

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra anorganické chemie

**PREKURZORY PRO SYNTÉZU POLYDENTÁTNÍCH LIGANDŮ
SPOJENÝCH PŘES FOSFINÁTOVÝ MŮSTEK**

**PRECURSORS FOR SYNTHESIS OF POLYDENTATE LIGANDS
BRIDGED BY PHOSPHINATE**

Bakalářská práce
studijního oboru Chemie v přírodních vědách

Praha 2009

Vlastimil Souček

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM 0021620857
Nové molekulové systémy pro pokročilé aplikace prospěšné pro zdraví a šetrné k životnímu prostředí.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele
RNDr. Jana Kotka, Ph.D., a všechny použité prameny jsem řádně citoval v seznamu literatury.
Jsem si vědom toho, že případné použití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu
v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, srpen 2009

Obsah

1	Úvod.....	4
2	Teoretická část.....	4
2.1	Radiofarmaka	4
2.2	MRI	7
2.3	Cíl práce	10
3	Experimentální část.....	12
3.1	Seznam použitých chemikálií.....	12
3.2	Metody charakterizace	12
3.2.1	NMR spektrometrie.....	12
3.2.2	Hmotnostní spektrometrie (MS).....	12
3.2.3	Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	12
3.3	Syntetická část.....	12
3.3.1	Příprava kyseliny hydroxymethylfosfinové	12
3.3.2	Příprava Et ₃ do ₃ a.....	13
3.3.3	Příprava H ₃ do ₃ a	14
3.3.4	Pokus o přípravu Et ₃ do ₃ ap ^H	14
3.3.5	Příprava H ₄ do ₃ ap ^H	16
3.3.6	Pokusy o modelové substituce vazby P–H.....	17
4	Výsledky a diskuze.....	20
5	Závěr a shrnutí.....	21
6	Seznam zkratk	22
7	Seznam použité literatury.....	23

1 Úvod

Můstkované polydentátní ligandy schopné vázat několik kovových iontů jsou v současné době relativně málo prozkoumány. Sloučeniny, které byly navrženy a jejichž syntéza byla v rámci této bakalářské práce zkoumána, jsou založeny na 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu (cyklen). Cyklen má významné koordinační vlastnosti; jeho deriváty jsou vhodnými ligandy především pro koordinaci lanthanoidů, aktinoidů a iontu Pb^{2+} .

Koordinační vlastnosti polydentátních ligandů mohou být velice důležité pro praktické uplatnění komplexů v odvětví, kterému je v této době věnována velká pozornost – v medicíně. Jedná se především o metodu tomografie magnetické resonance (MRI, magnetic resonance imaging), a také o neméně důležitou pozici komplexů v radiodiagnostice a léčebných metodách s ní spojených. V následující části budou přiblíženy principy těchto metod a úlohy komplexů v nich.

2 Teoretická část

2.1 *Radiofarmaka*

Nejstarší formou využívání radiace o vysoké energii v medicíně je používání rentgenového záření. Radiace s krátkou vlnovou délkou (v řádech nanometrů) se dá detekovat pomocí desky nebo papíru, opatřené(ho) citlivou vrstvou. V dnešní době se používá modernější metoda, kde souprava elektronických detektorů dokáže z příslušných dat vytvořit trojrozměrný obraz studovaného předmětu. Tato metoda se nazývá počítačová tomografie (CT, computed tomography). Naneštěstí tato metoda neumožňuje vysoké rozlišení měkkých tkání a proto se věda zabývala vývojem postupů, které by toto umožnily.^[1,2]

Jedná se především o metody, které využívají umístění zdroje záření přímo do objektu a za použití detektorů zmíněných výše lze s vysokou přesností určit místo vzniku emise. Tímto způsobem lze získat lepší rozlišení než v případě CT. Pro tyto účely se používá izotopů produkujících γ -záření a metoda nese název jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT, single photon emission computed tomography). Rozlišení této metody se pohybuje okolo 1 cm^3 . Jinou metodou využití radioizotopů je metoda pozitronové emisní tomografie (PET, positron-emission tomography), kde hrají hlavní roli izotopy emitující pozitrony. Tyto pozitrony jsou okamžitě anihilovány s elektrony, čímž vznikají dva fotony o energii 511 keV , které se oba pohybují na jedné přímce, ale opačným směrem. Současná detekce obou fotonů umožňuje velice dobré určení místa vzniku a díky tomuto principu je rozlišení metody PET lepší, než je tomu u metody SPECT. Rozlišení metody PET se pohybuje okolo 1 mm^3 .

Výše zmíněné metody se používají v radiodiagnostice, ale záření má své využití i v léčebných procesech. Jako jeden z příkladů se dá uvést Leksellův gama nůž, který směřuje záření z vnějších

zdrojů do nádoru a tím ho ničí. Přední místo v terapii ale zaujímají vnitřní zdroje záření, tj. vhodné izotopy injektované do organismu. Pravděpodobně nejdůležitější vlastností těchto látek je krátká definovaná vzdálenost, kterou emitované částice v organismu urazí. Je tedy přirozené, že se velké oblibě těší látky emitující jádra hélia, tedy α -zářiče, nebo elektrony – β -zářiče, či γ -zářiče s emisí Augerových elektronů.

S výjimkou metody PET, ve které nachází využití radioizotopy lehčích prvků, jako jsou ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O a ^{18}F , se v ostatních metodách využívá jako zdroje záření kovových izotopů. Jejich použití je ale poměrně komplikované vzhledem k toxicitě naprosté většiny z nich. Proto se tímto problémem zabývá koordinační chemie, která má za úkol navázat tyto kovové ionty do vhodných komplexů, ze kterých se nebude během doby strávené v organismu koordinovaný atom uvolňovat. Pro tyto komplexy je důležité udržet požadovaný ion koordinovaný ve své struktuře, musí tedy vykazovat dostatečnou kinetickou inertnost, aby během jejich pohybu krevním řečištěm nedošlo k nahrazení zářiče některým jiným iontem přítomným v organismu (např. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , $\text{Fe}^{2+,3+}$) nebo aby nedošlo k transchelataci, kterou by mohly zapříčinit dobře komplexující látky (např. transferrin, aminokyseliny, peptidy, atd.), které jsou v tělních tekutinách také přítomny.

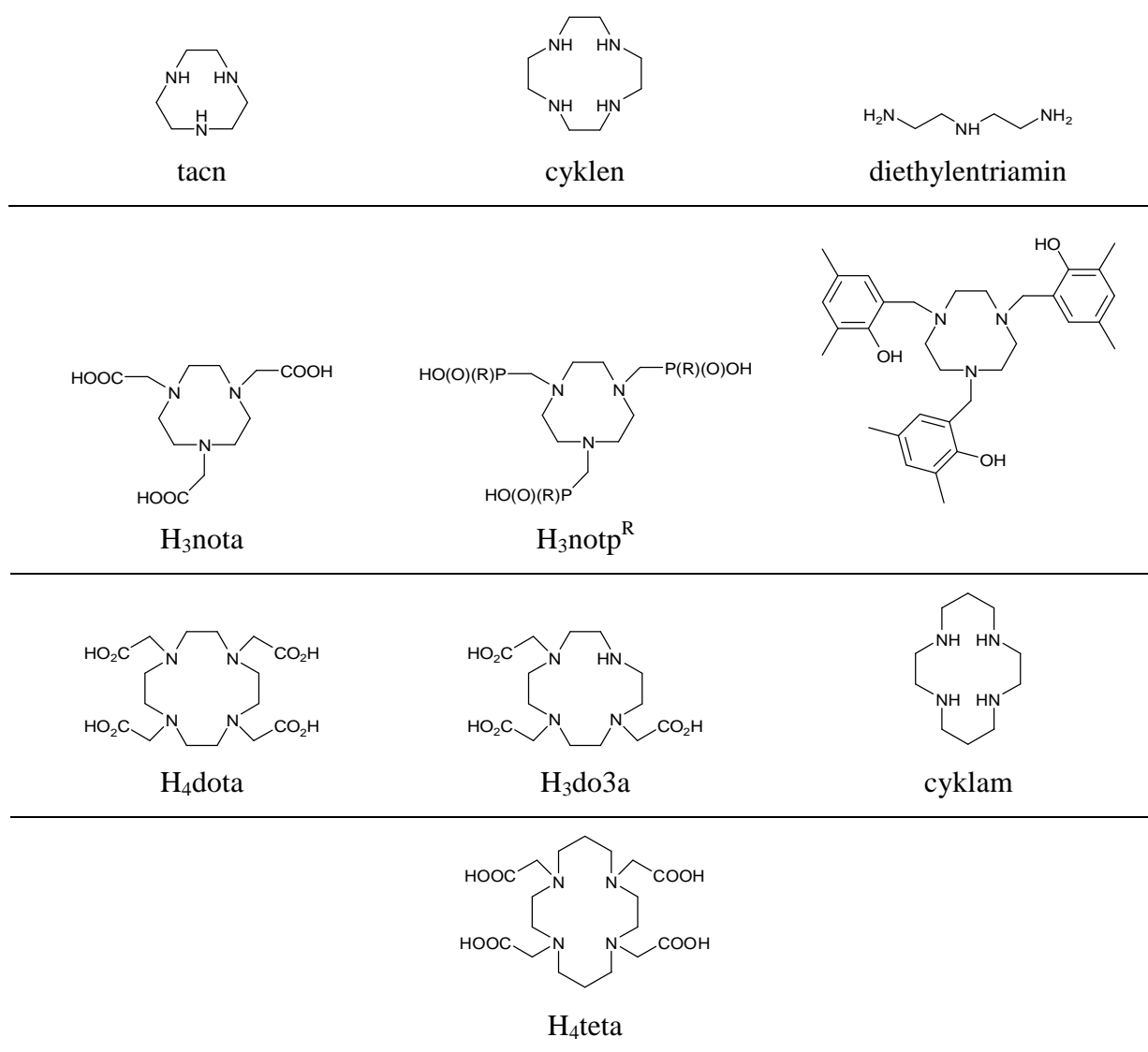
Dalším požadavkem, kladeným na ligand při radioterapiích, je vysoká selektivita pro používaný izotop. Některé izotopy se nedají získat snadno, tedy alespoň ne ve své čisté podobě, navíc se radiofarmaceutika běžně dodávají v sadách, ze kterých se samotná látka pro terapii připravuje smícháním ligandu a radioizotopu. Je tedy zřejmé, že vysoká selektivita je nutný požadavek pro zajištění vzniku námi požadovaného komplexu, stejně tak jako je důležitá vysoká rychlost komplexační reakce. Rychlost reakce je obzvláště důležitá v případě krátce žijících izotopů, kde by delší doba komplexace vedla ke snížení kvality zobrazení a také léčby. Výhodou je také, když je ligand schopen tvořit komplex s produktem radioaktivního rozpadu příslušného izotopu, takže se ani po uvolnění záření do organismu nedostávají škodlivé kovové ionty.

Pohyb takovýchto sloučenin v těle může být ovlivněn chemickými vlastnostmi ligandu. Důležitou roli zde hrají celkový náboj a tvar komplexu. Neutrální sloučeniny s hydrofobními skupinami jsou lipofilní a mohou se dostat skrz buněčné membrány. A naopak, nabitě molekuly s hydrofilními skupinami jsou většinou distribuovány v kapalinách mimo buňky. Selektivní distribuce radioizotopu v organismu se dá kontrolovat navázáním komplexu k nějaké biologicky aktivní sloučenině (cukr, peptid, protilátka, atd.), která pak reaguje s buněčnými receptory specifických látek.^[3-5] Ligandy používané pro takovéto účely se nazývají bifunkční. Jedna část ligandu slouží ke komplexaci kovového iontu, zatímco druhá část váže komplex k vybrané biologicky aktivní molekule. Většinou se vytvoří peptidová vazba pro kovalentní navázání bifunkčního komplexu k jiným sloučeninám, které se silně váží na určité buňky. Tímto se dá dosáhnout velice dobré lokalizace radiofarmak na požadovaném místě.

Izotopů používaných v radiomedicině je mnoho, přičemž ne všechny se dají použít v cílené radioterapii. Pro tyto metody se nevyužívají krátce žijící izotopy, tedy izotopy s poločasem rozpadu

v řádu minut. Ty se využívají například zobrazení toku krve po neselektivní distribuci v ní (to je třeba případ izotopu ^{82}Rb). Pro cílenou léčbu, a tedy tím i selektivní distribuci radioizotopů v těle, jsou nejvhodnější izotopy s poločasem rozpadu v řádu hodin. Pro diagnostické účely se využívá hlavně $^{99\text{m}}\text{Tc}$, pro terapii se využívají izotopy india, gallia, yttria, také se uvažuje o použití některých lanthanoidů a mědi.

Sloučeniny technecia jsou většinou založeny na fragmentech TcO^{3+} a TcO_2^+ , ale používají se i jiné oxidační stavy, než je pětimocné technecium. Ligandy svázané s techneciem jsou poměrně různorodé, vyskytují se mezi nimi například karbonyly, nitrily, fosfíny, Schiffovy báze, popřípadě *N,S*-polydentátní ligandy.



Obrázek 2.1

Základní struktury ligandů používaných v radiofarmacii.

Gallium a indium se v radiofarmacii používají v oxidačním stupni 3+. Jejich vodné komplexy snadno hydrolyzují, tudíž musí komplexace probíhat v kyselých roztocích, což klade ještě větší nároky na stabilitu komplexů. Navíc je jejich iontový poloměr poměrně blízký iontovému poloměru

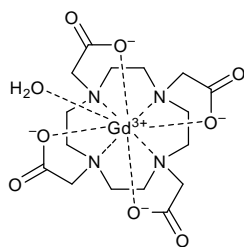
trojmocného železa (gallitý ion se liší jen o 3 pm, inditý ion o 15 pm)^[6] a důsledkem toho tvoří velice silné komplexy s přirozenými ligandy trojmocného železa, jako je například transferrin. Především kvůli těmto důvodům je žádoucí nalézt komplexy, které jsou extrémně stálé jak proti hydrolyze, tak vzhledem k transmetalacím, popřípadě transchelatacím reakcím. Mezi nejlepší ligandy, které splňují tyto podmínky, patří makrocyclické ligandy odvozené od 1,4,7-triazacyklononanu (ve zkratce tacn), který má využití v případě menšího trojmocného gallia, a deriváty již zmíněného 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu – cyclenu, které výborně komplexují větší inditý ion, přičemž ramena (tedy substituenty na atomech dusíku) mohou tvořit acetátové, alkoholové, popřípadě fenolátové skupiny. Obrázek 2.1. přibližuje některé z výše zmíněných struktur.

2.2 MRI^[7]

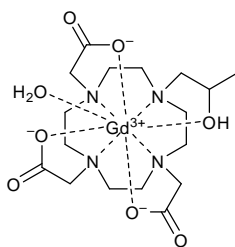
Metoda tomografie magnetické rezonance (MRI, magnetic resonance imaging) je založena na stejných principech jako spektroskopická metoda nukleární magnetická rezonance (NMR). Běžně měřenou veličinou při MRI vyšetření je intenzita signálu vodíkových jader v určité části prostoru. Protože je člověk složen z velké části z vody, vodíková jádra měřená pomocí MRI se téměř vždy nacházejí vázána ve vodě. Vzhledem k tomu, že je aplikováno gradientové magnetické pole umožňující získání mnoha signálů v jeden okamžik, je doba experimentu dosti krátká.

K dosažení lepšího rozlišení se používají takzvané kontrastní látky. Jedná se o paramagnetické sloučeniny, které zvyšují relaxační rychlosti, tj. zkracují relaxační časy T_1 a T_2 atomů ve svém okolí, což v případě MRI platí pro protony vody. Tím tedy pomáhají zvýšit kontrast mezi jednotlivými tkáněmi, například mezi různými orgány, nebo již odumřelými buňkami. V dnešní době se jako paramagnetické kontrastní látky používají především komplexy trojmocného gadolinia. Gadolinitý ion má maximální spinový moment, který je zajišťován sedmi nepárovými elektrony, a dlouhou elektronovou relaxační dobu T_{1e} , která je zapotřebí pro efektivní přenos magnetizace z kovového iontu na molekuly v jeho okolí.

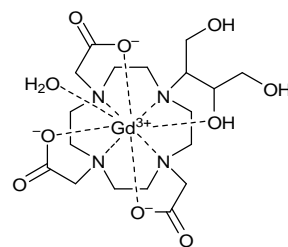
Veličinou, která popisuje efektivitu kontrastních látek, je takzvaná relaxivita, značená r . Její hodnota se dá popsat soustavou rovnic, přičemž důkladným prozkoumáním této soustavy lze dojít k závěru, že se na hodnotě relaxivity podílí zvláště několik důležitých vlastností sloučeniny.^[8] Jsou jimi: rotační korelační čas (τ_R), počet molekul vody přímo vázaných na gadolinitý ion (hydratační číslo, q), vzdálenost mezi kovovým iontem a protonem ve vodě, a rychlost výměny koordinované vody, která se dá popsat též jako čas, který voda v komplexu průměrně stráví (τ_M). Posledním důležitým parametrem je dlouhý relaxační čas T_{1e} . Shrnutím těchto kritérií lze získat představu o



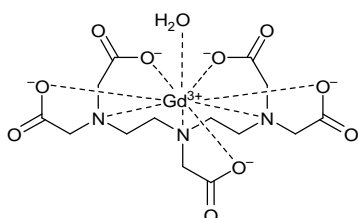
[Gd(dota)(H₂O)]⁻



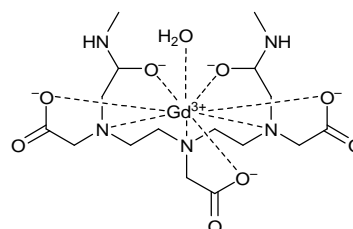
[Gd(hp-do3a)(H₂O)]



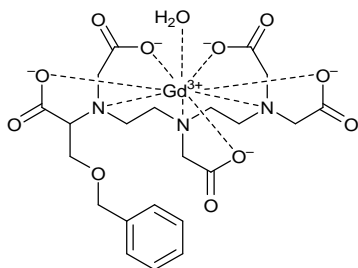
[Gd(do3a-butrol)(H₂O)]



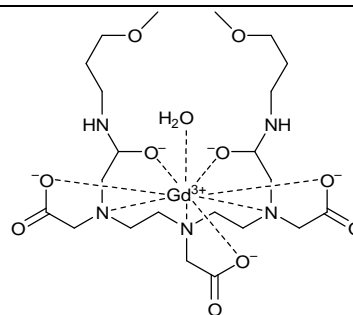
[Gd(dtpa)(H₂O)]²⁻



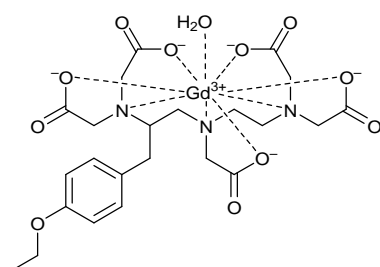
[Gd(dtpa-bma)(H₂O)]



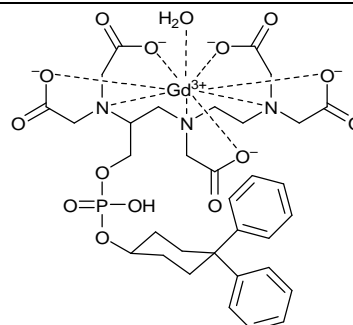
[Gd(bopta)(H₂O)]²⁻



[Gd(dtpa-bmea)(H₂O)]



[Gd(eob-dtpa)(H₂O)]²⁻



MS-325

Obrázek 2.2.

Používané kontrastní látky na bázi Gd³⁺

ideální kontrastní látce – měla by mít vysokou molekulovou hmotnost (tím se zajišťuje velmi dlouhý τ_R) a čas, který koordinovaná molekula vody stráví v molekule, by se měl pohybovat v rozmezí 20–50 ns. Kontrastní látky používané v současné době se této ideální sloučenině ani zdaleka nepřibližují, jejich efektivita dosahuje jen asi 5–10 % hodnoty predikované pro kontrastní látky s optimálními

parametry.^[9] To je způsobeno zejména tím, že stávající látky mají příliš vysokou rychlost rotace a příliš pomalou výměnu koordinované vody.

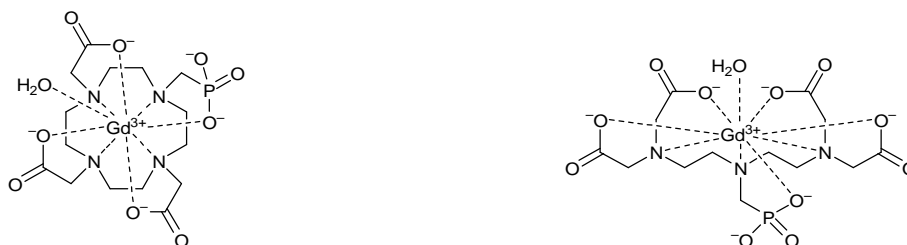
Kontrastní látky založené na komplexaci gadolinitého iontu musí být naprosto stabilní v podmínkách panujících uvnitř organismu. Tato stabilita je nezbytná vzhledem k nesmírně vysoké toxicitě volných gadolinových iontů. Podařilo se vyvinout komplexy s vyhovující stabilitou, které obklopují gadolinový iont oktaedrálním způsobem. Koordináční sféra je pak doplněna jednou molekulou vody. Na tomto principu fungují kontrastní látky uvedené na Obrázku 2.2.^[10]

Tento typ komplexů představuje v současné době jediné využití gadolinových komplexů pro účely MRI, protože komplexy gadolinových iontů s heptadentátní ligandy a tím i se dvěma koordinovanými molekulami vody těžší sice ze zvýšené relaxivity díky vyššímu hydratačnímu číslu, ale zároveň nejsou zcela úplně stálé v prostředí *in vivo*, což jejich praktickou využitelnost samozřejmě snižuje.

Mezi další parametry důležité pro kontrastní látky patří i jejich náboj. Vzhledem k vysoké koncentraci látek při medicínské aplikaci je záhodné, aby náboj látky nebyl vyšší než dva, protože jinak by to vedlo ke značnému zvýšení iontové síly roztoku a tím by vznikaly nepříjemné komplikace.

Zvýšení rotačního korelačního času se dá dosáhnout zejména navázáním komplexu obsahující kovový iont na sloučeniny o vysoké molekulové hmotnosti, čímž se přirozeně zvýší molekulová hmotnost kontrastní látky. Tohoto navázání lze dosáhnout jak cestami kovalentními, tak i nekovalentními.^[11] Příkladem nekovalentní vazby může být hydrofobní interakce, například u látky MS-325^[12-14] (viz Obrázek 2.2.), příkladem kovalentního navázání jsou zejména amidové vazby.

Rychlost výměny vody se dá ovlivnit variacemi ramen vázaných na základní skelet. Již dříve bylo pozorováno, že zvyšující se sterické omezení v okolí místa, kde se váže voda, vede ke zvýšení rychlosti výměny.^[15-19] Tímto způsobem funguje nahrazení acetátové pendantní skupiny skupinou fosfonovou nebo fosfínovou a tyto poznatky vedly k syntéze nových sloučenin na bázi cyklu a jiných, viz Obrázek 2.3.

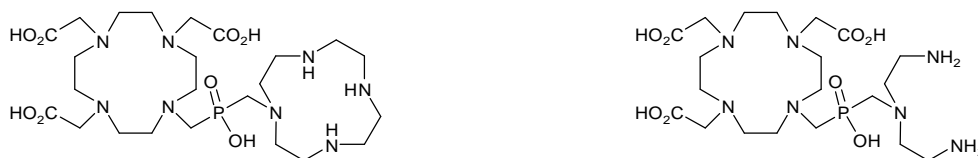


Obrázek 2.3.

Komplexy Gd³⁺ stericky ovlivněné přítomností fosforu

2.3 Cíl práce

Pro tuto práci byly navrženy cílové sloučeniny na Obrázku 2.4.

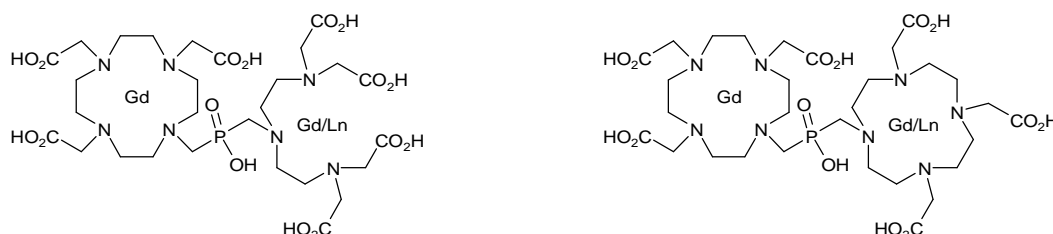


Obrázek 2.4.

Navržené polydentátní ligandy s fosfinátovým můstkem

Jak bylo vidět z výše uvedených skutečností, komplexy mají v současné medicíně velice důležitou pozici. Je tedy přirozené, že vývoj nových a lépe pracujících látek je snahou mnoha pracovních skupin po celém světě. Obzvláště deriváty odvozené od cyklenu jsou, vzhledem k již nyní známým a používaným sloučeninám, velice slibné. Myšlenkou stojící za přípravou polydentátních ligandů spojených přes fosfinátový můstek je možnost jejich uplatnění, hlavně v metodě MRI. Zde je především šance, že vznikem komplexu gadolinia s ligandem vznikne látka, jejíž hodnota relaxivity se může vztahovat k různým vlivům. Může jít kupříkladu o změnu relaxivity v souvislosti s rozdílnou hodnotou pH, což je poměrně důležité pro detekci tumorů, jejichž prostředí má nižší pH než okolní tkáň. Díky tomuto rozdílu by mohlo být možné rozeznávat místa nádorů v organismu, aniž by bylo nutné použít nějakou složitější metodu, jakou je třeba spojení komplexu se strukturou, která specificky vyhledává nádorové buňky. Dalším faktorem, který může v případě těchto komplexů ovlivnit relaxivitu, je za podmínek *in vivo* koncentrace iontů kovů v okolí, především pak koncentrace iontů Zn^{2+} .

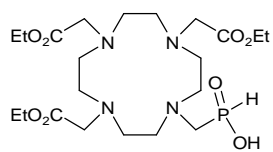
Dále se dá využít polydentátních ligandů spojených přes fosfinátový můstek pro kombinaci více metod navázáním vhodného iontu na druhé koordinační místo, což také může ovlivnit vlastnosti Gd-části. Použití mohou tyto komplexy nalézt například v teoretickém modelu ovlivnění T_{1e} u kontrastních látek pro MRI, dále při přípravě binukleárních komplexů využitelných jak pro MRI, tak pro PET, popřípadě pro kombinaci MRI/fluorescence – Obrázek 2.5.



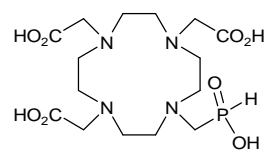
Obrázek 2.5.

Možné budoucí komplexy využitelné ve více metodách

Jako nezbytné výchozí látky byly zvoleny sloučeniny na Obrázku 2.6.



Et₃Hdo3ap^H



H₄do3ap^H

Obrázek 2.6.

Kritické intermediáty pro plánovanou syntézu

3 Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

Všechny komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla byly od dodavatelů Aldrich, Fluka, Lachner a Penta. Pro svůj účel nebyly dále čištěny a sušeny. Pro měření NMR spekter bylo použito deuterované rozpouštědlo – D₂O, 99,8% D (Chemotrade).

3.2 Metody charakterizace

3.2.1 NMR spektroskopie

Měření spekter ¹H a ³¹P NMR bylo prováděno na spektrometru VARIAN VNMRS300. Měření probíhalo při teplotě 25 °C. Všechny uváděné hodnoty chemických posunů δ jsou v jednotkách ppm a jsou zaokrouhleny na dvě desetinná místa. Chemické posuny signálů ¹H byly referencovány na interní standard Me₄Si (δ_H = 0,00). Pro ³¹P NMR byl použit jako externí standard 85 % roztok H₃PO₄ v D₂O (δ_p = 0,00 ppm)

3.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla naměřena na hmotnostním spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 ES-iontrap s ionizací elektrosprejem (ESI) v pozitivním modu.

3.2.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na dvou typech destiček: Silufol[®] (Kavalier) s širokoporézním silikagelem naneseným na hliníkové fólii, a TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Příslušné mobilní fáze jsou vždy uvedeny u jednotlivých látek.

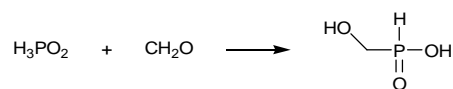
Detekční činidlo pro TLC:

Ninhydrin – 0,5% roztok v ethanolu

3.3 Syntetická část

3.3.1 Příprava kyseliny hydroxymethylfosfinové

Podle schématu:



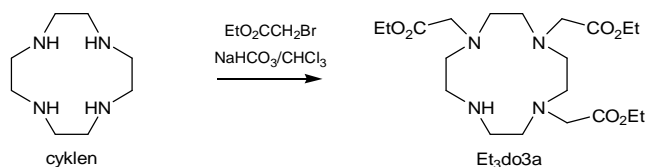
Příprava standardu pro měření NMR byla prováděna ve 4ml vialce opatřené závitkem, ve které bylo vloženo míchadlo, a postupně byly přidány všechny složky reakční směsi: 1 ml 50% aq. kyseliny fosforené (11 mmol); 0,3342 g para-formaldehydu (1 ekv.) a 1 ml ethanolu. Viálka byla posléze uzavřena a hrdlo přetaženo parafilmem, aby se zajistila izolovanost reakční směsi. Pak byla viálka umístěna do olejové lázně na míchačce, kde byla míchána při teplotě 75 °C po dobu tří dnů.

Po uplynutí této doby byla viálka vyzvednuta z olejové lázně a odstranil se z ní parafilmový obal. Tato látka byla dále použita jako standardní přídatek při měřeních ^{31}P NMR.

^{31}P NMR: 7,43 (H_3PO_3 , d, 2 %, $^1J_{\text{PH}} = 672$ Hz); 14,16 (H_3PO_2 , t, 15 %, $^1J_{\text{PH}} = 561$ Hz); 33,56 ($\text{HOCH}_2\text{PO}_2\text{H}_2$, dt, 78 %, $^1J_{\text{PH}} = 546$ Hz, $^3J_{\text{PH}} = 4,8$ Hz); 48,76 ($(\text{HOCH}_2)_2\text{PO}_2\text{H}$, s, 5 %)

3.3.2 Příprava $\text{Et}_3\text{do3a}$ [20]

Podle schématu:



Ethyl bromacetát o objemu 6,0 ml (9,04 g, 0,0541 mol, 3,5 ekv.) byl rozpuštěn ve 20 ml suchého chloroformu. Tento roztok byl přikapáván z dělicí baňky do kulaté baňky se zábrusem, ve které byla směs 2,71 g cyklenu (0,0157 mol) a 13,19 g hydrogenuhličitanu sodného (0,157 mol, 10 ekv.) ve 40 ml suchého chloroformu. Reakce byla prováděna v digestoři vzhledem k silně dráždivým účinkům ethyl bromacetátu na lidské sliznice; přikapávání bromacetátu probíhalo během 40 minut. Pak byla reakční směs ponechána míchat za laboratorní teploty po 4 dny. Po uplynutí této doby byla reakční směs zfiltrována přes fritu S4, tuhá část reakční směsi byla třikrát promyta 10 ml chloroformu a filtrát byl odpařen na vakuové odparce až do vzniku vysoce viskózního hnědého oleje. Tento olej obsahoval surový produkt reakce, k jehož čištění bylo použito sloupcové chromatografie (silikagel, CH_2Cl_2 : MeOH : NH_3 (konc. aq.) 9:1:0,05). Průběh chromatografie byl sledován na TLC (stejná mobilní fáze). Vyvíjecím činidlem byl ninhydrin, při jehož použití byly ruce chráněny latexovými rukavicemi, vzhledem k jeho karcinogenním vlastnostem.

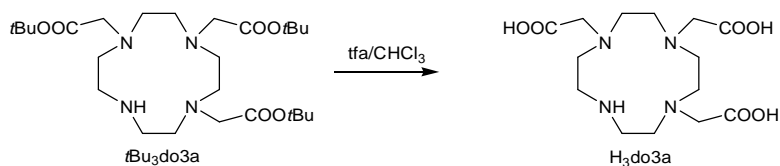
Frakce obsahující produkt byly smíchány a odpařeny na vakuové odparce. Výtěžek byl po odpaření 4,23 g, což činilo 63 % teoretického výtěžku.

^1H NMR: 1,21 (CH_3 , 9H, m); 2,83 (NCH_2CH_2 , 4H, brs); 2,90 (NCH_2CH_2 , 8H, brs); 3,07 (NCH_2CH_2 , 4H, brs); 3,37 (NCH_2CO , 2H, s); 3,432 (NCH_2CO_2 , 4H, s) ; 4,10 (OCH_2 , 6H, m)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR: 14,14 (CH_3 , 3C); 47,22 (CH_2CH_2 , 2C); 49,20 (CH_2CO_2 , 2C); 51,25 (CH_2CH_2 , 2C); 51,49 (CH_2CH_2 , 2C), 55,05 (CH_2CO_2 , 1C); 57,06 (CH_2CH_2 , 2C); 60,65 (OCH_2 , 2C); 61,21 (OCH_2 , 1C); 171,06 (COO , 2C), 173,51 (COO , 2C)

3.3.3 Příprava H₃do3a

Podle schématu:

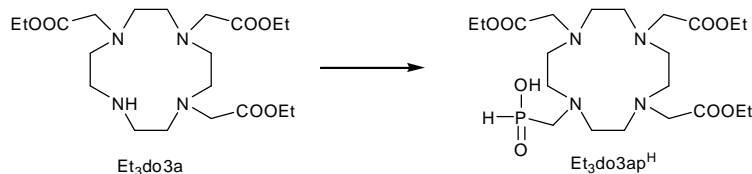


Do 250 ml baňky bylo naváženo 5,03 g *t*Bu₃do3a (10 mmol), dále bylo přidáno 100 ml směsi chloroformu a kyseliny trifluoroctové (1:1). Baňka byla opatřena chladičem pro zajištění refluxu a ponořena do olejové lázně vyhřívané na 80 °C. Směs byla ponechána v lázni po dobu jednoho dne.

Po uplynutí této doby byla reakční směs vyjmuta z olejové lázně a odpařena na vakuové odparce. Po odpaření zůstal v baňce olejovitý hnědý produkt, který byl následně rozpuštěn ve vodě pro snadnější manipulaci v dalších reakcích.

3.3.4 Pokus o přípravu Et₃do3ap^H

Podle schématu:



Postup 1

Navážka 0,64 g Et₃do3a (1,5 mmol) byla rozpuštěna ve 20 ml ethanolu v baňce o objemu 50 ml. Dále bylo přidáno 0,0902 g para-formaldehydu (3,0 mmol, 2 ekv.) a 1,38 g 50% aq. kyseliny fosforné (0,92 ml, 7,6 mmol, 5 ekv.). Reakční baňka byla zajištěna pomocí zátky a pak umístěna do olejové lázně vyhřívané na 45 °C. Zde byla reakční směs míchána a zahřívána po dobu tří dnů.

Po uplynutí této doby byl z reakční směsi odebrán vzorek pro naměření ³¹P NMR spektra. Výsledky tohoto měření pouze dokázaly přítomnost hlavně kyseliny fosforné a malých množství kyselin fosforitě a hydroxymethylfosfinové.

³¹P{¹H} NMR: 0,83 (H₃PO₃, 1 %); 4,86 (H₃PO₂, 95 %); 27,19 (kys. hydroxymethylfosfinová, 4 %)

³¹P NMR: 0,83 (H₃PO₃, 1 %, d, ¹J_{PH} = 657 Hz); 4,86 (H₃PO₂, 95 %, t, ¹J_{PH} = 547 Hz); 27,19 (kys. hydroxymethylfosfinová, 4 %, d, ¹J_{PH} = 537 Hz)

Proto byla reakční směs opět uzavřena a ponořena do olejové lázně, tentokrát vyhřívané na teplotu 60 °C a opět se směs nechala za míchání reagovat tři dny.

Po uplynutí této doby byla reakční směs odstavena a znovu byl odebrán vzorek pro měření ³¹P NMR spektra. Pro identifikaci látky v reakční směsi bylo naměřeno další ³¹P NMR spektrum po přidávku kys. hydroxymethylfosfinové.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR: 12,34 (H_3PO_2 , 78 %); 30,90 (kys. hydroxymethylfosfinová, 22 %)

^{31}P NMR: 5,96 (H_3PO_3 , 3 %, d, $^1J_{\text{PH}} = 657$ Hz); 12,33 (H_3PO_2 , 74 %, t, $^1J_{\text{PH}} = 547$ Hz); 30,89 (kys. hydroxymethylfosfinová, 23 %, d, $^1J_{\text{PH}} = 537$ Hz)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR, st. příd : 15,60 (H_3PO_2 , 28 %.); 34,55 (kys. hydroxymethylfosfinová, 72 %)

^{31}P NMR, st. příd: 13,06 (H_3PO_2 , 28%, t, $^1J_{\text{PH}} = 547$ Hz); 32,05, (kys. hydroxymethylfosfinová, 72 %, d, $^1J_{\text{PH}} = 537$ Hz)

Postup 2

Po selhání reakce v prostředí ethanolu bylo dalším krokem vyzkoušení stejné reakce v prostředí 20 ml zředěné (5 %) kyseliny octové. Bylo naváženo 0,72 g $\text{Et}_3\text{do}_3\text{a}$ (1,7 mmol), posléze bylo přidáno 1,49 g 50% aq. kyseliny fosforečné (1 ml, 8,2 mmol, 5 ekv.) a 0,1003 g para-formaldehydu (3,3 mmol, 2 ekv.). Baňka byla uzavřena zátkou a zahřívána na olejové lázni, vyhřívané na 60 °C, po dobu tří dnů.

Po této době, byla reakční směs vyjmuta z olejové lázně a po ochladnutí z ní byl odebrán vzorkem na měření ^{31}P NMR. Výsledek reakce byl opět zjišťován pomocí standardního přídatku kyseliny hydroxymethylfosfoinové. Výsledky spekter opět prokázaly nepřítomnost cílového produktu.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR: 11,78 (H_3PO_2 , 76 %); 30,40 (kys. hydroxymethylfosfinová, 24 %)

^{31}P NMR: 5,46 (H_3PO_3 , 2 %, d, $^1J_{\text{PH}} = 656$ Hz); 11,93 (H_3PO_2 , 75 %, t, $^1J_{\text{PH}} = 547$ Hz); 30,39 (kys. hydroxymethylfosfinová, 23 %, d, $^1J_{\text{PH}} = 537$ Hz)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR, st. příd : 14,95 (H_3PO_2 , 39 %); 33,94 (kys. hydroxymethylfosfinová, 61 %)

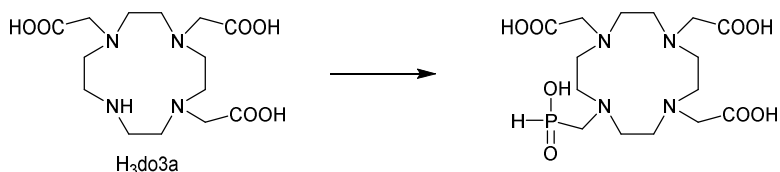
^{31}P NMR, st. příd: 12,46 (H_3PO_2 , 44 %, t, $^1J_{\text{PH}} = 547$ Hz); 31,45, (kys. hydroxymethylfosfinová, 56 %, d, $^1J_{\text{PH}} = 537,0$ Hz)

Regenerace reakční směsi

Po neúspěchu i druhé reakce vyvstala otázka, zdali je v reakční směsi stále přítomen $\text{Et}_3\text{do}_3\text{a}$. Proto byla reakční směs nanesena na silný kationtový iontoměnič Dowex 50, který byl již předtím převeden do H^+ cyklu a prolit vodou. Po dosažení neutrální reakce u vytékající kapaliny byl použit eluční roztok o složení ethanol a amoniak v poměru 10:1. Frakce byly jímány a odpařovány na vakuové odparce, ale ani po odpaření zhruba dvou litrů eluční směsi nebyl získán reaktant z výše uvedených reakcí. Proto byla zvolena eluční směs o složení ethanol a amoniak v poměru 5:1. Tato směs vyvázala z iontoměniče reaktant $\text{Et}_3\text{do}_3\text{a}$, který byl po odpaření obsahu čtyř baněk, o objemu zhruba 450 ml, získán v dostatečném množství 0,57 g. Ověření identity vyeluované látky bylo provedeno za pomoci TLC. Tím bylo ověřeno, že reaktant $\text{Et}_3\text{do}_3\text{a}$ se nezúčastnil během průběhu reakce žádných chemických dějů a byl stále v reakční směsi přítomen.

3.3.5 Příprava H₄do3ap^H

Podle schématu:



Produkt reakce 3.3.3. (H₃do3a, 9,5 mmol) byl rozpuštěn ve vodě a bylo do baňky přidáno 1,19 g para-formaldehydu a 11,7 ml 50% aq. kyseliny fosforné. Baňka byla následně uzavřena zátkou a umístěna do olejové lázně, kde byla zahřívána po dobu dvou dnů.

Po této době byla reakční směs vyjmuta z lázně, nechána vychladnout a pak byla nanesena na silný kationtový iontoměnič Dowex 50 (objem iontoměniče činil 200 cm³). Z iontoměniče byl produkt vyeluován 5% roztokem amoniaku a tato fáze byla posléze odpařena na vakuové odparce. Po odpařování bylo ze směsi odebráno na TLC (silufol; IPA V, amoniak, voda; 7:3:3). Ve stejnou chvíli byly z reakční směsi také odebrány vzorky pro metody MS, ¹H NMR a ³¹P NMR.

TLC po detekci ninhydrinem potvrdil přítomnost více látek v reakční směsi, proto bylo nutno přistoupit k dalšímu čištění směsi.

$$R_{f1} = 0,85 \text{ (produkt); } R_{f2} = 0,7 \text{ (nafialovělá)}$$

$$\text{MS: } 425,0 \text{ (H}_4\text{do3ap}^{\text{H}} + \text{H}^+); 447,1 \text{ (H}_4\text{do3ap}^{\text{H}} + \text{Na}^+)$$

$$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\} \text{ NMR : } \delta \text{ (ppm), } 21,30$$

$$^{31}\text{P NMR: } \delta \text{ (ppm), } 21,29 \text{ (d, } ^1J_{\text{PH}} = 519 \text{ Hz)}$$

Byla připravena kolona naplněna iontoměničem Amberlite CB 50 (objem iontoměniče činil 300 cm³), iontoměnič byl převeden do H⁺ cyklu a ponechán usadit. Po usazení byl odparek získaný v závěru předchozí reakce rozpuštěn v několika ml vody a posléze nanesen kapátkem na iontoměničovou kolonu. Kolona byla eluována vodou a frakce vytékající z kolony byly jímány a odpařovány na vakuové odparce. První frakce, která po odpaření zanechala hnědou olejovitou látku, byla dále krystalizována a byl z ní odebrán vzorek na TLC a NMR.

TLC, vyvíjeno opět směsí IPA V 7:3:3 na silufolu, po detekci ninhydrinem dokázalo, že ve frakci je přítomna pouze jedna látka detekovatelná ninhydrinem.

$$R_f = 0,85$$

¹H NMR: 2,98 (CH₂, 2H, d, ²J_{PH} = 9,0 Hz); 3,15–3,50 (NCH₂, 18H, m); 3,82 (CH₂COOH, 4H, s); 7,19 (PH, 1H, ¹J_{PH} = 519 Hz)

$$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\} \text{ NMR: } 21,15$$

$$^{31}\text{P NMR: } 21,14 \text{ (d, } ^1J_{\text{PH}} = 519 \text{ Hz)}$$

Tento odparek byl rozpuštěn ve zhruba 10 mL HCl aq. (1:1), pak byl do roztoku postupně pomalu přidáván ethanol až do bodu, kdy v roztoku vznikl trvalý bílý zákal. Baňka s tímto zákalem

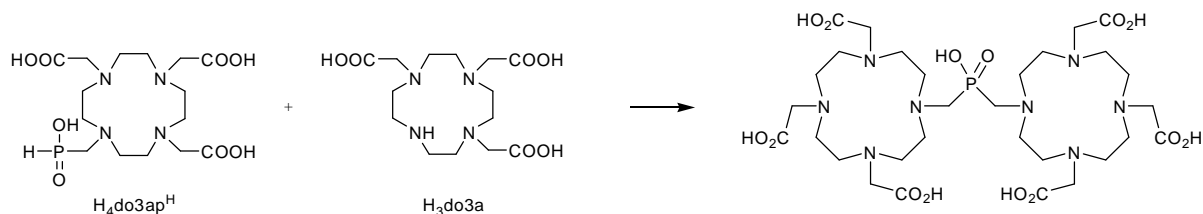
pak byla vložena do exsikátoru s ethanolem, kde byla ponechána v klidu krystalizovat po dobu pěti dnů.

Po uplynutí této doby byl produkt krystalizace zfiltrován na fritě typu S2, kde byl také třikrát promyt velmi malým množstvím lihu. Produkt byl posléze přenesen do exsikátoru s P_4O_{10} a tam byl ponechán po dobu pěti dnů.

Po skončení sušení byl produkt zvážen, jeho hmotnost činila 1,84 g, což činilo 31,2 % teoretického výtěžku vypočítaného na původní navážku tBu_3do3a . Jak bylo již v minulosti zjištěno, tento produkt krystalizuje jako $H_4do3ap^H \cdot 4HCl \cdot 2H_2O$.

3.3.6 Pokusy o modelové substituce vazby P–H

3.3.6.1 Reakce s H_3do3a

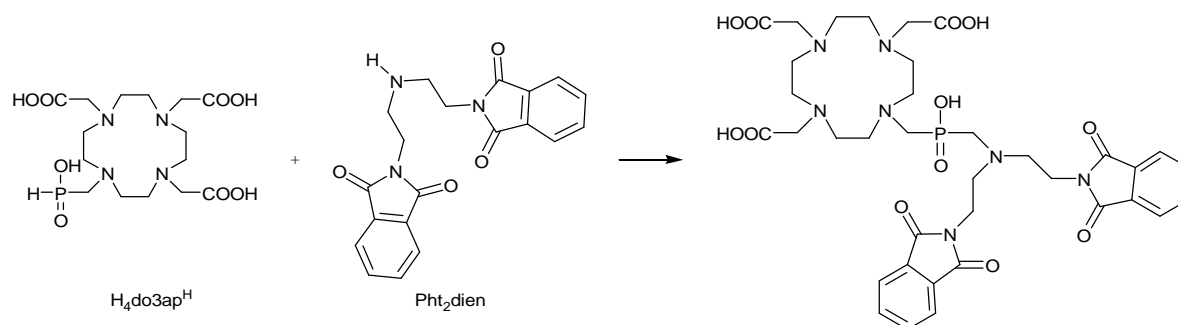


Do baňky bylo naváženo 140 mg látky $H_4do3ap^H \cdot 4HCl \cdot 2H_2O$ (0,23 mmol), dále tam bylo přidáno 0,60 g H_3do3a (1,7 mmol, 7,5 ekv.), připravené stejným způsobem jako při reakci 3.3.3, dále bylo přidáno 15 ml 3% aq. HCl a baňka byla uzavřena zátkou. Baňka byla posléze umístěna na olejovou lázeň a zahřívána na 75 °C. Do reakční baňky bylo dále během další hodiny přidáno 0,0198 g para-formaldehydu (0,66 mmol, 2,9 ekv.). Pak byla směs ponechána reagovat po dobu dvou dnů. Pak byla reakční směs zahuštěna a byl z ní odebrán vzorek na ^{31}P NMR.

Vzhledem k tomu, že spektrum ve spektru se neobjevil ani jeden signál, byla tato reakce provedena znovu ve vialce o objemu 4 ml, kam byly přidány reagenty: 55,9 mg H_4do3ap^H (0,09 mmol); 0,2793 g H_3do3a (0,8 mmol, 9 ekv.); 0,0150 g para-formaldehydu (0,5 mmol, 5,5 ekv.) a 3 ml HCl (aq., 1:1). Směs byla ponechána uzavřená reagovat při teplotě 90 °C po dobu tří dnů. Pak byl z reakční směsi odebrán vzorek na ^{31}P NMR. Ale ani toto spektrum neobsahovalo žádný signál.

V souvislosti těmito výsledky byl proveden pokus o změnu prostředí reakční směsi na zásadité, ve kterém by byly signály NMR výraznější a snadněji odečitatelné. Avšak po dosažení zásaditého prostředí byl již vzorek zředěný natolik, že se ve spektru nedal žádný signál rozlišit. Zahuštění tohoto vzorku také nevedlo k požadovaným výsledkům, je možné, že ke zisku průkazných NMR spekter bude nutno zvolit jiné, komplikovanější metody čištění.

3.3.6.2 Reakce s Pht₂dienem



Do baňky obsahující 5 ml 100% kyseliny octové bylo naváženo 0,0993 g H₄do3ap^H·4HCl·2H₂O (0,16 mmol), 0,4172 g bis-ftaloyl-diethylentriaminu (1,12 mmol, 7 ekv.) a dále 0,0144 g para-formaldehydu (0,48 mmol, 3 ekv.). Směs byla ponechána reagovat v olejové lázni za teploty 75 °C po dobu dvou dnů. Poté byl odebrán vzorek pro naměření ³¹P NMR spektra.

³¹P NMR : δ (ppm), 10,721

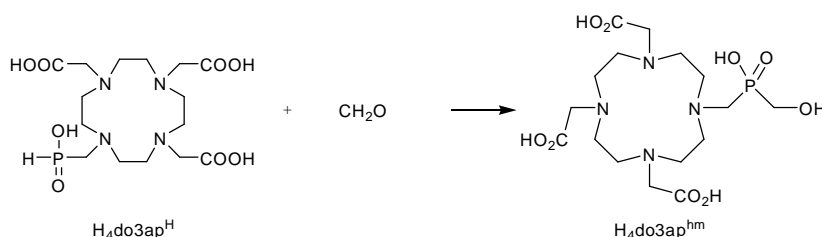
Po získání tohoto výsledku byla reakce zopakována, avšak v odlišném prostředí. Jednou reakce probíhala v prostředí HCl (aq, 1:1) a podruhé v kyselině octové (aq, 50 %). Obě směsi reagovaly po dobu tří dnů v uzavřené víálce při teplotě 90 °C. Po této době byly ze směsí odebrány vzorky pro ³¹P NMR.

³¹P NMR (reakční směs v HCl): δ (ppm), 20,91

³¹P NMR (reakční směs v CH₃COOH): δ (ppm), 9,77

Ke vzorku z reakce v HCl byl přidán H₄do3ap^{hm} a směs byla převedena do zásaditého prostředí. Nepodařilo se ale směs zahustit natolik, aby při NMR poskytla signál a zároveň aby nedocházelo k vylučování tuhé fáze. Proto bylo nemožno ověřit průběh reakce přidáním standardu.

3.3.6.3 Příprava standardu pro ověření průběhu modelových reakcí



Pro ověření průběhu modelových reakcí byl připraven standard H₄do3ap^{hm}. Bylo naváženo 0,0543 g H₄do3ap^H·4HCl·2H₂O (0,09 mmol) a 0,0174 g para-formaldehydu (0,58 mmol, 6,5 ekv.) do 4 ml víálky, kde byly navážky rozpuštěny v objemu 3 ml HCl (1:1, aq.). Směs reagovala tři dny za teploty 90 °C. Pak byl ze směsi odebrán vzorek pro ³¹P NMR. Ve spektru se nevyskytoval ani jeden signál, proto byla směs odpařena a posléze rozpuštěna v malém množství vody. Opět byl odebrán vzorek pro ³¹P NMR, ale ani toto spektrum neposkytlo signál. Proto byl do reakční směsi přidán KOH pro změnu pH na zásadité (pH = 10), a opět byl odebrán vzorek ³¹P NMR.

^{31}P NMR: δ (ppm), 34,21 ($\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{hm}}$)

Tento signál tedy odpovídá možnému bočnímu produktu reakcí přípravy polydentálních ligandů spojených fosfinátovým můstkem.

4 Výsledky a diskuze

V rámci přípravy prekurzorů pro můstkované komplexy byly zkoumány dvě látky – $\text{Et}_3\text{Hdo3ap}^{\text{H}}$ a $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{H}}$. Prvním krokem byla syntéza samotných výchozích látek pro reakce. Tato syntéza byla v obou případech úspěšná a proto bylo možno přistoupit k vytvoření vlastního prekurzoru. Zde byl úspěch zaznamenán pouze v případě $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{H}}$, kde byl získán požadovaný produkt, zatímco při použití $\text{Et}_3\text{Hdo3ap}^{\text{H}}$ nebylo dosaženo požadovaného produktu ani změnami reakčních podmínek.

Modelové substituce vazby P–H byly prováděny z látky $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{H}}$. Zatímco při reakci s $\text{H}_3\text{do3a}$ nebylo možné pozorovat pomocí NMR výsledek reakce kvůli výrazné šířce signálu sledované látky, při reakcích s bis-ftaloyl-diethylentriaminem v kyselině octové, koncentrované i zředěné, byl pozorován v ^{31}P NMR signál, odpovídající produktu oxidace P–H vazby ve výchozí látce na fosfonát. Dá se tedy předpokládat, že tato reakce je katalyzována prostředím kyseliny octové a že se za těchto podmínek nepodařilo získat žádaný polydentátní ligand s fosfinátovým můstkem.

5 Závěr a shrnutí

Prekurzor pro syntézu polydentálních ligandů přes fosfinátový můstek byl připraven pomocí jedné ze dvou navrhovaných reakcí, druhá reakce neposkytla požadovaný produkt.

Zkoušené modelové syntézy poskytly důležité poznatky: Není možné sledovat výsledek reakce prekurzoru s $\text{H}_3\text{dO}_3\text{a}$ v kyselém prostředí přímo pomocí ^{31}P NMR. V tomto prostředí jsou signály natolik široké, že se ve spektru nezobrazují.

Bylo zjištěno, že prekurzor s *N,N'*-bis-ftaloyl-diethylentriaminem v prostředí kyseliny octové nereaguje za tvorby ditopického ligandu; v tomto prostředí probíhá oxidace vazby fosfor – vodík na fosfonát.

6 Seznam zkratek

Et₃do3a – triethyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-triacetát
H₃do3a – 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7- trioctová kyselina
H₄dota – 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
H₄teta – 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11-tetraoctová kyselina
H₅dtpa – diethylentriamin-*N, N, N', N'', N'''*-pentaoctová kyselina
Et₃Hdo3ap^H – triethyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-methylfosfinová kyselina
H₄do3ap^H – 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-methylfosfinová kyselina
Pht₂dien – *N,N''*-bis-ftaloyl-diethylentriamin
cyklam – 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan
cyklen – 1,4,7,10-tetraazacyklododekan
H₃nota – 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina
tacn – 1,4,7-triazacyklononan

7 Seznam použité literatury

- ^[1] D. Parker, *Chem. Br.* **1994**, 818.
- ^[2] D. Parker, *Comprehensive Supramolecular Chemistr, Vol. 10* (Ed.: J.-M. Lehn), Pergammon, **1996**, pp. 487–563.
- ^[3] D.M.Goldenberg, *J. Nucl. Med.* **2002**, *43*, 693.
- ^[4] S. Liu, D. S.Edwards, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 7.
- ^[5] S. Liu, D. S.Edwards, *Top. Curr. Chem.* **2002**, *222*, 259.
- ^[6] R. D. Shannon, *Acta Crystallogr.* **1976**, *A32*, 751.
- ^[7] *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging* (Eds: A.E.Merbach, É Tóth), Wiley, Chichester, **2001**.
- ^[8] R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 901.
- ^[9] J. Kotek, *Ph. D. Thesis*, **2004**, 16.
- ^[10] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293.
- ^[11] V. Jacques, J. F. Desreux, *Top. Curr. Chem.* **2002**, *221*, 123.
- ^[12] D. J. Pamelee, R. C. Walovitch, H.S. Ouellet, R. B. Lauffer, *Invest. Radiol.* **1997**, *32*, 741
- ^[13] P. Caravan, C. Comuzzi, W. Crooks, T. J. McMurry, G. R. Choppin, S. R. Woulfe, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2170.
- ^[14] P. Caravan, N. J. Cloutier, M. T. Greenfield, S. A. McDermid, S. U. Dunham, J.W.M. Bulte, J.C.Amedio, Jr., R. J. Lobby, R. M. Supkowski, W. D. Horrocks, Jr., T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3125.
- ^[15] R. Ruloff, É. Tóth, R. Scopelliti, R. Tripiet, H. Handel, A. E. Merbach, *Chem. Commun.* **2002**, 2630.
- ^[16] S. Laus, R. Ruloff, É. Tóth, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3555.
- ^[17] S. Aime, M. Botta, S. Geniati Crich, G. B. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Piccinini, M. Sisti, E. Terreno, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, *2*, 470.
- ^[18] S. Aime, M. Botta, S. Geniati Crich, G. B. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Sisti, E. Terreno, *Magn. Res. Chem.* **1998**, *36*, S200.
- ^[19] S. Aime, M. Botta, L. Frullano, S. Geniati Crich, G. Giovenyana, R. Pagliarin, G. Palmisano, F. R. Sirtori, M. Sisti, *J. Med. Chem* **2000**, *43*, 4017.
- ^[20] M. Main, J. S. Snaith, M. M. Meloni, M. Jauregui, D. Sykes, S. Faulkner, A.M. Kenwright, *Chem. Commun.* **2008**, *41*, 5212.

Poděkování

Rád bych poděkoval svým rodičům za jejich pochopení a podporu mého studia, bez kterých bych se na vysokou školu nikdy nedostal.

Rád bych také poděkoval svému školiteli, Janu Kotkovi, za jeho vedení, vynikající nápady a praktické rady.

Nakonec bych rád poděkoval celému osazenstvu laboratoře 323 za pomoc při syntézách a měření spekter NMR. Jim také patří můj dík za vytvoření pohodové atmosféry v laboratoři, ve které byla radost pracovat.