333	6,24	0,33
343	14,09	0,27

Tab.13: Aktivační parametry rychlostních konstant k_1 pro komplex Cu–L₂ a jeho analogy

	E_A [kJ·mol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹]	ΔH^\ddagger [kJ·mol ⁻¹]
Cu–L ₂	78	-62	75
Cu– ^{Me} 2te2p ^[97]	60	-95	57
Cu–te2p ^[81]	72	-71	70

Tab.14: Změny entropie a entalpie stanovené z protonizační konstanty K pro komplex Cu–L₂ a jeho analogy

	ΔS^0 [J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹]	ΔH^0 [kJ·mol ⁻¹]
Cu–L ₂	-34,6	-8,3
Cu– ^{Me} 2te2p ^[97]	-30	-17
Cu–te2p ^[81]	-22,7	-8,3

Kysele katalyzovanou dekomplexací („*acid-assisted decomplexation*“) byly stanoveny poločasy disociace Cu–L₂. Mechanismus dekomplexace Cu–L₂ je podobný již publikovaným analogickým komplexům (**Schéma 6**), což potvrzují i hodnoty aktivačních parametrů rychlostní konstanty (entalpie a entropie), které jsou velmi podobné jako parametry publikované pro komplexy příbuzných ligandů.

3.5 Radiokomplexace ligandu L₂ s ⁶¹Cu

Koncentrace nečistot v cyklotronové mědi je uvedena v **Tab.15**. Vzorek byl analyzován pomocí AAS až 3 dny po přípravě. Jeho chemické složení nebylo tedy v době průběhu radiochemických experimentů známé. Vysoký obsah niklu může být snadno vysvětlen nedostatečnou separací radiomědi od niklu, který sloužil jako terč pro její přípravu. Relativně velký obsah mědi, zinku a železa je však velmi závažný. Ačkoliv měď vzniká při jaderné reakci, a v rámci jejího rozpadu může vznikat i zinek, chemické obsahy těchto kovů jsou zcela nereálné. Tato skutečnost by odpovídala konverzi cca každého pětitisícího jádra mateřského niklu (hmotnost terče byla 42 mg a celková hmotnost mědi v připraveném roztoku by podle analýzy odpovídala 5,8 μg). Navíc by v takovém případě byla i aktivita připraveného

vzorku nezřízeně vysoká. Dalším možným zdrojem těchto kovů v roztoku radiomědi by mohla být kontaminace „studenou“ mědí z použitých přístrojů a materiálů, což se však také jeví jako nepravděpodobné. Navíc by takto vysoká koncentrace mědi v NCA roztoku (která shodou okolností odpovídá zhruba množství, které bylo přidáváno jako nosič) způsobila, že v případě komplexace vzorku s nosičem by byla celková koncentrace mědi dvojnásobná. Což by ve skutečnosti znamenalo, že ve studovaném plánovaném poměru 1:1 by bylo přítomno dvakrát více mědi než ligandu a tudíž by polovina mědi měla zůstat nezakomplexovaná. K tomu však nedošlo, komplexace byla téměř úplná (viz níže). Proto byla pravděpodobně elementární analýza chybná. Pro účely vyhodnocení nosičového experimentu byla jako koncentrace mědi brána koncentrace nosiče. Výsledky měření radiokomplexace ligandu L_2 spolu s ^{61}Cu jsou uvedeny v **Tab.16** pro nosičový experiment a v **Tab.17** pro experiment bez přidaného nosiče. V tabulkách je použité množství mědi pro jednotlivé experimenty bráno vždy jako 100 %. Tato hodnota je rozdělena mezi ^{61}Cu v komplexu s L_2 či ^{61}Cu mimo komplex. Příklad záznamu aktivity na TLC destičce je uveden na **Obr.26**. Skvrny na startu destičky patří komplexu ligandu L_2 s radiomědí, zbylé dvě migrující zase mědi s přidaným nosičem. Zobrazení konkrétního bodu ^{61}Cu v komplexu ligandu L_2 a mimo něj je uvedeno na **Obr.27**.

Tab.15: Stanovení příměsí cyklotronové mědi

Stanovovaný prvek	Množství [mg/L]
nikl	$53,70 \pm 15 \%$
měď	$5,77 \pm 12 \%$
železo	$4,21 \pm 17 \%$
zinek	$7,50 \pm 13 \%$

Vlastní experiment byl zahájen v čase, kdy se $A(\text{Cu}^{61})$ v 1 mL 0,05M HCl rovnala přibližně 190 MBq. Z ní byla spočtena hmotnost radiomědi, $m_{\text{Cu-61}} = k \cdot M \cdot A \cdot \tau_{1/2} = 3,3 \cdot 10^{-10}$ g. Pokud by platila koncentrace stanovená pomocí AAS (**Tab.15**) je patrné, že množství radiomědi lze zcela zanedbat vůči hmotnosti „studené“ mědi přítomné v roztoku. Ze znalosti hmotnosti radiomědi byla dále vypočtena maximální teoretická měrná aktivita $A_{m(t)}$, která činila $5,8 \cdot 10^{17}$ Bq/g. Reálná měrná aktivita mědi $A_{m(r)}$ po zahrnutí neradioaktivní mědi přítomné ve vzorku (**Tab.15**) by činila $A_{m(r)} = 3,3 \cdot 10^{13}$ Bq/g. Rozdíl hmotností by byl přibližně 4 řády. I když lze množství mědi stanovené pomocí AAS patrně úspěšně zpochybnit, nebyl pravděpodobně tento preparát beznosičový v pravém slova smyslu, vhodnější by bylo označení NCA (bez přidaného nosiče).

Tab.16: Procentuální zastoupení $^{61}\text{Cu-L}_2$ a ^{61}Cu pro nosičový experiment

poměr $^{61}\text{Cu:L}_2$	pH	^{61}Cu v komplexu s L_2 [%]	volná ^{61}Cu [%]
1:100	4,0	100	0
1:100	5,5	100	0
1:100	7,4	96,9	3,1
1:10	7,4	96,4	3,6
1:1	7,4	94,6	5,4

Tab.17: Procentuální zastoupení $^{61}\text{Cu-L}_2$ a ^{61}Cu pro beznosičový experiment

poměr $^{61}\text{Cu:L}_2$	pH	^{61}Cu v komplexu s L_2 [%]	volná ^{61}Cu [%]
1:1000	7,4	15,2	84,8
1:100	7,4	1,7	98,3
1:10	7,4	1,5	98,5

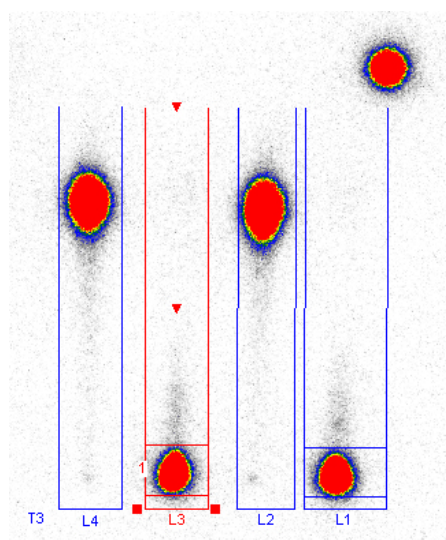
Z uvedených dat v **Tab.16** je patrné, že vliv pH na komplexaci mědi s ligandem L_2 je marginální. Paradoxně byla úplnější komplexace pozorována při nižších hodnotách pH (4 a 5,5). Nicméně ve všech studovaných případech se komplexace za daných podmínek blíží 100 %. Je zjevné, že vliv poměru Cu:L_2 není příliš výrazný, neboť srovnatelné úrovně komplexace bylo dosaženo i při 100x nižším nadbytku ligandu. Zvolená mobilní fáze je vhodná pro tento druh experimentu, rozdíl R_f je dostatečný. Netypicky však zakomplexovaná měď zůstává na startu (vliv sorpce bis(fosfonátové) skupiny na silikagel) a nezakomplexovaná radioměď putuje s R_f cca 0,7 ve formě octanu.

V experimentu bez přidaného nosiče (**Tab.17**) je interpretace výsledků velmi obtížná, neboť trvají pochybnosti o skutečné koncentraci mědi. Převážná většina radiomědi zůstala ve volném stavu a nezakomplexovala se do ligandu. To může mít dvojí vysvětlení. Jedna z variant poukazuje na to, že byla koncentrace „studené“ mědi vysoká, a proto byla celková koncentrace mědi mnohem vyšší než koncentrace ligandu. Proto nemohlo dojít k její úplné komplexaci. Za předpokladu, že by koncentrace zjištěná z AAS byla správná, převyšovala by koncentraci ligandu dokonce i v experimentu s plánovaným poměrem Cu:L_2 spočítaným na „čistou“ radioměď 1:1000 zhruba o řád. Tomu by odpovídal strop komplexace 10–20%, což bylo sice pozorováno, ale tato varianta se jeví jako méně pravděpodobná. Druhou možností je výrazné zpomalení komplexační reakce v důsledku několikařádkového snížení koncentrace mědi a ligandu. Tato varianta se jeví jako pravděpodobnější, neboť toto vysvětlení není v rozporu s nosičovým experimentem. Rovněž pH o hodnotě 7,4 pro experiment bez přidaného nosiče zřejmě nebylo příliš vhodné (nejvyšší rychlosti komplexace bylo

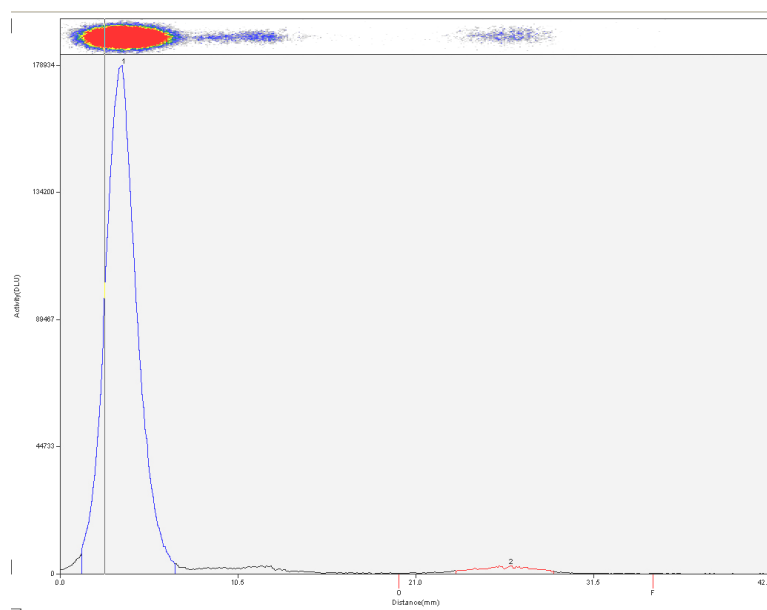
v kinetických měřeních dosaženo při pH 6, viz výše). Možným problémem mohl být i vliv nečistot na průběh komplexace. Při použitím pH již dochází ke komplexaci jak zinku, tak i niklu. Zinku bylo ve vzorku dle AAS srovnatelné množství jako mědi (7,5 μg). Nikl byl ve vzorku obsažen v mnohem větším množství než měď. Nikelnaté ionty však většinou reagují s makrocyclickými ligandy velmi pomalu. Nastavení podmínek experimentu pro radiokomplexaci bylo určeno pro větší množství ligandů, které byly stanovovány spolu s diskutovaným ligandem L_2 . Proto je toto stanovení bráno především jako orientační experiment pro zjištění vhodných podmínek, které se uplatní při dalším experimentu s ^{64}Cu .

Jak již bylo zmíněno, množství niklu ve vzorku bylo poměrně vysoké. Sice pravděpodobně nebyl z hlediska selektivity komplexace problémem, přesto by bylo patrně vhodnější při separaci niklu od mědi ionexovou chromatografií zvolit jiný typ eluce než skok 8M HCl – H₂O. S nalezením optimálního gradientu by bylo možné efektivněji separovat nikl od mědi.

Obr.26: Příklad záznamu aktivity na TLC
(poměr $^{64}\text{Cu}:L_2$ 1:100, pH = 4)

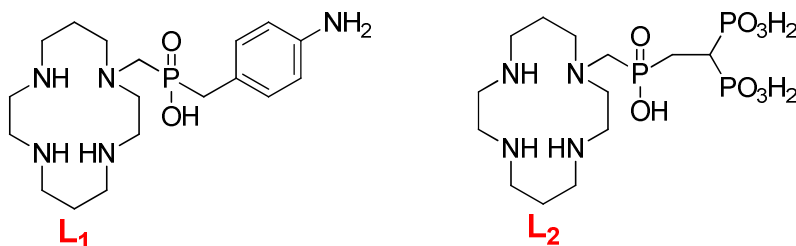


Obr.27: Příklad zobrazení množství aktivity ^{61}Cu v komplexu ligandu L_2 a mimo něj (poměr $^{61}\text{Cu}:\text{L}_2$ 1:100, pH = 7,4)



4. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byl připraven nový bifunkční ligand (**L₂**) s jedním koordinujícím se bis(fosfonátovým) pendantním ramenem a byl optimalizován postup přípravy ligandu **L₁** s jedním aminobenzylfosfinátovým pendantním ramenem. Oba bifunkční ligandy jsou odvozeny od cyklamového skeletu, který vykazuje selektivitu k dvojmocným kationtům mědi.



Dále byly studovány termodynamické vlastnosti pomocí potenciometrických titrací, kinetické a koordinační vlastnosti pomocí formačních a disociačních kinetik a radiokomplexace. Z naměřených protonizačních konstant a konstant stabilit bylo potvrzeno, že je ligand **L₂** vhodným kandidátem pro selektivní komplexaci dvojmocné mědi. Tento ligand tvoří stabilní komplexy s Cu²⁺ ($\log b_{ML} = 26,11$). Konstanty stability $\log b_{ML}$ pro Zn²⁺ Mn²⁺ a Ca²⁺ komplexy byly stanoveny na hodnotu 17,50 pro Zn²⁺, 12,18 pro Mn²⁺ a <5 pro Ca²⁺. Formační kinetiky byly měřeny v rozmezí pH 1,92–5,95. Data pro ligand **L₂** byla fitována pomocí modelu zahrnujícího reakci tří různě protonizovaných forem ligandu. Pomocí tzv. kysele asistované dekomplexace byly stanoveny poločasy disociace komplexu Cu–**L₂**. Dále byly stanoveny aktivační parametry rychlostních konstant. Připravený ligand vykazuje vhodné vlastnosti pro možné použití v radiomedicíně, především velmi rychlou komplexaci, kinetickou stabilitu a vysokou selektivitu pro dvojmocné kationty mědi.

Pro ligand **L₁** byla studována biokonjugace s primárním aminem a bylo zjištěno, že je tento ligand vhodný pro isothiokyanátový kaplink s primárními aminy.

Vlastnosti obou studovaných ligandů poukazují na značný potenciál jejich využití v nukleární medicíně.

Do budoucna jsou plánovány další experimenty především z hlediska biodistribuce *in vivo*.

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie (<i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>)
AcOH	kyselina octová
ATP	adenosintrifosfát
NBB	4-nitrobenzylbromid
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamid
BTS	bis(thiosemikarbazony)
BTSP	bis(trimethylsilyloxy)fosfin
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DCU	<i>N,N'</i> -dicyklohexylmočovina
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTMP	kyselina ethylendiamintetramethylenfosfonová
EOB	v okamžiku vypnutí svazku (<i>End of Beam</i>)
ETFA	ethyl ester kyseliny trifluoroctové
EtOAc	ethyl acetát
EtOH	ethanol
EC	elektronový záchyt (<i>Electron Capture</i>)
GF-AAS	atomová absorpční spektrometrie s grafitovou píčkou (<i>Graphite Furnace-Atomic Absorption Spectroscopy</i>)
HMDS	hexamethyldisilazan
<i>J</i>	interakční konstanta [Hz]
IPAV	<i>i</i> -propanol/konc. aq. amoniak/voda
IPOV	<i>i</i> -propanol/kyselina octová/voda
keV	kiloelektronvolt ($1 \text{ eV} = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$)
KOH	hydroxid draselný
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)ethansulfonová kyselina
MS-ESI	hmotnostní spektrometrie-ionizace elektrosprejem (<i>Mass Spectrometry-ElectroSpray Ionization</i>)
NBPIN	4-nitrobenzylfosfinová kyselina
NB ₂ PIN	bis(4-nitrobenzyl)fosfinová kyselina
NBPINOEt	benzyl ester 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny
NBPINOEt	ethyl ester 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny
NBPON	4-nitrobenzylfosfonová kyselina
NCA	bez přidaného nosiče (<i>No-Carrier Added</i>)
NMR	nukleární magnetická rezonance (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PEG	polyethylenglykol
PET	pozitronová emisní tomografie (<i>Positron Emission Tomography</i>)
<i>R_f</i>	retenční faktor

RTG	rentgen
RVO	rotační vakuová odparka
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie (<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>)
$\tau_{1/2}$	poločas rozpadu
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol (2-methylpropan-2-ol)
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
δ	chemický posun

6. PODĚKOVÁNÍ

Na závěr mi zbyla milá povinnost poděkovat všem, kteří se hrdinně podíleli na vzniku této práce.

Největší dík připisuji svému školiteli doc. RNDr. Janu Kotkovi, Ph.D. Velice mu děkuji za jeho nekonečnou trpělivost, ochotu a především za veškerý drahocenný čas, který mi věnoval. Nesmírně si jej vážím za jeho přátelský a pozitivní přístup. Naučil mě mnohému, a to nejen z oblasti chemie (například maorskému hromadnému bojovému tanci Haka, či jak zákeřně dokáže kousat kabel od rychlovarné konvice).

Srdečně děkuji oponentovi RNDr. Jánů Kozempelovi, Ph.D, za ochotu mou práci oponovat.

Všem dále jmenovaným děkuji za měření NMR a MS spekter. Jsou to: RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D, Mgr. Tomáš David, Mgr. Jiří Bárta, Mgr. Miroslav Pniok, Mgr. Tereza Krchová, Bc. Jan Blahut a Bc. Ondřej Zemek.

Můj dík patří také Ing. Kamilu Langovi, CSc. z Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži za umožnění měření na přístroji Stopped-Flow, Ivaně Strašlipkové z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze za stanovení elementární analýzy, dále kolegyni Mgr. Monice Paúrové za úvod do kinetických měření a RNDr. Vojtěchovi Kubíčkov, Ph.D z PřF UK v Praze za zasvěcení do potenciometrických titrací. Rovněž děkuji Mgr. Janu Rálišovi, Ph.D z ÚJF AV ČR v Řeži za přípravu radiomědi a RNDr. Janu Kučkovi, Ph.D, Mgr. Martinu Hrubému, Ph.D a Mgr. Miroslavu Vetríkovi z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze za realizaci radiokomplexace.

Svým rodičům a bratrovi děkuji za všestrannou, nejen finanční, podporu a pomoc s vlastní korekturou práce.

Děkuji všem kolegům z „velké a malé laborky“ za příjemné pracovní prostředí, společnost při pracovních víkendech a milé zpestření v podobě šachových turnajů a kulinářských chvil na balkoně.

Vřelý dík patří také všem, kteří se mnou statečně sdíleli krásné i strastiplné období studia. Děkuji své babičce, tetě, rodině Koťátkové, Mgr. Bohdaně Špachmanové a také prof. Ing. Janu Johnovi, CSc., z FJFI ČVUT v Praze za velkou podporu a motivaci. V neposlední řadě rovněž srdečně děkuji doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., z PřF UK v Praze, který bude navždy mým hrdinou.

S pokorou a hlubokou úctou bych tuto práci ráda věnovala in memoriam doc. RNDr. Ladislavu Lešetickému, CSc. (7.8.1942 – 14.11.2011), výjimečnému člověku, jehož láska k vědě a zapálení pro výzkum mě vždy ohromovaly. S hřejivým pocitem vzpomínám na jeho upřímný zájem o mou maličkost.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] W. Loveland, D. J. Morrissey, G. T. Seaborg, *Modern Nuclear Chemistry*, Wiley-Interscience, New Jersey, **2006**
- [2] P. Komárek, *Praktické lékárenství*, **2006**, 5, 231
- [3] M. Mysliveček, V. Hušák, P. Koranda, *Nukleární medicína I.*, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc, **1995**
- [4] K. Kupka, J. Kubinyi, M. Šámal a kol., *Nukleární medicína*, nakladatelství P3K, Příbram, **2007**
- [5] A. Elgazzar, *The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, **2006**
- [6] A. M. Peters, *Nuclear Medicine in Radiological Diagnosis*, Martin Dunitz, London, **2003**, 681
- [7] V. Ullmann, *AstroNuklFyzika - Jaderná a radiační fyzika, nukleární medicína*, [online], [cit. 2012-07-02], <http://astronuklfyzika.cz>
- [8] H. Elser, *Leitfaden Nuklearmedizin*, Steinkopff, Darmstadt, **1999**
- [9] D. Weishaupt, V. D. Köchli, B. Marinček, *How does MRI work?*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2003**
- [10] R. B. Buxton, *Introduction to functional Magnetic Resonance Imaging*, Cambridge University Press, Cambridge, **2002**
- [11] A. E. Merbach, É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Chicester, **2001**
- [12] M. T. Vlaardingerbroek, J. A. den Boer, *Magnetic Resonance Imaging. Theory and Practise*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **1996**
- [13] *National Cancer Institute*, [online], [cit. 2012-07-02], <http://www.cancer.gov/>
- [14] *Present and Future Therapeutic Radionuclides*, *Scientific Electronic Library*, [online], [cit. 2012-07-02], <http://www.scielo.br>
- [15] S. M. Qaim, *Radiochim. Acta*, **2001**, 89, 297
- [16] *Česká společnost nukleární medicíny*, [online], [cit. 2012-07-03], www.csnm.cz
- [17] *European Association of Nuclear Medicine*, [online], [cit. 2012-07-03], www.eanm.org
- [18] U. Y. Ryo, C. Bekerman, S. M. Pinsky, *Atlas of Nuclear Medicine Artifacts and Variants*, Year Book Medical Publishers, Chicago, **1985**

- [19] C. J. Anderson, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2219
- [20] *Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně*, [online], [cit. 2012-07-04], <http://www.cls.cz>
- [21] *Ústav jaderného výzkumu Řež*, [online], [cit. 2010-07-04], www.nri.cz
- [22] M. Lázníček, P. Komárek, *Základy Radiofarmacie*, nakladatelství Univerzity Karlovy, Praha, **1998**
- [23] P. F. Sharp, H. G. Gemmell, A. D. Murray, *Practical Nuclear Medicine*, Springer-Verlag, London, **2005**
- [24] A. Perkins, M. Frier, *Nuclear Medicine in Pharmaceutical Research*, Taylor and Francis Ltd., London, **1999**
- [25] J. Květina, E. Havránek, L. Kronrád, J. Kubíček, M. Lázníček, P. Schiller, *Radiofarmaka*, Avicenum, zdravotnické nakladatelství, Praha, **1987**
- [26] W. Krause (Editor), *Contrast Agents III: From Diagnostics to Therapeutics (Top. Curr. Chem., 252)*, Springer, Netherland **2005**
- [27] a) J. Pacák, J. Točík, M. Černý, *Chem. Commun.*, **1969**, 2, 77; b) J. Pacák, J. Podešva, J. Točík, M. Černý, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1972**, 37, 2589
- [28] J. Pacák, M. Černý, *Chem. Listy*, **2002**, 707, 704
- [29] G. Agricola, *Dvanáct knih o hornictví a hutnictví*, Prometheus, Praha, **1933**
- [30] J. Rejzek, *Český etymologický slovník*, LEDA, **2001**
- [31] H. Remy, *Anorganická chemie I a II*, SNTL, Praha **1971**
- [32] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie prvků*, Informatorium, Praha **1993**
- [33] Kolektiv autorů, *Rudné a uranové hornictví České republiky*, Anagram, Ostrava, **2003**
- [34] J. Hrabák, *Hornictví a hutnictví v království Českém*, F. Řivnáč, Praha, **1902**
- [35] a) R. G. Skirrow, G. J. Davidson, *Economic Geology*, **2007**, 102, 1373; b) G. J. Davidson, H. Paterson, S. Meffre, R. F. Berry, *Economic Geology*, **2007**, 102, 1471
- [36] C. Chambers, A. K. Holliday, *Modern Inorganic Chemistry*, Butterworths, UK, **1975**
- [37] J. Klikorka, B. Hájek, J. Votinský, *Obecná a anorganická chemie*, SNTL, Praha, **1989**
- [38] R. Brauns, *Říše nerostná obrazem i slovem*, J. R. Vilímek, Praha, **1904**
- [39] N. Turova, *Inorganic Chemistry in Tables*, Springer-Verlag, Berlin, **2011**
- [40] V. Majer a kol. *Základy jaderné chemie*, SNTL, Praha, **1981**
- [41] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Curr. Pharm. Des.*, **2007**, 13, 3

- [42] H. Cai, Z. Li, Ch. W. Huang, R. Park, A. H. Shahinian, P. S. Conti, *Nucl. Med. Biol.*, **2009**, *37*, 57
- [43] G. Audi, O. Bersillon, J. Blachot, A. H. Wapstra, *Nucl. Phys. A.*, **2003**, *A 729*, 3
- [44] P. J. Blower, J. S. Lewis, J. Zweit, *Nucl. Med. Biol.*, **1996**, *23*, 957
- [45] S. C. Makkonen, Pro Gradu Dissertation, *⁶⁴Cu production, ligands and biomedical applications*, University of Helsinki, **2006**
- [46] J. Kozempel, Dizertační práce, *Příprava ⁶⁴Cu a jejich perspektivních nosičů pro nukleární medicínu*, PŘF UK, Praha, **2010**
- [47] K. S. Bhatki, A. T. Rane, M. B. Kabadi, *J. Radioanal. Chem.*, **1969**, *2*, 73
- [48] F. F. Dyer, G. W. Leddicotte, *The Radiochemistry of Copper*, National Academy of Sciences, Tennessee, **1961**
- [49] R. Schwarzbach, K. Zimmermann, P. Bläuenstein, A. Smith, P. A. Schubinger, *Appl. Radiat. Isot.*, **1995**, *46*, 329
- [50] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry 3rd ed.*, Wiley, New York, **2004**
- [51] L. D. Quin.; *A Guide to Organophosphorous Chemistry*, A John Wiley & Sons, New York, **2000**
- [52] R. L. Hilderbrand, *The Role of Phosphonates in Living Systems*, CRC Press, USA, **1983**
- [53] R. Engel, *Synthesis of Carbon-Phosphorus Bond*, CRC Press, USA, **1998**
- [54] H. Fleisch, *Bisphosphonates in Bone Disease*, Academic Press, London, **2000**
- [55] H. Fleisch, *Endocr. Rev.*, **1998**, *19*, 80
- [56] E. Deutsch, K. Libson, S. Jurisson, L. F. Lindoy, *Prog. Inorg. Chem.*, **1983**, *30*, 75
- [57] K. Ogawa, T. Mukai, Y. Arano, M. Ono, H. Hanaoka, S. Ishino, K. Hashimoto, H. Nishimura, H. Saji, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 751
- [58] W. B. G. Macdonald, R. G. Troedson, *Clin. Nucl. Med.*, **2001**, *26*, 455
- [59] E. Kawamura, J. Kawabe, T. Hayashi, A. Oe, J. Kotani, K. Torri, D. Habu, S. Shiomi, *Clin. Nucl. Med.*, **2005**, *30*, 351
- [60] Y. S. An, J. K. Yoon, M. H. Lee, C. W. Joh, S. N. Yonn, *Clin. Nucl. Med.*, **2004**, *29*, 723
- [61] G. C. Mackie, *Clin. Nucl. Med.*, **2003**, *28*, 851
- [62] I. K. Adzamli, H. Gries, D. Johnson, M. Blau, *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 139

- [63] a) J. D. Bergstrom, R. G. Bostedro, P. J. Masarachia, A. A. Reszka, G. Rodan, *Arch. Biophys.*, **2000**, 373, 231; b) E. van Beek, E. Pieterman, L. Cohen, C. Lowik, S. Papapoulos, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, 264, 108
- [64] C. M. Bagi, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2005**, 57, 995
- [65] H. I. Hansen, J. Kehler, *Synthesis*, **1999**, 11, 1925
- [66] I. Novak-Hofer, P. A. Schubiger, *Eur. J. Nucl. Med.*, **2002**, 29, 821
- [67] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Curr. Pharm. Des.*, **2007**, 13, 3
- [68] P. Karlson, W. Gerok, W. Gross, *Pathobiochemie*, Academia, Praha, **1987**
- [69] S. V. Smith, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 1874
- [70] a) C. S. Cutler, M. Wuest, C. J. Anderson, D. E. Reichert, Y. Sun, A. E. Martell, J. M. Welch, *Nucl. Med. Biol.*, **2000**, 27, 375; b) J. Yoo, D. E. Reichert, M. J. Welch, *Chem. Comm.*, **2003**, 6, 766
- [71] P. Barbaro, C. Bianchini, G. Capannesi, L. Di Luca, F. Laschi, D. Petroni, P. A. Salvadori, A. Vacca, F. Vizza, *Dalton Trans.*, **2000**, 14, 2393
- [72] L. A. Bass, M. Wang, M. J. Welch, C. J. Anderson, *Bioconjug. Chem.*, **2000**, 11, 527
- [73] C. Bianchini, G. Giambastiani, F. Laschi, P. Mariani, A. Vacca, F. Vizza, P. Zanello, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 879
- [74] X. Sun, M. Siest, Z. Kovacs, A. D. Sherry, R. Motekaitis, Z. Wang, A. E. Martell, M. J. Welch, C. J. Anderson, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2003**, 8, 217
- [75] J. L. J. Dearling, J. S. Lewis, G. E. Mullen, J. Welch, P. J. Blower, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**, 7, 249
- [76] J. L. J. Dearling, J. S. Lewis, G. E. Mullen, M. T. Rae, J. Zweit, P. J. Blower, *Chem. Commun.*, **1998**, 2531
- [77] C. J. Mathias, S. R. Bergmann, M. A. Green, *Nucl. Med. Biol.*, **1994**, 36, 1451
- [78] M. F. Giblin, B. Veerendra, Ch. J. Smith, *In Vivo*, **2005**, 19, 9
- [79] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Heidelberg, **2008**
- [80] P. A. Tanker, L. Sklar, *J. Cryst. Mol. Struct.*, **1975**, 5, 329
- [81] J. Kotek, P. Lubal, P. Hermann, I. Císařová, I. Lukeš, T. Godula, I. Svobodová, P. Táborský, J. Havel, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 233
- [82] T. Williams, C. Kelley, *Gnuplot* version 4.4.2, [online], [cit. 2012-08-04], <http://www.gnuplot.info/>

- [83] M. Kývala, *Program Opium*, [online], [cit. 2012-08-04],
<http://web.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>
- [84] C. F. Baes, R. E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Wiley New York, **1976**
- [85] P. Lebdušková et. al., *Bioconjugate Chem.*, **2004**, *15*, 881
- [86] V. Kubíček, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 1434
- [87] T. Vitha, V. Kubíček, J. Kotek, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, I. Lukeš, J. A. Peters. *Dalton Trans.*, **2009**, 3204
- [88] a) I. Meunier, A. K. Mishra, B. Hanquet, P. Cocolis, R. Guillard, *Can. J. Chem.*, **1995**, *73*, 685; b) E. K. Barefield, F. Wagner, A. W. Herbinge, A. R. Dahl, *Inorg. Synth.*, **1976**, *17*, 220
- [89] W. Yang, Ch. M. Giandomenico, M. Sartori, D. A. Moore, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 2481
- [90] V. Kubíček, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2007**, 333
- [91] S. Fůzerová, J. Kotek, I. Císařová, P. Hermann, K. Binnemans, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, **2005**, 2908
- [92] R. D. Hancock, R. J. Motekaitis, J. Mashishi, I. Cukrowski, J. H. Reibenspies, A. E. Martell, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1996**, *2*, 1925
- [93] S. Chaves, R. Delgado, J. J. R. Frausto Da Silva, *Talanta*, **1992**, *39*, 249
- [94] J. Kotek, P. Vojtíšek, I. Císařová, P. Hermann, P. Jurečka, J. Rohovec, I. Lukeš, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2000**, *65*, 1289
- [95] R. M. Smith, A. E. Martell, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, **1974**
- [96] R. B. Hay, M. P. Pujari, *Inorg. Chim. Acta*, **1985**, *100*, 1
- [97] I. Svobodová, J. Havlíčková, J. Plutnar, P. Lubal, J. Kotek, P. Hermann, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, *24*, 3577
- [98] L. H. Chen, C. S. Chung, *Inorg. Chem.*, **1988**, *27*, 1880
- [99] D. N. Pandya, J. Y. Kim, J. C. Park, H. Lee, P. B. Phapale, W. Kwak, T. H. Choi, G. J. Cheon, Y. R. Yoon, J. Yoo, *Chem. Commun.*, **2010**, *20*, 3517

8. PŘÍLOHY

Příloha 1: Publikace autora

Článek vznikl v rámci autorčiny aktivní účasti na *Sixth International Summer Student School on Nuclear Physics Methods and Accelerators in Biology and Medicine* (Dubna, Russia). Nad vydáním publikace převzal záštitu *American Institute of Physics (AIP) Conference Proceedings*, v jehož sborníku byla publikace vydána v roce 2012.