

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Marek Beliš

Design a syntéza ligandů pro selektivní separaci dvojmocné mědi

Design and synthesis of ligands for selective copper(II) separation

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie v přírodních vědách

Praha 2015

Tento priestor určený na pár slov vďaky by som rád využil, pretože za vznik tejto práce vďačím podpore viacerých ľudí. V prvom rade patrí vďaka mojim rodičom, za ich pochopenie a plnú podporu aj pri tomto mojom druhom štúdiu.

Veľký kus vďaky patrí môjmu školiteľovi Janovi Kotkovi, za všetok zvyšný čas, ktorý si pre mňa našiel. Mnohokrát to nebolo jednoduché, keď ma najmä v začiatkoch mojej laboratórnej práce našli mnohí ľudia sedieť na jeho stoličke častejšie ako jeho samého.

V slovách vďaky a chvály nesmiem zabudnúť na spoločnosť ľudí z labu, ktorých často protichodné rady rýchlym tempom rozširovali moje obzory o spôsoboch vykonania práce. Vďaka im patrí aj za trpezlivosť a toleranciu mojej občasnej nevedomosti a nešikovnosti či pomoc s meraniami. Ďakujem špeciálne Monike za pomoc s témou mojej práce, Terke za mnohé praktické laboratórne rady, Honzovi za merania spektier a technické rady, Maruš najmä za meranie hmotákov, Petrovi za pomoc pri oboznamovaní s programami a aj Filipovi, za jeho vycibrený vkus na určovanie farieb rôznych látok.

Na záver chcem poďakovať aj mojím spolužiakom a blízkym ľuďom, ktorých spoločnosť a skvelá atmosféra spoločných chvíľ ma motivovali pokračovať v tomto štúdiu.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Název práce: Design a syntéza ligandů pro selektivní separaci dvojmocné mědi

Autor: Marek Beliš

Katedra: Katedra anorganické chemie

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D., Katedra anorganické chemie

Abstrakt: Radioizotopy mědi jsou pro své rozmanité fyzikální vlastnosti používány v nukleární medicíně. Součástí přípravy radiofarmak obsahujících měď je separace připravených radionuklidů od nežádoucích prvků, zejména zinku a niklu. Cílem této práce je příprava ligandů se skeletem v podobě lineárního tetraaminu, které by měly být schopny selektivně komplexovat a dekomplexovat měď v závislosti na pH prostředí. Součástí je syntéza těchto ligandů, jejich NMR studie a pozorování disociačních kinetik vzniklých komplexů.

Klíčová slova: měď, koordinační chemie, nukleární medicína, lineární tetraaminy

Title: Design and synthesis of ligands for selective copper(II) separation

Author: Marek Beliš

Department: Department of Inorganic Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D., Department of Inorganic Chemistry

Abstract: Radioisotopes of copper are used in nuclear medicine for their physical properties. One step in process of preparing copper-containing radiopharmaceuticals is separation of copper radionuclides from other elements, especially zinc and nickel. The target of this Thesis is preparation of ligands based on linear tetraamine skeleton, which should be able of selective complexation and decomplexation of copper depending on pH of the solution. The Thesis contains synthesis of ligands, their NMR study and measurement of dissociation kinetics of their Cu-complexes.

Keywords: copper, coordination chemistry, nuclear medicine, linear tetraamines

Názov práce: Dizajn a syntéza ligandov pre selektívnu separáciu dvojmočnej medi

Autor: Marek Beliš

Katedra: Katedra anorganickej chémie

Vedúci bakalárskej práce: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D., Katedra anorganickej chémie

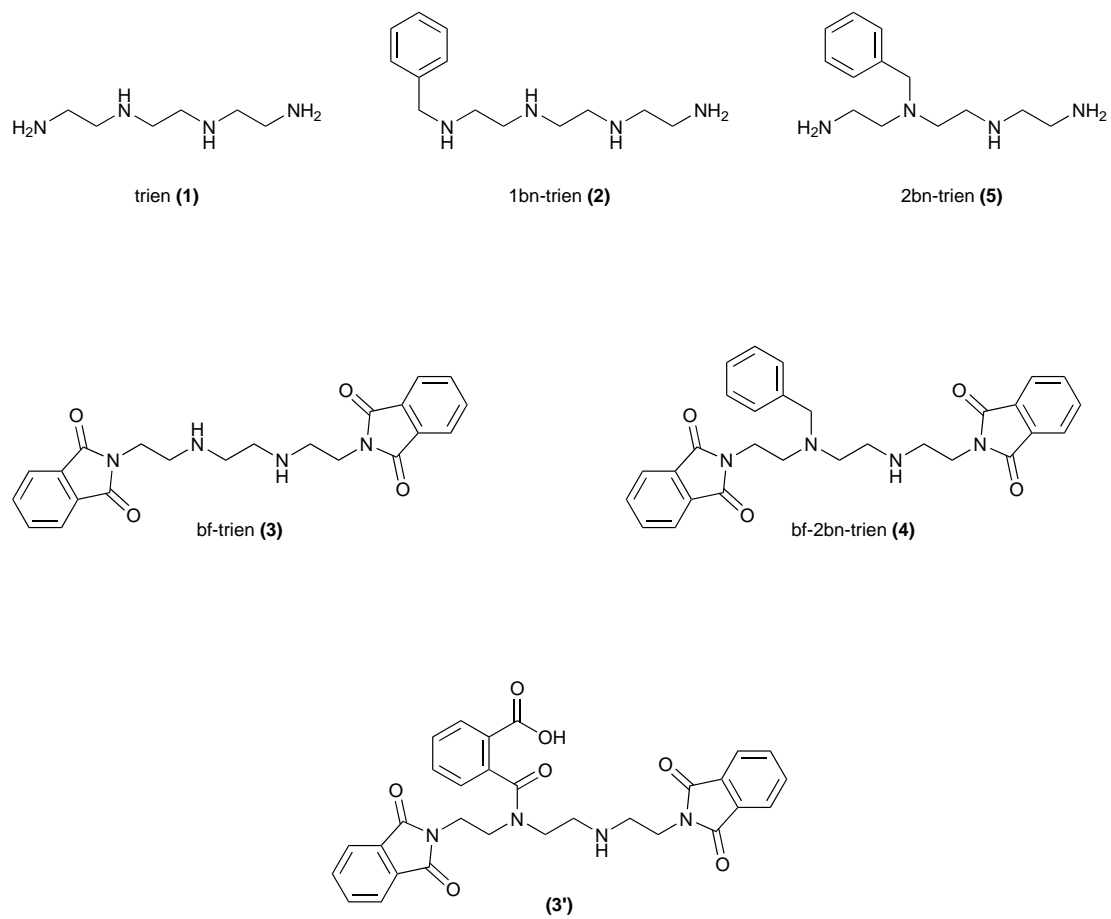
Abstrakt: Rádioizotopy medi sú pre svoje rozmanité fyzikálne vlastnosti používané v nukleárnej medicíne. Súčasťou prípravy rádiofarmák obsahujúcich meď je separácia pripravených rádionuklidov od nežiadúcich prvkov, najmä zinku a niklu. Cieľom tejto práce je príprava ligandov so skeletom v podobe lineárneho tetraamínu, ktoré by mali byť schopné selektívne komplexovať a dekomplexovať meď v závislosti na pH prostredia. Súčasťou je syntéza týchto ligandov, a pozorovanie disociačných kinetík vzniknutých komplexov.

Kľúčové slová: meď, koordinačná chémia, nukleárna medicína, lineárne tetraamíny

Obsah

1	Teoretický úvod	2
1.1	Nukleárna medicína	2
1.1.1	Rádiodiagnostické metódy	3
1.1.2	Rádioterapeutické metódy	5
1.2	Meď a jej vlastnosti	6
1.2.1	Izotopy medi a ich príprava	6
1.2.2	Používané separácie rádioizotopov medi	8
1.2.3	Ligandy tvoriace komplexy s meďou	8
1.3	Motivácia bakalárskej práce	10
1.4	Cieľ bakalárskej práce	11
2	Experimentálna časť	12
2.1	Zoznam použitých chemikálií	12
2.2	Metódy charakterizácie	12
2.2.1	Nukleárna magnetická rezonancia – NMR	12
2.2.2	Hmotnostná spektrometria – MS	12
2.2.3	Tenkovrstvová a stĺpcová chromatografia	13
2.2.4	Spektrofotometrické merania	13
2.3	Schéma syntéz	13
2.4	Syntéza ligandu 1bn-trien (2)	14
2.5	Syntéza ligandu 2bn-trien (5)	15
2.5.1	Príprava látky (3)	15
2.5.2	Príprava látky (4)	16
2.5.3	Príprava látky (5)	16
2.6	Meranie disociačných kinetík	17
2.7	Sledovanie NMR chemických posunov v závislosti na pH	18
3	Výsledky a diskusia	19
3.1	Syntéza látky (2)	19
3.2	Syntéza látky (5)	19
3.2.1	Príprava látky (3) z (1)	19
3.2.2	Príprava látky (4) z (3)	20
3.2.3	Príprava látky (5) z látky (4)	21
3.3	Výpočet protonizačných konštánt	21
3.4	Meranie disociačných kinetík	24

Záver	26
Zoznam použitých skratiek	27
Zoznam použitej literatúry	28



Obr. 1: Kódové označenie zlúčenín

1. Teoretický úvod

Medzi mnohé z praktických využití koordinačnej chémie, mimo chemických odvetví, patrí medicína. Koordináčné zlúčeniny sa vo výraznej miere používajú v nukleárnej medicíne vrámci diagnostických a terapeutických techník. So stále častejším využívaním týchto techník rastie aj potreba prípravy a štúdia nových ligandov, ktoré sa používajú na komplexáciu vhodných iónov kovov. Mimo iných rádionuklidov sa v poslednej dobe venuje väčšia miera záujmu rádiaoizotopom medi pre jej rôznorodé fyzikálne vlastnosti.

1.1 Nukleárna medicína

Nukleárna medicína je interdisciplinárny lekársky obor zaoberajúci sa diagnostikou a terapiou chorôb. Pre tieto účely využíva rádioaktívne žiarenie, ktoré je vysielané rádioaktívnymi látkami (rádiofarmakami) aplikovanými do vnútorného prostredia organizmu, alebo vonkajším zdrojom žiarenia (napr. γ -nôž). Jej metódy sú založené na dvoch základných vlastnostiach rádionuklidov. Prvým je emisia prenikavého ionizujúceho žiarenia pri premenách jadier. Druhým je zhodné chemické správanie sa rádioaktívneho izotopu v porovnaní so stabilnými izotopmi daného prvku.

Rádiofarmaká sú liečivá obsahujúce aspoň jeden atóm rádionuklidu. Medzi najdôležitejšie vlastnosti patrí polčas rozpadu daného rádionuklidu. S ohľadom na prevenciu poškodenia organizmu sú vhodné krátke polčasy rozpadu. Z hľadiska prípravy rádiofarmaka sú vhodné polčasy rozpadu dlhšie. Rozumným kompromisom je polčas rozpadu v rádoch hodín, či desiatok hodín, ktorý ponúka dostatok času na prípravu rádiofarmaka a zároveň prijateľnú dobu ožarovania tkanív. Ďalšími dôležitými parametrami sú charakter žiarenia a energia vyžarovaných častíc. Tie závisia najmä na metóde, keďže iné typy a energie žiarenia sú potrebné pre diagnostiku a iné pre terapiu. Využívanie komplexov v medicíne kladie vysoké nároky aj na stabilitu komplexu v biologickom prostredí. Väčšina voľných kovov je pre organizmus vysoko toxická, v prípade rádionuklidov dochádza k ich ukladaniu napr. v kostných tkanivách a následnému dlhodobému rozpadu. Preto je nutné, aby dané rádiaoizotopy boli pevne viazané v komplexoch. Tým sa zabráni uvoľnovaniu centrálného atómu kovu do organizmu. Prehľad najčastejšie používaných rádiaoizotopov je v Tab. 1.1.

Rádiofarmaká možno pripraviť rôznymi spôsobmi. Izotopová výmenná reakcia vymení stabilný izotop v molekule rádioaktívnym, pridaným do reakčnej zmesi.

Tabuľka 1.1: Rádioizotopy najčastejšie používané v medicíne^[2]

Rádionuklid	Využitie
¹¹ C	PET sken mozgu
¹⁵ O	PET sken krvného riečišťa v mozgu
¹⁸ F	PET sken
³² P	diagnostika chorôb kostí
⁶⁴ Cu	PET sken
⁶⁷ Cu	terapeutika rakoviny
^{81m} Kr	pľúcna gamagrafia
^{91m} Tc	zobrazenie srdca, pľúc, štítnej žľazy či obličiek
¹²³ I	sledovanie činnosti štítnej žľazy
^{191m} Ir	vyšetrenie kardiovaskulárnych chorôb

Chemická syntéza využíva vznik koordinačno-kovalentnej väzby medzi rádionuklidom a ligandom alebo kovalentné viazanie rádioizotopu do organickej zlúčeniny. Biochemická syntéza využíva enzýmy a mikroorganizmy. Rádionuklid je v tomto prípade zabudovaný v príslušných metabolitoch.

Z hľadiska aplikácie možno rádiofarmaká rozdeliť do troch skupín. Prvé sú parenterálne, ktoré sa podávajú intravenózne, občas subkutánne či intralubálne v podobe roztokov, koloidov a suspenzií. Perorálne rádiofarmaká sa podávajú v podobe roztokov alebo kapsulí. Tretím typom sú inhalačné rádiofarmaká, kde sa jedná hlavne o rádioaktívne plyny (^{81m}Kr) alebo plynne disperzie rádiofarmak (s obsahom napr. ^{91m}Tc), ktoré sa vdychujú spolu so vzduchom^[1, 2, 3].

1.1.1 Rádiodiagnostické metódy

Zobrazovacie metódy pre svoje účely využívajú najmä detekciu ionizujúceho žiarenia, v prípade rádiodiagnostiky Röntgenového a γ -žiarenia. Medzi najstaršie a najjednoduchšie zobrazovacie metódy patrí Röntgenové zobrazovanie. Využíva vysokoenergetické žiarenie o energii 20 – 150 kV pre jeho schopnosť prenikať materiálmi i nepriehľadnými pre svetlo. Časť žiarenia je absorbovaná v tkanivách, zvyšné prechádzajúce žiarenie je zviditeľňované na lumiscenčnom tienítke, fotograficky alebo pomocou elektronických detektorov. Jedná sa o planárne zobrazenie hustoty tkaniva.

Skutočné tkanivá sú objektom trojrozmerným. K získaniu trojrozmerného obrazu bola vyvinutá počítačová tomografia (CT), ktorá využíva prežarovanie tkanív pod rôznymi uhlami. Počítačovou rekonštrukciou sa získa obraz priečného re-

zu vyšetrovanej oblasti. Rovnako ako v prípade štandardného zobrazenia je však rozlíšenie veľmi malé, keďže mäkké tkanivá absorbujú röntgenové žiarenie v malej miere. Vo výsledných obrazoch je náročné odlíšiť poškodené tkanivá od zdravých.

Pokročilejšie diagnostické metódy využívajú scintigrafiu a rozpad rádionuklidov s emisiou ionizujúceho žiarenia. Scintigrafia (prípadne gamagrafia) je fyzikálne-elektronická metóda, ktorá zobrazuje distribúciu rádioindikátoru v organizme na základe vonkajšej detekcie vychádzajúceho γ -žiarenia. Rádiofarmaká sú v organizme distribuované na základe svojho chemického zloženia, podľa ktorého sa hromadia fyziologicky alebo patologicky v určitých orgánoch a tkanivách pred svojím vylúčením z tela. V miestach depozície dochádza k rozpadu rádionuklidov a emisii γ -žiarenia.

Existujú dva typy emisnej scintigrafie. Prvým je *jednofotónová emisná počítačová tomografia* (SPECT), ktorá za použitia γ -rádionuklidov zachytáva emisiu žiarenia. Rotáciou kamery okolo vyšetrovaného objektu sa získava séria planárnych scintigrafických obrazov, z ktorých sa počítačovo rekonštruje obraz trojrozmerný. Výhodou je vyšší kontrast tkanív (v porovnaní s RTG), nevýhodou je prípadná absorpcia žiarenia v tkanivách.

Pozitrónová emisná tomografia (PET) zobrazuje distribúciu β^+ -rádionuklidov. β^+ -rozpadom vhodného rádionuklidu sa uvoľňuje pozitron, ktorý ihneď po strete s elektrónom anihiluje za vzniku dvoch γ -fotónov o energii 511 keV. Energia fotónov je dôsledkom zákona zachovania energie, v dôsledku zákona zachovania hybnosti tieto fotóny vylietajú v presne opačných smeroch (vzhľadom na malú rýchlosť elektrónu a pozitronu v momente anihilácie). Pôvod vzniku daných fotónov sa určí ich koincidenčnou detekciou. Ponúka vyššie rozlíšenie a detekčnú účinnosť ako SPECT. V Tab. 1.2 sú vybrané γ -žiarice a pozitronové žiarice^[1, 2, 3, 4].

Tabuľka 1.2: Vybrané žiarice pre metódy SPECT a PET^[5]

Rádionuklid	Druh rozpadu	Polčas rozpadu	Zdroj rádionuklidu	Využite
^{67}Ga	γ	3,26 d	cyklotron, $^{67}\text{Zn}(p,n)^{67}\text{Ga}$	onkologická diagnostika
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	γ	6 h	generátor, $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	vyšetrenie mozgu, obličiek
^{123}I	γ	12 h	cyklotron, $^{123}\text{Te}(p,n)^{123}\text{I}$	poruchy štítnej žľazy
^{111}In	γ	68 h	cyklotron, $^{111}\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$	hematologická diagnostika
^{15}O	β^+	2,1 min	cyklotron, $^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$	angiografia mozgu
^{18}F	β^+	110 min	cyklotron, $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	onkologická diagnostika
^{64}Cu	β^+	12,74 h	cyklotron, $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$	onkologická diagnostika

1.1.2 Rádioterapeutické metódy

Rádioterapia je medicínsky odbor využívajúci ionizujúce žiarenie na liečebné účely. Ožiarení tkanív a orgánov dochádza ku zmenám bunčných štruktúr, v prvom rade DNA. Výsledkom sú zmeny v bunčnom metabolizme, ktoré vedú k poškodeniu či smrti bunky. Veľkú citlivosť preukazujú najmä rýchlo sa deliace nádorové bunky. Medzi rádiosenzitívne nádory (citlivé na ožarovanie) sa radia leukémia či lymfómy, k rádiorezistentným patria nádory kostí či mozgu. Existujú ešte obmedzene rádiosenzitívne nádory, ako karcinómy kože či štítnej žľazy, ktorých citlivosť je podobná ako citlivosť zdravého tkaniva. Z normálnych buniek ľudského tela vykazujú vysokú senzitivitu krv a krvotvorné orgány či zárodočné bunky pohlavných žliaz. Na druhej strane sú tkanivá svalov, kostí a nervová sústava, ktoré sú málo citlivé na žiarenie^[6].

V prípade malých, dostatočne citlivých, vhodne lokalizovaných nádorov bez metastáz je možné použiť radikálnu, tzv. kuratívnu rádioterapiu. Jej cieľom je vyliečenie pacienta úplnou likvidáciou nádoru. Zhoršením zdravotného stavu alebo progresiou ochorenia sa radikálna liečba môže meniť na tzv. paliatívnu liečbu. Cieľom paliatívnej rádioterapie je zmiernenie a spomalenie rastu nádoru, čím sa zmierňuje bolesť a potenciálne predlžuje život pacienta^[1, 6].

Tabuľka 1.3: Vybrané rádionuklidy pre rádioterapiu

Rádionuklid	Druh rozpadu	Polčas rozpadu	Zdroj rádionuklidu
^{32}P	β^-	14,3 d	reaktor, $^{32}\text{S}(\text{n},\text{p})^{32}\text{P}$
^{67}Ga	γ/Auger	3,3 d	cyklotron, $^{67}\text{Zn}(\text{p},\text{n})^{67}\text{Ga}$
^{67}Cu	β^-	61,8 h	cyklotron, $^{67}\text{Zn}(\text{n},\text{p})^{67}\text{Cu}$
^{90}Y	β^-	64 h	cyklotron, $^{90}\text{Sr}(\beta^-)^{90}\text{Y}$, 28 rokov
^{131}I	β^-	8 d	reaktor, $^{130}\text{Te}(\text{n},\gamma)^{131}\text{Te} \rightarrow ^{131}\text{I}$

Pre rádioterapeutické účely sú vhodné najmä rádioizotopy produkujúce hmotné častice s krátkym doletom (α -žiariče, β^- -žiariče, γ -žiariče s nízkou energiou žiarenia alebo s emisiou Augerových elektrónov). Podľa spôsobu transportu môžeme rádioterapeutika deliť do troch skupín. Teleterapia využíva externé zdroje γ -žiarenia, pri ktorých dochádza k intenzívnemu a koncentrovanému ožarovaniu oblasti nádoru. Pri brachyterapii sa vložia vhodné rádizotopy v uzavretej forme do nádorových tkanív alebo do ich blízkosti. Tretím typom je aplikácia otvorených žiaričov do krvného obehu, tzv. rádioizotopová terapia. Pre účinok tejto metódy je nutné vhodne zvolené liečivo tak, aby sa selektívne akumulovalo v nádorových

tkanivách. Dôležitý je aj polčas rozpadu aspoň v ráde hodín, ktorý poskytuje dostatok času na transport krvným obehom k nádoru. Vybrané rádioizotopy sú v Tab. 1.3^[1, 3, 6].

1.2 Med' a jej vlastnosti

Med' spolu s ďalšími ušľachtilými kovmi, striebrom a zlatom, patrí do I.B skupiny periodickej tabuľky prvkov. V podobe bronzu ako zliatiny medi a cínu sa hojne využívala už v dobe bronzovej. V prírode sa najčastejšie vyskytuje ako súčasť rúd, hlavne vo forme chalkopyritu (CuFeS_2), chalkosinu (Cu_2S), cupritu (Cu_2O), covellinu (CuS), tenoritu (CuO) či malachitu ($\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$).

Základná elektrónová konfigurácia medi je $[\text{Ar}] 4s^1 3d^{10}$. Najbežnejší oxidačný stav medi je II. V koordinačných zlúčeninách môže nadobúdať oxidačné čísla I, II, III a IV. Doposiaľ neboli popísané stabilné zlúčeniny s oxidačným číslom 0 alebo dokonca až záporným.

Oxidačné číslo I (d^{10}) je vo väčšine prípadov nestále. Jednou z možných stabilizácií sú komplexy s π -akceptorové ligandy, iný spôsob sú málo rozpustné zlúčeniny. Komplexy majú diamagnetické vlastnosti kvôli plne zaplneným d orbitálom, z rovnakého dôvodu sú zväčša bezfarebné alebo jemne žlté.

Oxidačné číslo II (d^9) je najčastejším a najstabilnejším oxidačným číslom u zlúčenín medi. Sú známe jednoduché meďnaté soli takmer od všetkých aniónov. V prípade komplexných zlúčenín prevažujú koordinačné čísla 4, 5 a 6. Pre meďnaté kationy sú charakteristické zlúčeniny s tvrdými O -donorovými a stredne tvrdými N -donorovými ligandami.

Zlúčeniny s meďou v oxidačnom stave III sú málo stabilné, pretože sú náchylné na redukciu. K stabilizácii komplexov je potrebné použiť tvrdé elektronegatívne ligandy.

V ľudskom tele je štvrtým najrozšírenejším prechodným kovom (po železe, mangáne a kobalte). Je dôležitým mikrobiogénnym prvkom, kofaktorom niektorých enzýmov. Dôležitých biochemických pochodov sa zúčastňuje aj v oxidačnom stave III. V dôsledku genetických porúch sa následná nerovnováha metabolizmu medi v organizme môže prejaviť ako Menkeho alebo Wilsonova choroba^[3, 7, 8, 9].

1.2.1 Izotopy medi a ich príprava

Izotopy kovov sú špecifické svojou variabilitou a z toho vyplývajúcimi rozmanitými fyzikálnymi (polčasy rozpadov, druh a energia emitovaných žiarení) a chemickými (koordinačné schopnosti) vlastnosťami. V posledných rokoch sú pre tieto

vlastnosti vo zväčšenej miere študované rádioizotopy medi. Prírodne je meď zastúpená v dvoch stabilných izotopoch, ^{63}Cu (69,2 %) a ^{65}Cu (30,8 %). Umelo pripravené boli izotopy ^{57}Cu až ^{79}Cu , prípadne aj v metastabilných formách. Prehľad vybraných izotopov je v Tab. 1.4^[10, 11].

Tabuľka 1.4: Vybrané izotopy medi^[11]

Izotop	Polčas rozpadu	Druh rozpadu	Zdroj rádionukldu
^{60}Cu	23,7 min	β^+ (93 %), EZ (7 %)	cyklotron
^{61}Cu	3,3 h	β^+ (62 %), EZ (38 %)	cyklotron
^{62}Cu	9,7 min	β^+ (98 %), EZ (2 %)	generátor/cyklotron
^{63}Cu	stabilný		
^{64}Cu	12,74 h	β^+ (19 %), β^- (40 %), EZ (41 %)	reaktor/cyklotron
^{65}Cu	stabilný		
^{66}Cu	5,1 min	β^- (100 %)	reaktor/cyklotron
^{67}Cu	61,8 h	β^- (100 %)	reaktor/cyklotron

Najuniverzálnejším izotopom medi je rádionuklid ^{64}Cu . V 41 % prípadov dochádza pri rozpade k elektrónovému záchytku (ktorého dôsledkom môže byť emisia Augerových elektrónov), 40 % prípadov tvorí emisia elektrónu (β^- rozpad) a zvyšných 19 % emisia pozitronu (β^+ rozpad). Optimálny polčas rozpadu, 12,74 h, ponúka dostatok času ako na prípravu rádiofarmaka, tak na jeho distribúciu v organizme. Pripravuje sa ostreľovaním meďnatých, zinočnatých alebo nikelnatých terčov v reaktoroch alebo cyklotronoch. Najnižšie aktivity vykazuje priama aktivácia $^{63}\text{Cu}(n,\gamma)^{64}\text{Cu}$ záchytkom tepelných neutrónov v reaktoroch. Nepriamou aktiváciou zinkových terčov $^{64}\text{Zn}(n,p)^{64}\text{Cu}$ je možné sa dostať na vyššie aktivity. Najvyšších aktivít je možné dosiahnuť ožarovaním obohatených niklových $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ alebo zinkových $^{64}\text{Zn}(d,2p)^{64}\text{Cu}$ terčov v cyklotrone. Výsledný rádioizotop medi je vhodný na štúdium metabolizmu medi, diagnostiku metabolických porúch či značkovanie^[3, 11].

Najdlhší polčas rozpadu zo všetkých izotopov má rádionuklid ^{67}Cu . Pri rozpade sa uvoľňuje elektrón o energii 577 keV za premeny na ^{67}Zn v základnom stave, prípadne na niektorý z troch metastabilných izotopov a následným prechodom do základného stavu vyžiarením γ fotónu o energii 92 alebo 185 keV. Izotop je vhodný najmä pre metódu SPECT či k rádioterapii. Produkuje sa metódou $^{67}\text{Zn}(n,p)^{67}\text{Cu}$ v reaktore s vysokým neutrónovým tokom^[3, 11].

1.2.2 Používané separácie rádioizotopov medi

Používané rádionuklidy medi sú kvôli spôsobu prípravy súčasťou zmesí s mnoho inými kovmi, najčastejšie zinkom a niklom. V nukleárnej medicíne je potrebné, aby používané látky boli čo najčistejšie s čo najvyššou špecifickou aktivitou. To kladie vysoké nároky na separačné metódy k oddeleniu žiadaných rádionuklidov od pôvodných materských atómov alebo iných vedľajších produktov.

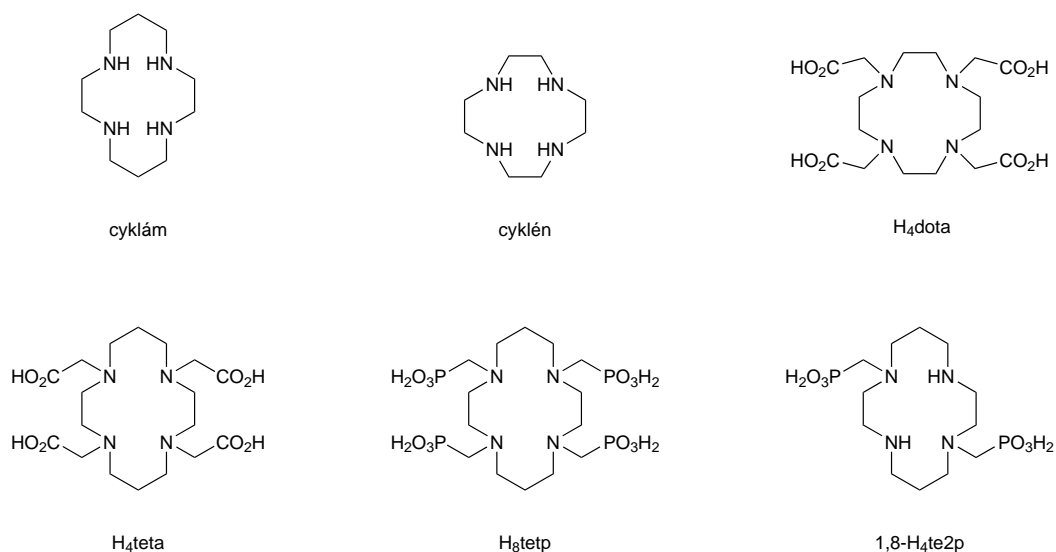
Pri separácii rádionuklidov je potrebné brať ohľad na ich špecifické vlastnosti (žiarenie, polčas rozpadu). Pre tieto účely sa už dlhodobo využíva kryštalizácia, zrážanie alebo sorpcia. Tieto štandardné separačné a analytické metódy sú aj v dnešnej dobe vhodné v niektorých prípadoch, ale sú časovo náročné. Čoraz častejšie sa využíva extrakcia, destilácia, elektrolýza alebo ionomeničová chromatografia. V prípade týchto chromatografií sa používajú hlavne kationové alebo aniónové iónomeniče, v niektorých prípadoch chelatujúca živica. Tieto iónomeniče obsahujú organickú polymerizáciu pripravené polymérne nosiče, na ktoré sa ďalej viažu aktívne skupiny. Aplikovaním zmesi na takto pripravený iónomenič dochádza k selektívnemu zachytávaniu iónov (v závislosti na pH zmesi). Vyplavovanie iónov takisto závisí na pH elučnej zmesi. Žiadaný ión, v tomto prípade rádionuklid, je vyplavovaný zvyčajne pôsobením silnej kyseliny, pri ktorom dochádza zároveň k regenerácii iónomeniču^[3, 12, 13].

1.2.3 Ligandy tvoriace komplexy s meďou

Meď tvorí širokú paletu komplexov s tvrdými a stredne tvrdými ligandami. Pre jej medicínalnu aplikáciu je nutné, aby tieto komplexy boli za podmienok *in vivo* stabilné, kineticky interné a aby boli používané ligandy vysoko selektívne. Meď a mnohé ďalšie používané atómy kovov sú vo voľnom stave v organizme vysoko toxické. Rovnako je potrebná stabilita komplexov v prostredí jak s konkurenčnými ligandami (napr. proteíny), tak s konkurenčnými biogénnymi kationmi (napr. Ca^{2+} , Mg^{2+} či Zn^{2+} a iné). V prítomnosti iných kationov môže dochádzať k transmetaláčnym reakciám^[3, 15].

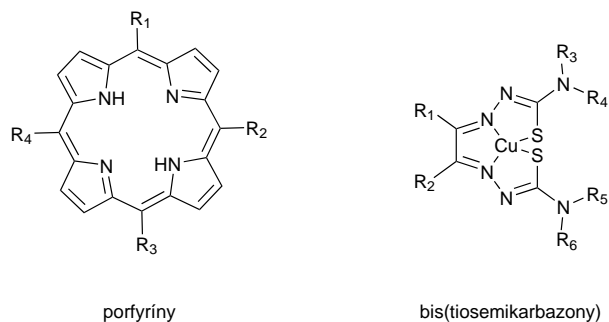
Ako vhodné ligandy sú dlhodobo študované dusíkaté makrocyclické ligandy. U týchto ligandov je možné ich vlastnosti meniť substitúciou pendantných ramien. Pendantné ramená sú skupiny s koordinačnými vlastnosťami naviazané na dusíkových atómoch makrocyclu. Vhodnými pendantnými ramenami sú karboxylové kyseliny a ich deriváty (amidy, alkoxidy) či fosfonáty a fosfináty. Pomocou správnych pendantných ramien je možné ladiť rýchlosť komplexácie, selektivitu, termodynamickú stabilitu a kinetickú inertnosť komplexov s vybraným kovom^[14].

Pre rôzne ióny kovov sú vhodné rôzne veľké makrocyklické ligandy. V súčasnej dobe sa na komplexáciu trojmocného gália používajú najmä deriváty cyklénu a triázacyklononánu, u lantanoidov sa používajú najmä deriváty cyklénu. Pre meď sa ako najvhodnejšie javia deriváty cyklámu, ktoré s meďou tvoria aj za podmienok *in vivo* kineticky veľmi inertné komplexy. Rôznou kombináciou pendantných ramien či využitím etylénových mostíkov medzi dusíkmi makrocyklu (cross-bridged a side-bridged cyklám) je možné dospieť k veľkej skupine ligandov. Malý výber je na Obr. 1.1^[14].



Obr. 1.1: Vybrané ligandy selektívne tvoriace komplexy s meďou

Pre komplexáciu medi sú vhodné aj porfyríny (obecný tvar na Obr. 1.2). Sú to deriváty tetrapyrrolu porfínu, ktoré sú v organizme zastúpené napr. ako krvné farbivá či bielkoviny. Jednoduchou derivatizáciou základného skeletu je možné získať skupinu ligandov, ktoré s meďou tvoria veľmi stále komplexy. Tieto komplexy sú schopné kumulovať sa v zápalových a lymfatických tkanivách, čo otvára priestor pre rádiodiagnostické metódy^[11, 16].



Obr. 1.2: Obecné tvary porfyrínov a bis(thiosemikarbazonov)

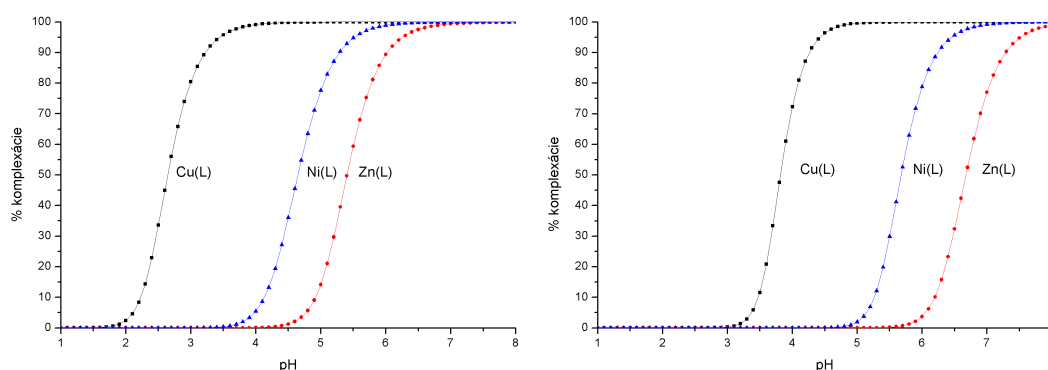
Poslednou skupinov ligandov vhodných pre komplexáciu medi sú rôzne substituované bis(tiosemikarbazony), ktoré tvoria termodynamicky a kineticky stabilné komplexy (Obr. 1.2). Využívajú sa najmä ako chemoterapeutiká v onkológii^[17].

1.3 Motivácia bakalárskej práce

Táto práca ma za úlohu navrhnúť a pripraviť ligandy so schopnosťou selektívne (v závislosti na pH) komplexovať a dekomplexovať meď. Je vhodné vytvoriť model, ktorý vhodnými substituentami pridá možnosť väzby týchto ligandov na polymérny materiál. Komplex by zároveň mal byť kineticky málo inertný v kyslom prostredí, aby bolo možné odseparovaný rádionuklid medi jednoducho uvoľniť. Výsledný iónomenič (chelatujuca živica) by mal schopnosť selektívne separovať meď hlavne od zinku a niklu, čím by našiel uplatnenie v nukleárnej medicíne pri separácii rádioizotopov medi a následnej tvorbe rádiofarmák.

V minulosti boli pripravené rôzne bifunkčné makrocyclické ligandy so žiadanými vlastnosťami na báze cyklámu alebo cyklénu. Otvára sa priestor na štúdium lineárnych tetraamínov, ktoré majú schopnosť tvoriť komplexy s meďou. Substitúciou na atónoch dusíku sa zároveň pridávajú možnosti ďalšej reakcie s polymérmi iónomeničov alebo možnosť ovplyvnenia formačných a disociačných kinetík komplexov.

Ako základné skelety boli uvažované 2,2,2-tetraamín (1,4,7,10-tetraázadekán, **(1)**) a 323-tetraamín (1,5,8,12-tetraázadodekán), ktorých vlastnosti boli vzájomne porovnávané výpočtami. Na základe protonizačných konštánt amínov a údajoch o stabilite komplexov medi, zinku a niklu^[18] boli vypracované distribučné diagramy s danými ligandami (Obr. 1.3).



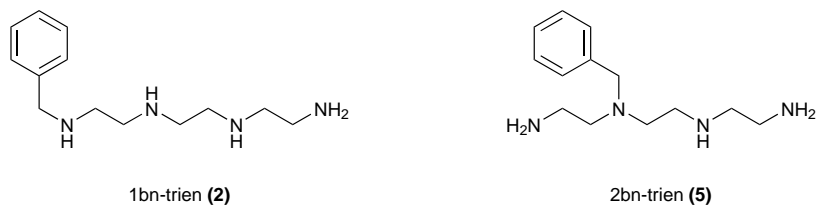
Obr. 1.3: Závislosť komplexácie na pH pre kovy s ligandom **(1)** (vľavo) a ligandom 323-tetraamín (vpravo) s koncentráciou kovu aj ligandu 2,5 mM

Skelet **(1)** je podľa výpočtov vhodnejší najmä pre tvorbu komplexu s meďou vo viac kyslej oblasti a pre trochu väčší rozdiel medzi meďou a nikelom.

1.4 Cieľ bakalárskej práce

Cieľom tejto práce je:

- syntéza ligandov 1bn-trien a 2bn-trien;
- štúdium disociačných kinetík daných ligandov v závislosti na pH prostredia.



Obr. 1.4: Pripravované ligandy

2. Experimentálna časť

2.1 Zoznam použitých chemikálií

Ako základná chemikália pre tvorbu navrhnutých ligandov bol použitý pevný trietyléttetraamín x-hydrát (Sigma-Aldrich, CAS 305808-21-3). Pokiaľ nie je uvedené inak, všetky ostatné chemikálie (s výnimkou destilovanej vody a technického liehu) boli použité v kvalite p. a. alebo vyššej, získané z komerčných zdrojov (Sigma-Aldrich, Fluka).

2.2 Metódy charakterizácie

2.2.1 Nukleárna magnetická rezonancia – NMR

^1H a ^{13}C spektrá boli merané na prístrojoch VNMRS300 (rezonančná frekvencia jadier ^1H : 299,94 MHz, ^{13}C : 75,4 MHz) a Bruker Avance (III) 600 (rezonančná frekvencia jadier ^1H : 600,17 MHz, ^{13}C : 150,9 MHz), ktoré sú dostupné na chemickom ústave PĚF UK. Hodnoty chemických posunov δ sú uvádzané v jednotkách ppm s presnosťou na dve desatiné miesta pre ^1H a jedno desatiné miesto pre ^{13}C . Tieto chemické posuny boli referencované na TMS ($\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{C}} = 0$). Interakčné konštanty J sú uvádzané u vodíkových charakterizácií v Hz s presnosťou na jedno desatiné miesto. Uhlíkové spektrá boli merané dekaplované. Použité deuterované rozpúšťadlá: CDCl_3 , 99,8 %, CD_3OD , 99,8 %, D_2O , 99,95 %. Použité symboly v NMR charakterizáciách: s (singlet), t (triplet), dt (dublet tripletu), m (multiplet). Spektrá boli namerané Mgr. Janom Blahutom, Mgr. Terezou Krchovou, Mgr. Monikou Paúrovou, Bc. Petrom Urbanovským a autorom. Charakterizácie sú u príslušných látok.

2.2.2 Hmotnostná spektrometria – MS

Hmotnostné spektrá boli namerané na prístroji Bruker ESQUIRE 300, dostupnom na chemickom ústave PĚF UK. Tento hmotnostný spektrometer využíva ionizáciu pomocou elektrospreju a je vybavený iónovou pascou. Boli namerané spektrá kladných iónov. Data boli namerané Mgr. Ondřejom Zemkom a Bc. Mariou Martiniskovou. Charakterizácie sú u príslušných látok.

2.2.3 Tenkovrstvová a stĺpcová chromatografia

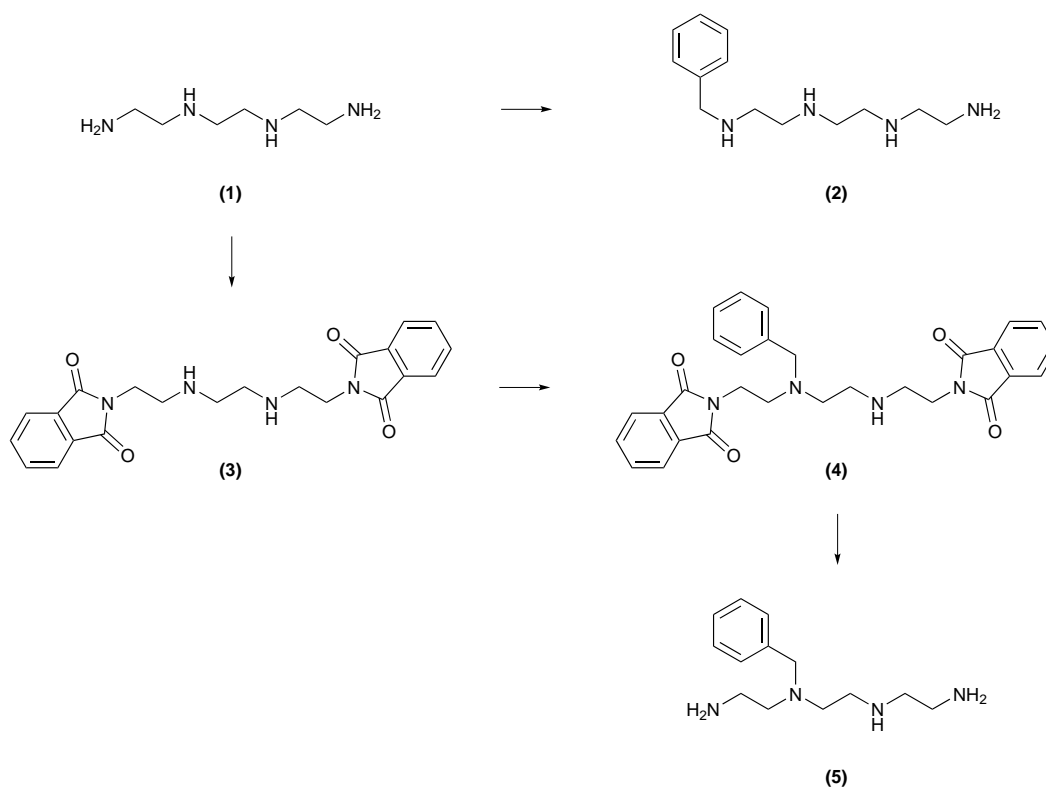
Tenkovrstvová chromatografia (TLC) bola vykonávaná na doštičkách Silufol UV 254. Detekcia bola realizovaná UV lampou alebo 0,5% etanolovým roztokom ninhydrínu s následným zahriatím. Mobilné fázy a retenčné faktory sú u príslušných látok.

Stĺpcová chromatografia bola vykonaná na kolónach silikagélu (Silica gel 60 Merck). Mobilné fázy sú uvedené u jednotlivých purifikačných krokov.

2.2.4 Spektrofotometrické merania

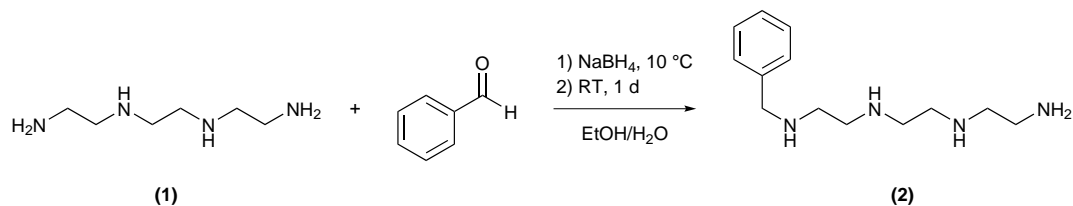
Meranie disociačných kinetík bolo vykonané na UV/VIS spektrofotometri Shimadzu UV-2401PC s teplotou regulovanou Peltierovým článkom pri teplote $25 \pm 0,1$ °C. Tento prístroj je k dispozícii na chemickom ústave PĚF UK.

2.3 Schéma syntéz



Obr. 2.1: Schéma syntetických krokov pri príprave ligandov (2) a (5)

2.4 Syntéza ligandu 1bn-trien (2)



Do 250ml guľatej banky bolo navážených 9,14 g východzej látky trietyléntetraamín x-hydrátu (**1**) a 4,04 g benzaldehydu (38 mmol), ktoré boli rozpustené v 120 ml zmesi etanol:voda (1:1). Zmes bola miešaná 15 min pri laboratórnej teplote, následne bola vychladená v kúpeli voda-ľad. Po vychladení zmesi bolo pridávaných v malých dávkach 0,97 g (25 mmol) borohydridu sodného tak, aby teplota reakčnej zmesi neprekročila 10 °C. Po pridaní všetkého borohydridu sodného bola zmes intenzívne miešaná cez noc pri laboratórnej teplote.

Na ďalší deň bola zmes umiestnená do vyhriateho olejového kúpeľa o teplote 85 °C, kde bola intenzívne miešaná 1 h. Rozpúšťadlo bolo odparené na RVO. K odparku bolo pridanych 60 ml 10% hydroxidu sodného a zmes bola extrahovaná 4×60 ml dichlórmetánu. K extraktu dichlórmetánu bol pridávaný bezvodný síran sodný ako sušidlo až do úplného vyčistenia roztoku. Zmes bola prefiltrovaná cez fritu S4 a filtrát bol odparený na RVO^[19].

K odparku bolo pridané minimálne množstvo etanolu a zmes bola čistená stĺpcovou chromatografiou (170 ml silikagélu) s mobilnými fázami etanol (500 ml) a etanol:amoniak (10:1, 5:1 a 3:2). Bolo získaných 7,26 g bezfarebného oleja látky 1bn-trien (**2**) (75 % výťažok oproti navážke **(1)**). Na záver bol do banky s produktom pridaný nadbytok zriedenej kyseliny chlorovodíkovej, ktorá bola následne odparená na RVO (za účelom zamedzenia degradácie produktu na vzduchu vo forme voľného amínu). Po odparení kyseliny bol produkt biela pevná látka.

Charakterizácia látky (**2**):

TLC: EtOH:NH₃ (3:2), $R_f = 0,15$ (ninhydrín: fialová škvrna)

MS (+): 236,9 ($[M+H]^+$ teor. 237,2)

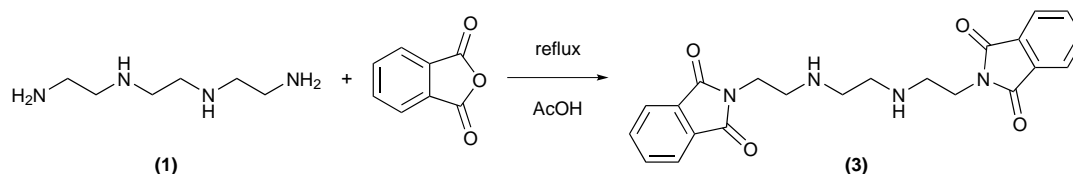
¹H NMR (600,2 MHz, CDCl₃): $\delta = 2,60$ (t, 2H, $^3J_{HH} = 6,0$ Hz, CH₂-CH₂-NH₂); 2,66, 2,68 (s, po 4H, CH₂-CH₂); 2,73 (t, 2H, $^3J_{HH} = 6,0$ Hz, CH₂-CH₂-NH₂); 3,72 (s, 2H, C-CH₂-NH), 7,17 (dt, 1H, $^3J_{HH} = 4,2$ Hz, arom.); 7,25 (d, 4H, $^3J_{HH} = 4,2$ Hz, arom.)

¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, CDCl₃): $\delta = 41,7$ (s, 1C, CH₂-CH₂-NH₂); 48,8; 49,2; 49,3; 49,3 (s, po 1C, NH-CH₂-CH₂-NH); 52,3 (s, 1C, NH-CH₂-CH₂-NH₂);

54,0 (s, 1C, C-CH₂-NH); 127,0 (s, 1C, arom.), 128,2 (s, 2C, arom.); 128,5 (s, 2C, arom.); 140,4 (s, 1C, arom.)

2.5 Syntéza ligandu 2bn-trien (5)

2.5.1 Príprava látky (3)



Do 250ml guľatej banky bolo navážených 10,00 g východzej látky trietylén-tetraamín x-hydrátu (**1**) a 15,20 g (103 mmol) ftalanhydridu rozotretého v trecej miske. Do banky bolo pridaných 150 ml kyseliny octovej a banka s reakčnou zmesou bola umiestnená do olejového kúpeľa o teplote 140 °C, na banku bol nasadený spätných chladič a sušiacia trubička naplnená bezvodným chloridom vápenatým. Za stáleho miešania bola zmes ponechaná k reakcii cez noc^[20].

Kyselina octová bola odparená na RVO. K odparku bol pridaný nadbytok zriedenej kyseliny chlorovodíkovej, ktorá bola následne odparená na RVO. Odparok bol triturovaný izopropylalkoholom. Zmes bola odfiltrovaná na frite S4, vyzrážaný produkt bol premývaný izopropylalkoholom na frite a následne sušený v exsikátore. Bolo získaných 14,16 g látky (**3**) v podobe hydrochloridu. Produkt bola pevná látka jemne naružovej farby.

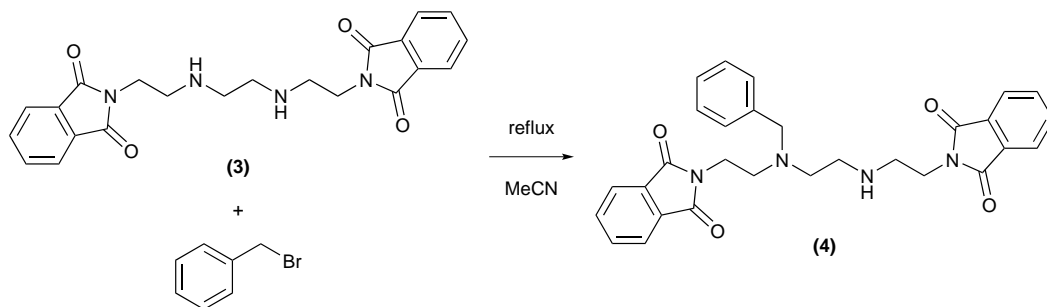
Charakterizácia látky (**3**):

MS (+): 430,9 ([M+Na]⁺ teor. 429,2)

¹H NMR (600,2 MHz, CD₃OD): δ = 3,79 (t, 4H, ³J_{HH} = 4,8 Hz, N-CH₂-CH₂); 3,94 (t, 4H, ³J_{HH} = 4,8 Hz, CH₂-CH₂-NH); 4,02 (s, 4H, NH-CH₂-CH₂-NH); 7,82 (m, 4H, arom.); 7,83 (m, 4H, arom.)

¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, CD₃OD): δ = 36,1 (s, 2C, CH₂-CH₂-NH); 46,7 (s, 2C, N-CH₂-CH₂); 48,7 (s, 2C, NH-CH₂-CH₂-NH); 124,6 (s, 4C, arom.), 133,2 (s, 4C, arom. C-C-N); 135,8 (s, 4C, arom.); 169,7 (s, 4C, C-C-N)

2.5.2 Príprava látky (4)



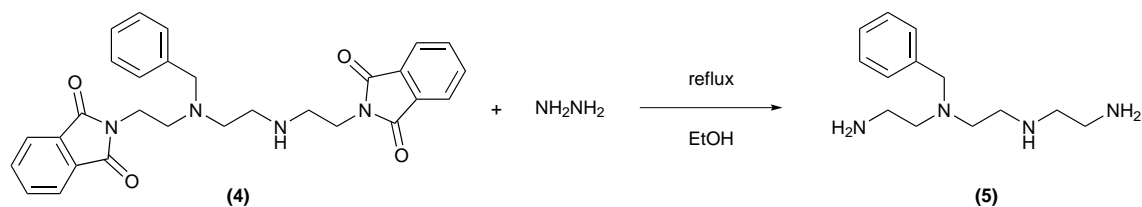
Do 500ml guľatej banky s 250 ml acetonitrilu bolo navážených 4,78 g (10 mmol) hydrochloridu látky **(3)** spolu s 4,14 g (30 mmol) uhličitanu draselného a 1,71 g (10 mmol) benzylbromidu. Banka bola umiestnená do olejového kúpeľa o teplote 105 °C, na banku bol nasadený spätný chladič a sušiacia trubička naplnená hydroxidom sodným. Za stáleho miešania bola zmes ponechaná k reakcii cez noc.

Na druhý deň bolo rozpúšťadlo odparené na RVO. K odparku bolo pridaných 100 ml vody a zmes bola extrahovaná 80 a 2×50 ml dichlórmetánu. Extrakt bol sušený prídavkom bezvodného síranu sodného, ktorý bol pridávaný do úplného vyčistenia roztoku. Zmes bola prefiltrovaná cez fritu S4 a filtrát bol odparený na RVO. Bolo získaných 7,02 g oleja žltej farby. Táto zmes obsahujúca látku **(4)** nebola čistená a rovno ako surová zmes bola použitá v ďalšom kroku syntézy^[20].

Charakterizácia látky **(4)**:

MS (+): 537,4 ($[M+K]^+$ teor. 535,2)

2.5.3 Príprava látky (5)



Zmes z predošlého kroku (7,02 g) bola rozpustená v 250 ml etanolu v 500ml guľatej banke. K zmesi bolo pridaných 20 ml 65% roztoku hydrazín monohydrátu. Banka bola umiestnená do olejového kúpeľa o teplote 95 °C, na banku bol nasadený spätný chladič a sušiacia trubička naplnená hydroxidom sodným. Za stáleho miešania bola zmes ponechaná k reakcii 40 h.

Po ochladení bol od zmesi na frite S4 odfiltrovaný vyžrážaný ftalhydrazid. Filtrát bol odparený na RVO, po pridaní malého množstva etanolu sa v ňom opakovane vyžrážal ftalhydrazid. Odfiltrovanie a odparenie etanolu prebehlo ešte dvakrát, až pokiaľ roztok po pridaní etanolu neobsahoval žiadne pevné častice^[20].

Zmes bola čistená stĺpcovou chromatografiou (170 ml silikagélu). Na úvod bolo použitých 800 ml etanolu, 400 ml zmesi etanol:amoniak (3:1) a 300 ml zmesi etanol:amoniak (1:1). Bolo získaných 1,36 g slabožltého oleja látky 2bn-trien (**5**) (výťažok 32 % oproti navážke látky (**1**)). Do banky s produktom bola na záver pridaný nadbytok zriedenej kyseliny chlorovodíkovej, ktorá bola odparená na RVO (rovnako ako u látky (**2**) za účelom zamedzenia degradácie produktu na vzduchu). Aj po odparení kyseliny produkt ostal vo forme oleja.

Charakterizácia látky (**5**):

TLC: EtOH:NH₃ (3:1), $R_f = 0,18$ (ninhydrín: fialová škvrna)

MS (+): 236,9 ($[M+H]^+$ teor. 237,2)

¹H NMR (299,9 MHz, CD₃OD): $\delta = 2,61\text{--}2,86$ (m, 12H, CH₂–CH₂); 3,66 (s, 2H, C–CH₂–NH), 7,24–7,38 (m, 5H, arom.)

¹³C{¹H} NMR (150,9 MHz, CD₃OD): $\delta = 35,4$ (s, 1C, NH₂–CH₂–CH₂–N); 36,9 (s, 1C, NH–CH₂–CH₂–NH₂); 43,2 (s, 1C, N–CH₂–CH₂–NH); 46,1 (s, 1C, NH–CH₂–CH₂–NH₂); 50,2 (s, 1C, N–CH₂–CH₂–NH); 50,9 (s, 1C, N–CH₂–CH₂–NH₂); 60,1 (s, 1C, C–CH₂–N); 130,7 (s, 2C, arom.); 131,7 (s, 1C, arom.); 132,9 (s, 2C, arom.); 134,6 (s, 1C, arom. C–CH₂)

2.6 Meranie disociačných kinetík

Na meranie disociačných kinetík komplexov medi s pripravenými ligandami boli pripravené dve sústavy štandardných roztokov.

Pre sústavu chlorid draselný – kyselina chlorovodíková ol pripravený 1,0M roztok chloridu draselného (7,45 g KCl, 100ml odmerná banka). Ďalej boli pripravené 1,0M roztok kyseliny chlorovodíkovej (2,60 ml 35% HCl, 25ml odmerná banka) a 0,1M roztok kyseliny chlorovodíkovej (1,04 ml 35% HCl, 100ml odmerná banka). 0,01M roztok kyseliny chlorovodíkovej bol pripravený 10× riedením 0,1M roztoku.

K roztoku dihydrátu chloridu meďnatého (16,9 mg CuCl₂ · 2H₂O, 10ml odmerná banka) bol pridávaný po malých dávkach ligand až do úplného rozpustenia zrazeniny hydroxidu meďnatého pri zachovávaní zásaditého pH (korekcia 5% roztokom hydroxidu draselného, pripraveného rozpustením 5,00 g KOH v 95 ml vody). Doplnením tohoto roztoku v odmernej banke na 10 ml bol pripravený

10mM roztok $[\text{Cu}(\text{1bn-trien})]^{2+}$, v resp. $[\text{Cu}(\text{2bn-trien})]^{2+}$. Komplexácia bola veľmi rýchla, bola pozorovaná rýchla zmena farby hneď po úprave pH. Na meranie bol pripravený 2mM roztok komplexov v 1,0M roztoku chloridu draselného riedením 2 ml 10mM roztoku (0,7456 g KCl, 10ml odmerná banka).

Pre sústavu chloristan sodný – kyselina chloristá bol pripravený 1,0M roztok chloristanu sodného (14,05 g $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100ml odmerná banka). Pripravená bola aj 0,1M kyselina chloristá (0,86 ml 70% HClO_4 , 100ml odmerná banka) a jej $10\times$ riedením 0,01M kyselina chloristá.

Podobne ako v prvej sústave boli pripravené 10mM roztoky komplexov (korekcia pH 5% roztokom hydroxidu sodného, pripraveného rozpustením 5,00 g NaOH v 95 ml vody) a 2mM roztok komplexov v 1,0M roztoku chloristanu sodného (2 ml 10mM roztoku komplexov, 1,4046 g $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10ml odmerná banka).

Meranie bolo vykonané v kremencových kyvetách. Objem meranej zmesi bol 1 ml, z čoho 100 μl tvoril 2mM roztok komplexu a 900 μl tvorila kombinácia kyseliny a odpovedajúcej soli (zaisťujúcej konštantnú iónovú silu) v rôznych pomeroch. Zmes kyseliny a soli bola temperovaná v karuseli spektrofotometru. Po vytemperovaní na požadovanú teplotu bolo pridaných 100 μl roztoku komplexu, obsah kyvety bol premiešaný prevrátením kyvety. Po zasunutí kyvety do spektrometru bolo spustené meranie závislosti absorpcie na čase. Priebeh jednotlivých meraní je zaznamenaný vo výsledkoch a diskusii.

2.7 Sledovanie NMR chemických posunov v závislosti na pH

Pre účely stanovenia protonizačných konštánt pK_a oboch ligandov boli pripravené NMR vzorky obsahujúce 30 mg ligandu, 0,1 ml D_2O a 0,35 ml H_2O . Korekcia pH prebiehala prídavkami 1 – 10 μl 20% hydroxidu draselného (10,0 g KOH rozpustených v 40 ml vody), 5% hydroxidu draselného (5,00 g KOH rozpustených v 95 ml vody) a 1% roztoku hydroxidu draselného (1,00 g KOH v 99 ml vody). Namerané spektrá boli referencované na etanol (t, $\delta_{\text{H}} = 1,17$). Merané boli vodíkové spektra na prístroji VNMR300. Priebeh je zaznamenaný vo výsledkoch.

3. Výsledky a diskusia

3.1 Syntéza látky (2)

Podarilo sa pripraviť žiadanú látku v dobrej kvalite. Vo forme voľnej bázy je látka bezfarebný olej rozpustný vo vode aj organických rozpúšťadlách. Vo forme hydrochloridu umožňuje jednoduchú manipuláciu, ale je rozpustná iba vo vode. Látka (1) bola využívaná vo forme x-hydrátu a reálny podiel východzej látky (1) v navážke je okolo 65 % (zistené NMR meraním látky v dimetylsulfoxide, z pomerov integrálnej intenzity vodíkov amínu a vodíkov vody). Pre tento dôvod bola upravená (znížená) aj navážka východzieho benzaldehydu, aby nedochádzalo k tvorbe dibenzylovaného tetraamínu na oboch primárnych amínových skupinách ako majoritného produktu. Pri výpočte výťažku s odhadovaným 65% zastúpením látky (1) dospejeme k výťažku 75 %.

Pri syntéze je potrebné, aby pri pridávaní borohydridu sodného teplota neprekračovala stanovenú hodnotu 10 °C. Rovnováha medzi Schiffovou bázou a samostatnými reaktantami je pri tejto teplote posunutá v prospech Schiffovej bázy. Za laboratórnej teploty je rovnováha pravdepodobne posunutá v prospech samostatných reaktantov. Pri postupe bez chladenia reakčnej zmesi bolo získané minimum produktu, zmes ale obsahovala veľké množstvo benzylalkoholu, ktorý vznikol z benzaldehydu redukciami borohydridom sodným.

3.2 Syntéza látky (5)

Syntéza tejto látky bola vykonávaná podľa upravených návodov na benzyláciu sekundárnej aminoskupiny dietyléntriáminu (1,4,7-triázaheptán). Žiadaný produkt (5) bol získaný vo výťažku 32 % (analogickým prepočtom ako u látky (2)). Pripravená látka je hydrofilný slabožltý olej rozpustný vo vode, menej v organických rozpúšťadlách (pre väčší obsah vody). Vo forme voľného amínu na vzduchu podlieha degradácii (tmavnutie produktu). V podobe hydrochloridu látka neprechádza do kryštalickej podoby, ostáva v podobe oleja. Je rozpustná vo vode, obmedzene v metanole či etanole.

3.2.1 Príprava látky (3) z (1)

Pri syntéze látky (3) z látky (1) bol vyskúšaný spôsob s použitím chloroformu ako rozpúšťadla^[21]. Keďže látka (1) bola použitá v podobe kryštalického hydrá-

tu, tento spôsob sa nepreukázal ako vhodný pre jej vysokú hydrofilnosť. Aj pri zahriatí na teplotu refluxu došlo k minimálnemu rozpusteniu látky (**1**), ktorá v reakčnej zmesi plávala v podobe pevných zhlukov.

Reakcia chránenia primárnych aminoskupín prebiehala použitím 99% kyseliny octovej ako rozpúšťadla. Pre vysoký obsah vody v x-hydráte látky (**1**) čiastočne dochádzalo k hydrolýze pridaného ftalanhydridu na kyselinu ftalovú. Pri vysokom nadbytku ftalanhydridu (1,5 ekvivalentu) dochádzalo okrem tvorby látky (**3**) najmä k tvorbe bisftaloylimidu-ftalamidu (látka (**3'**), pozorované vysokým výskytom danej hmoty pri MS aj integrálnym súčtom vodíkových signálov aromatickej oblasti pri NMR). Veľký nadbytok ftalanhydridu bol vyhodnotený ako nevyhovujúci a reakcia bola opakovaná s navážením 1,2 a 0,8 ekvivalentov ftalanhydridu.

Kratší analóg látky (**3**) pripravený z dietylentriamínu sa po odparení kyseliny octovej získava rekryštalizáciou z etanolu. Látka (**3**) z etanolu nevykryštalizovala ani viacnásobným zahriatím zmesi k varu a ochladením (na rozdiel od látky (**3'**), ktorá vykryštalizovať dokázala). Pre oddelenie žiadanej látky bolo navrhnuté vyžrážanie kyselinou chlorovodíkovou a triturácia iným rozpúšťadlom (preferencia kryštalizácie symetrických látok). Tento postup sa s použitím izopropanolu ukázal ako vhodný, kde vyžrážaná látka bola minimálne rozpustná. Pri tomto kroku sa preukázala ako vhodná zmes pripravená reakciou so 1,2 ekvivalentami ftalanhydridu. Produkty zmesi s 0,8 ekvivalentom ftalanhydridu boli čiastočne lepiivé oleje (pravdepodobne ftalimidy iba na jednej primárnej aminoskupine), ktoré znemožňovali odfiltrovanie izopropanolu a premývanie produktu na frite.

Získaný bol pevný produkt hydrochloridu jemne ružovej farby, ktorý umožňoval pohodlnú manipuláciu. Pre účely navážky v ďalšej reakcii boli predpokladané 2 molekuly kyseliny chlorovodíkovej v kryštáloch látky (**3**).

3.2.2 Príprava látky (**4**) z (**3**)

Pri reakcii bol použitý nadbytok uhličitanu draselného, ktorý uvažoval 2 molekuly chlorovodíku na jednu molekulu látky (**3**). Spolu so vznikajúcim jedným ekvivalentom bromovodíku boli použité tri ekvivalenty oproti navážke látky (**3**).

Zmes produktov nebola čistená z dôvodu množstva materiálu, čo by vyžadovalo kolónu s väčším objemom a z toho vyplývajúci aj vyššou spotrebou rozpúšťadiel. Druhý dôvod je potenciálna (čiastočná alebo úplná) hydrolýza ftalimidových skupín, ktorá by ovplyvňovala následnú reakciu deprotektie. Bola navrhnutá separácia a čistenie produktov až po deprotekcii primárnych skupín hydrazínom.

3.2.3 Príprava látky (5) z látky (4)

Reakcia deprotektie hydrazínom je vysoko selektívna a vzniknutý vedľajší produkt ftalhydrazid, ktorý je obmedzene rozpustný v etanole, je možné pohodlne odfiltrovať alebo odstrániť od zmesi pri čistení na silikagéle.

Pri finálnom čistení produktov je potrebné čo najdôkladnejšie odstránenie ftalhydrazidu z reakčnej zmesi. Nanesením pevného ftalhydrazidu na kolónu (alebo jeho následným vyzrážaním) by došlo k jeho postupnému rozpúšťaniu do elučnej zmesi. Rozpustený ftalhydrazid má vyšší retenčný faktor ako produkt ($R_f = 0,40$ (EtOH:NH₃ 3:1), ninhydrín: žltá škvrna) a z kolóny je pri plnom rozpustení vyplavený pred žiadaným produktom.

Používaním bázičkej elučnej zmesi (EtOH:NH₃) je aj produkt (5) získaný vo forme voľného amínu, ktorá umožňuje oxidáciu vzdušným kyslíkom a následnú degradáciu produktu. Je vhodné látku previesť do protonizovanej formy odparením s chlorovodíkom. V opačnom prípade produkt v priebehu dní získava tmavočervenú až hnedú farbu.

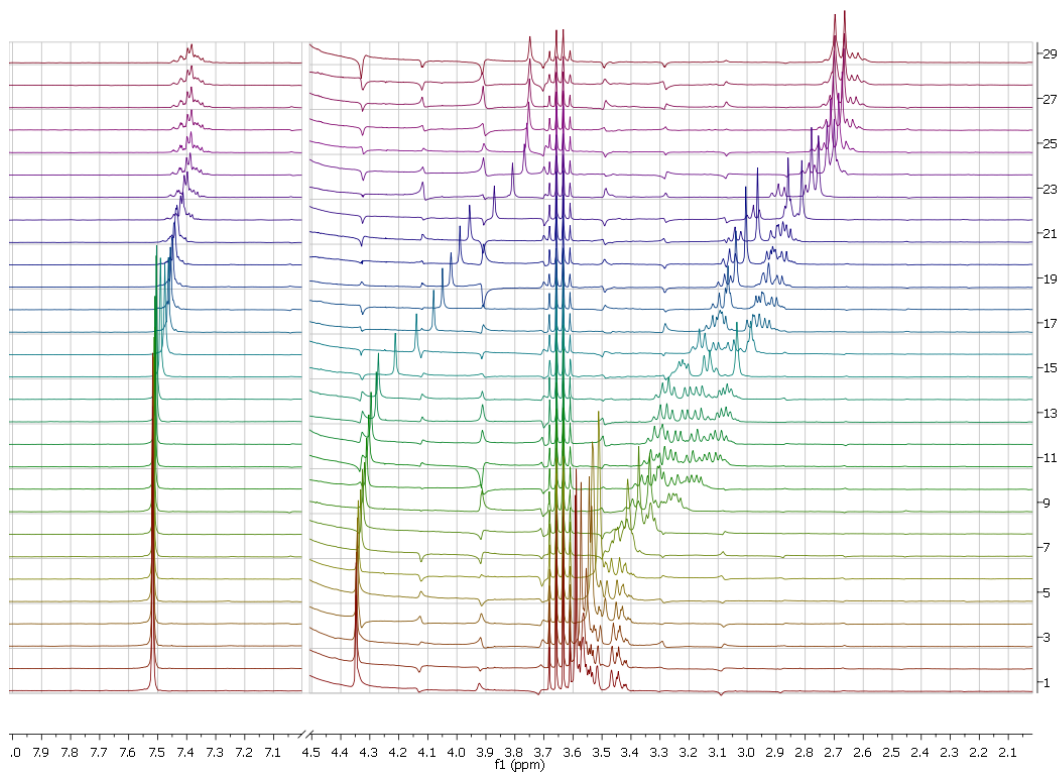
3.3 Výpočet protonizačných konštánt

Protonizačné konštanty ligandov sú potrebné pre stanovenie rýchlostných konštánt formačných a disociačných kinetík a konštánt stability komplexov. NMR meraním vzoriek o rôznych hodnotách pH boli získané nasledujúce dáta (Obr. 3.1 a 3.2).

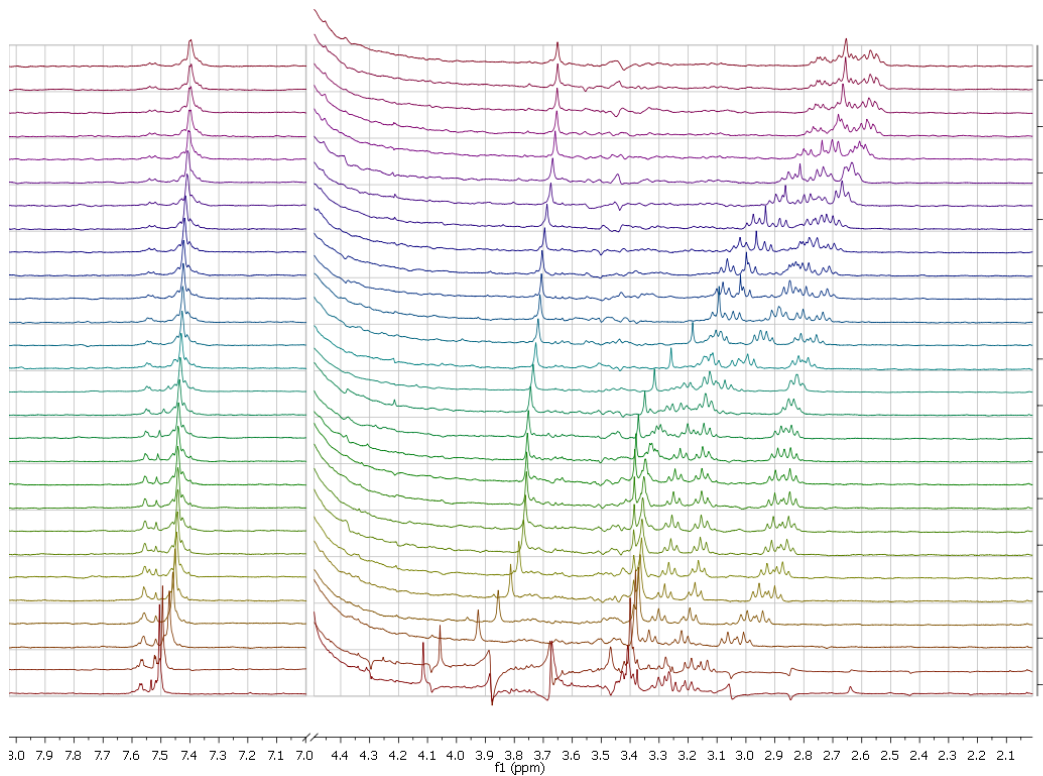
Rozdiel medzi pH po sebe nasledujúcich meraných vzoriek je v rozmedzí 0,30 až 0,50. Na základe chemických posunov najmä singletu benzylovej skupiny a signálov aromatickej oblasti (alifatická oblasť bola najmä u látky (2) neprehľadná) boli výpočtami získané hodnoty troch protonizačných konštánt ligandu (2) a štyroch ligandu (5) (Tab. 3.1).

Tabuľka 3.1: Protonizačné konštanty látok (1)^[18], (2) a (5)

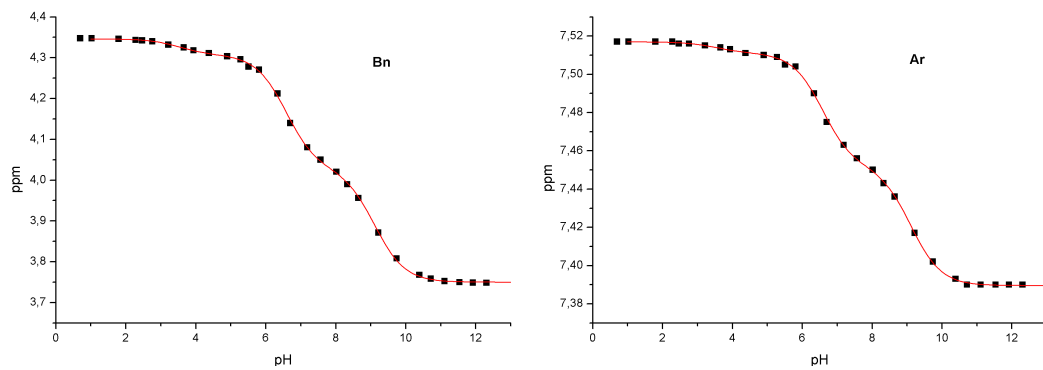
	(1)	(2)	(5)
pK_{a1}	3,27	3,53	2,03
pK_{a2}	6,58	6,58	6,45
pK_{a3}	9,07	9,11	7,13
pK_{a4}	9,75		9,90



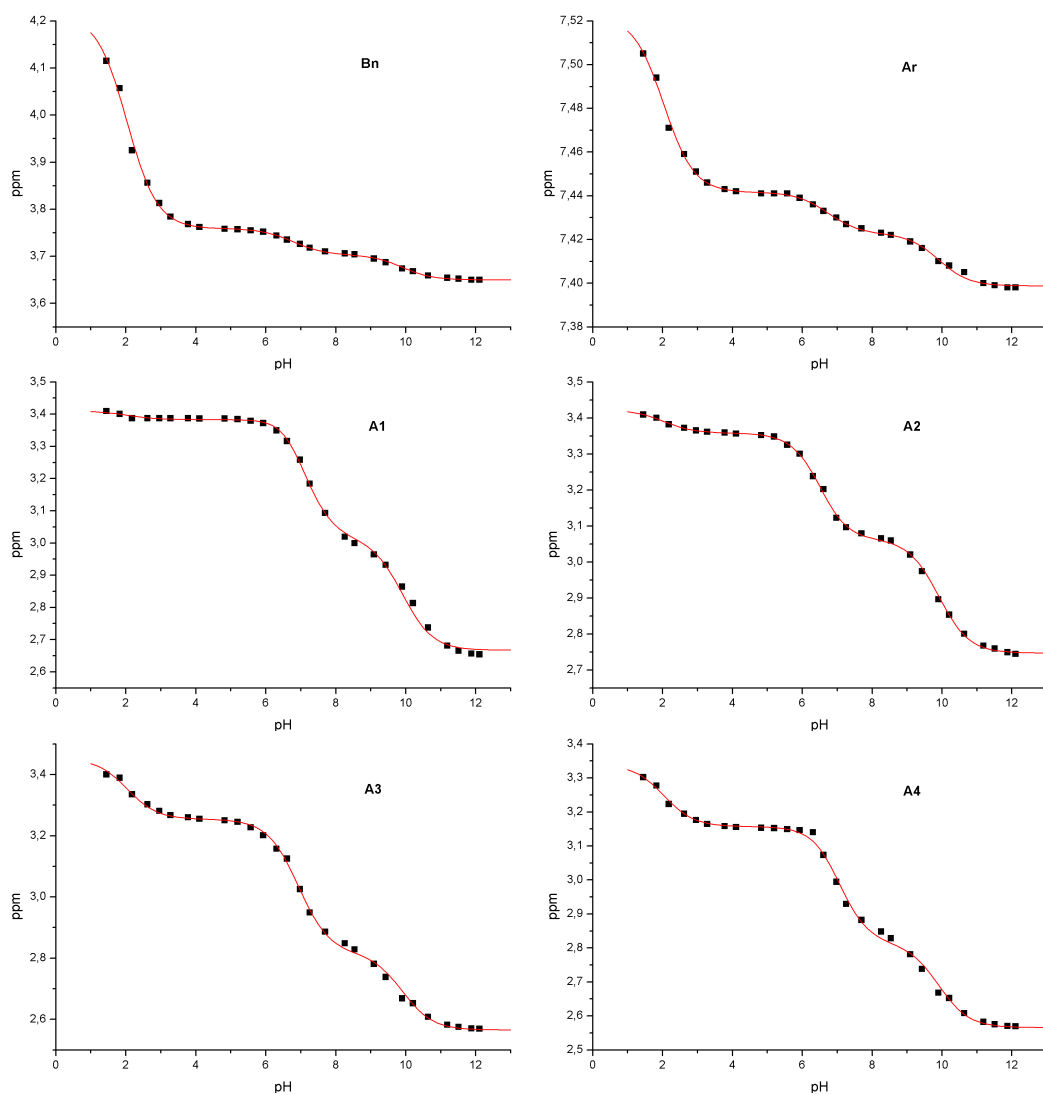
Obr. 3.1: Závislost chemických posunov na pH, ligand (2)



Obr. 3.2: Závislost chemických posunov na pH, ligand (5)



Obr. 3.3: Závislosť chemických posunov na pH benzylovej skupiny (**Bn**) a aromatickej oblasti (**Ar**) ligandu (**2**)



Obr. 3.4: Závislosť chemických posunov na pH benzylovej skupiny (**Bn**), aromatickej oblasti (**Ar**) a alifatickej oblasti (**A1 – A4**) ligandu (**5**)

Výpočet štvrtej protonizačnej konštanty ligandu (**2**) nie je možný pre neprehľadnú alifatickú oblasť. Spoľahlivo je možné sledovať iba singlet benzyly. Analýzou chemických posunov tejto skupiny v závislosti na pH je možné získať iba 3 protonizačné konštanty. Analogicky s východnou látkou a ligandom (**5**) je chýbajúca protonizačná konštantá očakávaná v neutrálnej či bázičkej oblasti v rozmedzí pH 7 – 10. Namerané chemické posuny aromatickej oblasti, vodíkov benzylovej skupiny a v prípade ligandu (**5**) čiastočne aj alifatickej oblasti sú na Obr. 3.3 a 3.4. Hodnoty boli následne preložené teoretickými hodnotami chemických posunov v závislosti na získaných pK_a .

Pre presnejšie stanovenie protonizačných konštant bude potrebné vykonať potenciometrické titrácie oboch ligandov.

3.4 Meranie disociačných kinetík

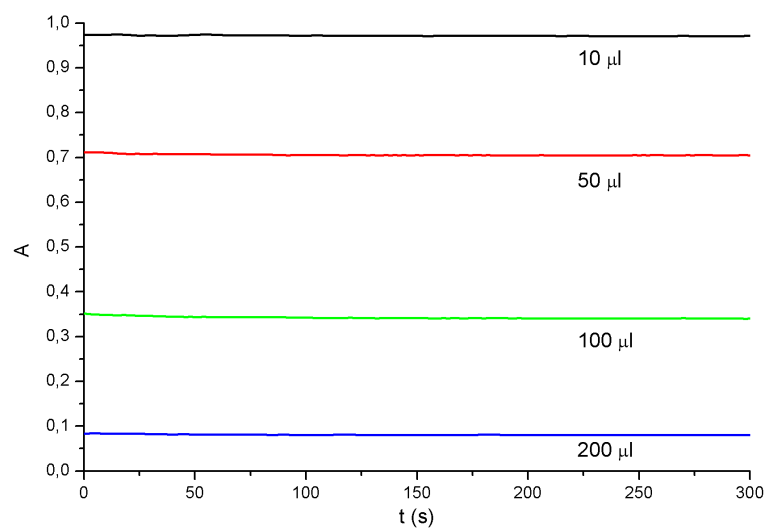
Prídavky odmerného roztoku komplexu (2 mM) do meracej kyvety boli volené tak, aby absorbanca v maxime CT-pásmu komplexu (265 nm) bola v rozmedzí 0,8 – 1,0 (výsledná koncentrácia medi bola cca 0,2 mM).

Sústava chlorid draselný – kyselina chlorovodíková bola preukázaná ako nevhodná pre tvorbu komplexu tetrachloridomeďnatanu, ktorého CT-pás prekrýval sledovanú ultrafialovú oblasť. Z tohoto dôvodu bola použitá sústava (H,Na)ClO₄.

Boli vykonané merania absorbancie roztokov obsahujúcich 10 - 500 μ l 0,01M kyseliny chloristej. Nezávisle na jej koncentrácii nebolo možné zachytiť disociáciu komplexu. Pri koncentrácii kyseliny 10^{-4} M (10 μ l 0,01M kyseliny chloristej), ktorá odpovedá približne pH = 4, disociácia neprebehla (podľa distribúcie komplexu medi s látkou (**1**) na Obr. 1.3 je pri pH = 4 rovnováha takmer výlučne v prospech komplexu a u komplexov medi s ligandami (**2**) a (**5**) je možné očakávať podobné správanie). Pri ostatných koncentráciách bola disociácia príliš rýchla na pozorovanie štandardným UV-Vis spektrofotometrom. Medzi pridaním roztoku komplexu a spustením merania ubehlo príliš mnoho času. Prejavovalo sa to pozorovaním konštantnej hodnoty absorbancie. Táto hodnota závisela na množstve pridanej kyseliny - so zvyšujúcou sa koncentráciou klesala (Obr. 3.5) a výsledné hodnoty absorbancie približne odpovedajú jednotlivým rovnováham komplexu podľa distribučného diagramu na Obr. 1.3.

Z daných meraní vyplýva, že komplex v kyslej oblasti disociuje veľmi rýchlo, čo je pre zamýšľanú separáciu medi od iných prvkov výhodné. Pre presnejšie meranie disociačných (aj formačných) kinetík ligandov s lineárnym skeletom by bolo potrebné využiť stopped-flow spektrofotometer, ktorý je schopný merať ab-

sorbancie roztoku od momentu zmiešania jednotlivých zložiek.



Obr. 3.5: Závislosť absorbancie na čase pre koncentráciu kyseliny 10^{-4} M, $5 \cdot 10^{-4}$ M, 10^{-3} M a $2 \cdot 10^{-3}$ M komplexu medi s ligandom (2)

Záver

V rámci tejto bakalárskej práce boli pripravené nové ligandy **(2)** a **(5)**, ktoré tvoria komplexy s dvojmocnými kationmi medi. Tieto látky doteraz ako ligandy neboli používané (iba ako prekursorzy pre tvorbu väčších makrocyclických zlúčenín). NMR meraním boli zistené 4 protonizačné konštanty ligandu **(5)** a 3 ligandu **(2)**, kde jednu konštantu nie je možné získať z nameraných dát. Bolo pozorované, že komplexácia medi je veľmi rýchla a disociácia komplexu v kyslom prostredí 10^{-3} – 10^{-2} M HClO₄ je takisto veľmi rýchla.

K ďalšej práci s týmito ligandami patrí presné stanovenie protonizačných konštant potenciometrickou titráciou. Sledovanie formačných a disociačných kinetík komplexov by malo byť uskutočniteľné pomocou stopped-flow spektrofotometru. Po zistení selektivity jednotlivých ligandov nasleduje ich bifunkciovatelnosť – tvorba analogických zlúčenín, ale s benzylovými skupinami obsahujúcimi ďalšie aktívne skupiny (alkíny, alkény či azidy). Tieto skupiny by umožňovali naviazanie ligandov na polymérny nosič a tvorbu separačného iónomeniču.

Zoznam použitých skratiek

1bn-trien	1-benzyl-1,4,7,10-tetraázadekán
2bn-trien	4-benzyl-1,4,7,10-tetraázadekán
AcOH	kyselina octová
CT	počítačová tomografia – Computed Tomography
cyklám	1,4,8,11-tetraázacyklotetradekán
cyklén	1,4,7,10-tetraázacyklododekán
EtOH	etanol
MeCN	acetonitril
MS	hmotnostná spektrometria – Mass Spectroscopy
NMR	nukleárna magnetická rezonancia – Nuclear Magnetic Resonance
p. a.	per analysis
PET	pozitrónová emisná tomografia – Positron Emission Tomography
ppm	parts per million
RTG	Röntgen
RVO	rotačná vákuová odparka
SPECT	jednofotónová emisná počítačová tomografia – Single Photon Emission Computed Tomography
TLC	tenkovrstvová chromatografia – Thin Layer Chromatography
TMS	tetrametylsilan
trien	trietyléntetraamín – 1,4,7,10-tetraázadekán

Zoznam použitej literatúry

- [1] V. Ullman, *AstroNuklFyzika*, [online], [cit. 2015-05-05], <http://astronuklfyzika.cz/>.
- [2] W. Loveland, D. J. Morrissey, G. T. Seaborg, *Modern Nuclear Chemistry*, Wiley-Interscience, New Jersey, **2006**, 113 – 121, 617 – 639.
- [3] M. Paúrová, Diplomová práce, *Bifunkční chelatanty pro selektivní komplexaci mědi*, PŘF UK, Praha, **2012**, 8 – 17.
- [4] S. V. Smith, *J. Inor. Bioch.*, **2004**, 98, 1874 – 1901.
- [5] C. J. Anderson, M. J. Welch, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2219 – 2234.
- [6] J. Ďurkovský, E. Bolješiková, *Rádioterapia zhubných nádorov*, Liga proti rakovine SR, Bratislava, **2008**, 5 – 18.
- [7] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemie prvků*, Informatorium, Praha, **1993**, 1455 – 1487.
- [8] J. Gažo a kol., *Všeobecná a anorganická chémia*, 3. Vydanie, Alfa, Bratislava, **1981**, 669 – 684.
- [9] F. Kašpárek, R. Pastorek, Z. Šindelář, F. Březina, *Anorganická chemie*, UPOL PŘF, **2001**, 363 – 371.
- [10] Lawrence Berkeley National Laboratory, *Isotopes Project, LBL*, [online], [cit. 2015-05-08], http://ie.lbl.gov/education/parent/Cu_iso.htm/.
- [11] P. J. Blower, J. S. Lewis, J. Zweit, *Nucl. Med. Biol.*, **1996**, 23, 957 – 980.
- [12] F. F. Dyer, G. H. Leddicotte, *The radiochemistry of copper*, National Academy of Science, National Research Council, Washington D. C., USA, **1961**, [online], [cit. 2015-05-08], <http://library.lanl.gov/cgi-bin/getfile?rc000048.pdf>.
- [13] X. Fan, D. J. Parker, M. D. Smith, A. Ingram, Z. Yang, J. P. K. Seville, *Nucl. Med. Biol.*, **2006**, 33, 939 – 944.
- [14] J. Kotek, Habilitační práce, *Komplexy dvojmocné mědi s makrocyclickými ligandy*, PŘF UK, Praha, **2009**, 14 – 17.
- [15] S. J. Lincoln, *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, 166, 255 – 289.

- [16] C. J. Mathias, S. R. Bergmann, M. A. Green, *Nucl. Med. Biol.*, **1994**, *36*, 1451 – 1455.
- [17] J. L. J. Dearling, J. S. Lewis, G. E. D. Mullen, M. J. Welch, P. J. Blower, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**, *7*, 249 – 259.
- [18] A. E. Martell, R. M. Smith, R. J. Motekaitis, *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version 7*, Texas A&M University, College Station, Texas, USA.
- [19] D. Burdinski, J. Lub, J. A. Pikkemaat, D. Moreno Jalón, S. Martial, C. Del Pozo Ochoa, *Dalton Trans.*, **2008**, 4138 – 4151.
- [20] C. Miranda, F. Escarti, L. Lamarque, M. Y. R. Yunta, P. Navarro, E. García-España, M. L. Jimeno, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 823 – 833.
- [21] S. Teramae, T. Osako, S. Nagatomo, T. Kitagawa, S. Fukuzumi, S. Itoh, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2004**, *98*, 746 – 757.