

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

**Přírodovědecká fakulta
Katedra anorganické chemie**



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Modelové organokovové sloučeniny ruthenia
s 2'-hydroxychalkony:
příprava a charakterizace**

Vypracoval:	Anna Havlíčková
Vedoucí práce:	doc. PhamDr. Ján Vančo, Ph.D.
Studijní obor:	1407R022-00 Bioanorganická chemie
Studijní program:	B1407 Chemie

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci napsala zcela samostatně pod odborným vedením doc. PhamDr. Jána Vanča, Ph.D. a použila zdrojů uvedených v seznamu literatury.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce doc. PhamDr. Jánů Vančovi, Ph.D. za odborné rady, pomoc při vypracování této práce a za naměření hmotnostních spekter. Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Zdeňku Trávníčkovi, Ph.D. za umožnění vypracování této práce na katedře Anorganické chemie a za provedení rentgenové strukturní analýzy, Mgr. Jakubu Hutyrovi za věcné připomínky a rady, Mgr. Aleně Klanicové, Ph.D. za změření infračervených spekter, Pavle Richterové za provedení elementární analýzy, a RNDr. Bohuslavu Drahošovi, Ph.D. a Mgr. Peteru Antalovi za naměření NMR spekter.

Abstrakt

Komplexní sloučeniny ruthenia jsou široce studovanými látkami nejen díky jejich katalytickým vlastnostem, ale našli svoje uplatnění i jako biologicky aktivní látky. Například komplexy Ru^{III} obsahující indazol a imidazol (NAMI-A, KP1019 a NKP-1339), které vykazují slibné protinádorové a antimetastatické aktivity a vstoupily již do fáze klinických testů. Polosandwichové komplexy ruthenia $[\text{Ru}(p\text{-cym})(\text{XY})\text{Z}]$, kde XY jsou mono- nebo bidentátní ligandy (*N,N*-; *N,O*-; *O,O*-) a Z je např. chlorido- ligand, byly a jsou nadále tématem studia pro řady vědců, díky jejich široké škále biologických vlastností. Zejména se jedná o jejich antimetastatické a cytotoxické účinky vůči řadě nádorových buněčných linií. V roce 2001 byl připraven polosandwichový komplex, s velmi slibnou protinádorovou aktivitou *in vivo*, pod názvem RAPTA-C. Navíc byla připravena velká řada sloučenin s bidentátními *O,O*-ligandy, u kterých byly taktéž pozorovány různé biologické aktivity. Mezi slibné *O,O*-ligandy patří také skupina chalkonů, přírodních látek, které plní funkce barviv a ochranných látek a vyskytují se zejména v nadzemních částech rostlin. Dlouhodobé studie ukázaly, že různé deriváty chalkonů vykazují také zajímavé biologické vlastnosti, zejména antioxidační, cytotoxické, antimikrobiální, antiprotozoální, antiulcerozní, antihistaminové a protizánětlivé účinky. Z výše uvedených důvodů byla experimentální část mé práce orientovaná na syntézu polosandwichových komplexních sloučenin Ru^{II} obecného složení $[\text{Ru}(p\text{-cym})(\text{L})\text{Cl}]$, přičemž *p-cym* = *p-cymen* a HL = 2'-hydroxychalkon. Nasyntetizovala jsem celkem pět derivátů 2'-hydroxychalkonů, které jsem se pak pokusila použít jako výchozí látky k syntézám polosandwichových komplexních sloučenin Ru^{II} a charakterizovat je dostupnými fyzikálně-chemickými metodami. Potíže se vznikem směsí s různorodým složením mi nakonec zabránily připravit chemické individua s kýženým složením. Vybraný produkt, charakterizovaný vhodnými analytickými technikami, přitom obsahoval cca 30 % komplexu složení $[\text{Ru}(p\text{-cym})(\text{L})\text{Cl}]$, přičemž HL = 2'-hydroxy-3,4,5-trimethoxychalkon.

Klíčová slova: Chalkony, syntéza, polosandwichové komplexy, ruthenium, biologická aktivita, charakterizace

Abstract

Ruthenium complexes have been intensively studied not only for their catalytic properties, but have been also found useful as biologically active compounds. For example, Ru^{III} complexes containing indazole and imidazole ligands (designated as NAMI-A, KP1019 and NKP-1339) have shown promising antitumor and antimetastatic activities and they have entered the phase of clinical trials. Half-sandwich complexes of ruthenium with the general formula [Ru(*p*-cym)(XY)Z], where XY are mono- or bidentate ligands (*N,N*-; *N,O*; *O,O*-) and Z is chlorido-ligand, are still subject of study for many scientists, because of their wide range of biological properties. In particular, antimetastatic and cytotoxic effects against a number of tumor cell lines were studied. In 2001, a very promising half-sandwich compound was prepared with significant antitumor activity *in vivo* – abbreviated as RAPTA-C. Moreover, a large number of compounds with bidentate coordinated *O,O*-ligands have been studied showing various biological activities. One of the promising groups of *O,O*-ligands is represented by chalcones, a group of naturally occurring compounds in aerial parts of plants as colorants and chemoprotective agents. Long-term studies have shown that different derivatives of chalcones have interesting biological properties, in particular: antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, antiprotozoal, antiulcerous, anti-inflammatory and antihistaminic effects. Inspired by the above mentioned facts, the experimental section of my work was dedicated to the synthesis of half-sandwich Ru^{II} complexes with the general composition [Ru(*p*-cym)(L)Cl], where HL = 2'-hydroxychalcone derivative. During the solution of my synthetic project, I successfully prepared 5 chalcone derivatives and characterized them by means of selected physical and chemical methods. Faced with the difficulties connected with the formation of the product mixtures with varying composition, I was ultimately unable to prepare the chemical individuals with the desired composition. The selected product, characterized by suitable analytical techniques, contained about 30% of the complex with the desired composition [Ru(*p*-cym)(L)Cl], where HL = 2'-hydroxy-3,4,5-trimethoxychalcone.

Keywords: Chalcones, synthesis, half-sandwich complexes, ruthenium, biological activity, characterization.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 <i>Chalkony</i>	9
2.1.1 Obecná charakteristika	9
2.1.2 Způsoby syntézy	10
2.1.3 Biologická aktivita.....	11
2.2 <i>Polosandwichové komplexy</i>	13
2.2.1 Historie	13
2.2.2 Chemické složení.....	14
2.2.3 Biologická aktivita.....	15
2.2.3.1 Komplexy Ru ^{III} obsahující indazol a imidazol.....	15
2.2.3.2 Ru ^{II} polosandwichové látky	16
2.2.3.3 Ru komplexy s chalkonovým ligandem	18
2.2.3.4 Polosandwichové komplexy Ru ^{II} s chalkonovým ligandem	20
2.2.3.5 Polosandwichové komplexy Ru ^{II} s bidentátními <i>O,O</i> -ligandy.....	21
2.2.3.6 Vícejaderné Ru ^{II} komplexy	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 <i>Materiály a přístroje</i>	26
3.2 <i>Syntéza 2'-hydroxychalkonů</i>	27
3.3 <i>Syntéza komplexních sloučenin ruthenia s 2'-hydroxychalkony</i>	28
3.3.1 <i>Syntéza [Ru(<i>p</i>-cym)Cl₂]₂</i>	28
3.3.2 <i>Syntéza komplexů s předpokládaným složením [Ru(<i>p</i>-cym)LCI]</i>	29
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1 <i>Deriváty 2'-hydroxychalkonů</i>	31
4.2 <i>NMR spektroskopie derivátů 2'-hydroxychalkonů</i>	32

4.3 Organokovové sloučeniny Ru^{II} s 2'-hydroxychalkony	35
4.4 IR spektroskopie ligandu HL_4 a komplexu 4	36
4.5 MS spektrometrie a stabilita komplexu 4	37
4.6 NMR spektroskopie komplexu 4	40
4.7 Rentgenová strukturní analýza	41
5. ZÁVĚR	43
6. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	45
7. CITOVANÁ LITERATURA	47

1. ÚVOD

Objev a výzkum protinádorové aktivity cisplatiny (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]) podněcoval vědce ke zkoumání dalších možných sloučenin na bázi protinádorových látek, zejména komplexů přechodných kovů s menšími vedlejšími účinky a širším rozsahem protinádorové aktivity, než je cisplatina. Mezi takové přechodné kovy patří např. ruthenium, rhodium, osmium, iridium, zlato, kobalt, zinek, měď. [1]

Komplexní sloučeniny ruthenia mají velký význam jako potenciální protirakovinné látky z důvodu jejich slabé toxicity a slibné účinnosti proti nádorovým buňkám. [34], [35] Organokovové sloučeniny ruthenia, nesoucí *p*-cymen koordinovaný jako π -ligand s dalšími mono- či bidentátními ligandy, jsou považovány za nadějně kandidáty pro léčbu rakoviny. Komplexní chemie ruthenia je dobře rozvinutá, a to zejména s aminovými a iminovými ligandy. Komplexy nesoucí *N,N*- a *N,O*-bidentátní ligandy [Ru(*p*-cym)(XY)Cl]Z, kde XY = ethylendiamin, piperazin, 1,2-diaminobenzen, bypiridin a Z je obvykle PF₆, vykazovaly cytotoxicitu srovnatelnou s cisplatinou v řadě buněčných linií. [65] Jsou známé i sloučeniny ruthenia s *O,O*-bidentátními ligandy (např. deriváty acetylacetonu, 1,1-cyklobutandikarboxylát, oxalát, nebo malonát). [2], [3], [67].

Chalkony (1,3-diaryl-2-propen-1-ony) jsou důležitou skupinou látek vyskytujících se v přírodě, které v závislosti na substituci arylových kruhů, vykazují určitou biologickou aktivitu. Chalkony a jejich deriváty jsou hojně používány jako ligandy pro přípravu komplexních sloučenin přechodných kovů. Zvláště různé 2'-hydroxychalkony, které slouží jako *O,O*-bidentátní donorové ligandy. [4] Studie komplexních sloučenin některých iontů přechodných kovů (Cu^{II}, Ni^{II}, Co^{II}, Pd^{II}, Pt^{II}) s 2'-hydroxychalkony vedly ke stabilním sloučeninám. [41]

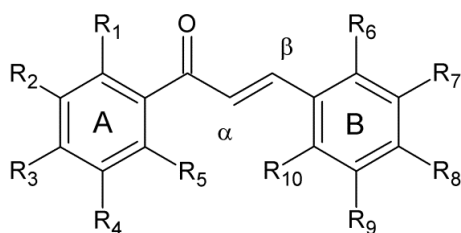
Cílem této bakalářské práce je vypracovat literární rešerši zaměřenou na biologicky zajímavé deriváty 2'-hydroxychalkonů a komplexních sloučenin ruthenia. Dále se pokusit syntetizovat, dle postupů uvedených v odborné literatuře, modelové organokovové sloučeniny Ru^{II} s vybranými deriváty 2'-hydroxychalkonů obecného složení [Ru(*p*-cym)(L)Cl]. Posledním cílem je nasyntetizované látky charakterizovat vhodnými analytickými metodami ve spolupráci se zaměstnanci katedry Anorganické chemie PŘF UP.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chalkony

2.1.1 Obecná charakteristika

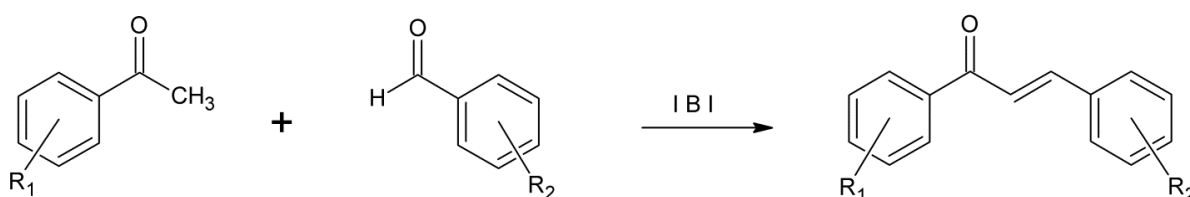
Chalkony (1,3-diaryl-2-propen-1-ony) patří do skupiny organických látek, které mají otevřený řetězec skládající se z α,β -nenasyceného karbonylového systému spolu se dvěma aromatickými jádry, která jsou spojena pomocí tří uhlíkových atomů (obr. 1). S mnoha jednoduchými chalkony, které nemají na aromatickém kruhu OH a OCH₃ skupinu, se v přírodě nesetkáme. Mnoho derivátů se hojně vyskytuje v rostlinách, ovoci a zelenině. Jsou prekurzorem v biosyntéze flavonoidů – enzymatická cyklizace 2'-hydroxychalkonů vede ke vzniku flavononů a následně k velkému množství flavonoidových skupin včetně flavonů, flavonolů, dihydroflavonolů, auronů a isoflavonů. [5] Důležité jsou chalkony také pro pigmentaci květin, díky které přitahují opylovače. Tyto látky hrají také roli v obraně proti patogenům a hmyzu. Mohou existovat v *cis*- nebo *trans*-izomerní formě, přičemž *trans*-izomer je termodynamicky stabilnější. Přírodní chalkony mají na arylových skupinách připojeny zejména hydroxylové, methoxylové a alkenylové funkční skupiny. Kromě toho, syntetické deriváty chalkonů mohou obsahovat jeden nebo více substituentů na arylových kruzích, jako jsou halogeno-, nitro-, acetamido-, amino-, nitril- skupiny, karboxylové skupiny, různé heterocykly, fenyl apod. Některé tyto funkční skupiny ovlivňují určitý stupeň biologické aktivity. Taktéž α,β -nenasycený systém je považována za hlavní farmakofor, jelikož při úplné redukci nebo částečné modifikaci této skupiny dochází ke ztrátě bioaktivity. [4]. [5], [6] Dlouhodobé vědecké studie ukázaly, že chalkony vykazují zajímavé biologické vlastnosti, zejména antioxidantní, cytotoxické, protirakovinné, antimikrobiální, antiprotozoální, antiulcerozní, antihistaminové a protizánětlivé účinky. V dnešní době jsou některé chalkony testovány v mnoha studiích vůči virovým onemocněním, kardiovaskulárním chorobám, bolestem, gastritidě a rakovině žaludku. [6], [7], [8]



Obr. 1: Obecný chemický vzorec chalkonů [5].

2.1.2 Způsoby syntézy

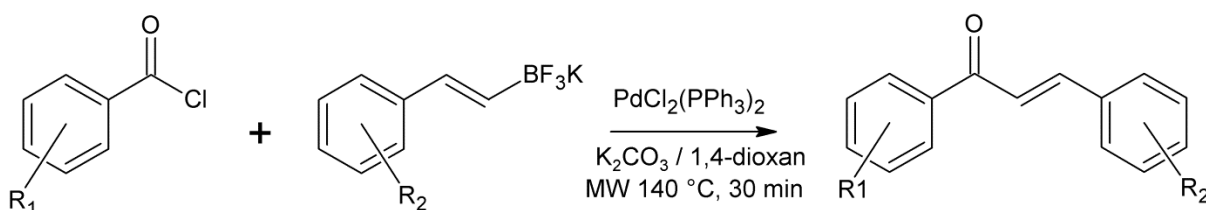
Chalkony lze obecně syntetizovat pomocí Claisen-Schmidtovy kondenzace v přítomnosti kyseliny, nebo báze (obr. 2). Mezi silné báze, které se používají při této kondenzaci, patří zejména KOH, NaOH, Ba(OH)₂, LiHMDS (bis(trimethylsilyl)amid lithný). Lze použít i několik Lewisových kyselin, jako jsou např. B₂O₃, AlCl₃ a HCl. [9] Výtěžnost reakcí se obvykle pohybuje do 90 %.



Obr. 2: Syntéza chalkonů Claisen-Schmidtovou kondenzací acetofenonu a benzaldehydu v přítomnosti báze [B] [9].

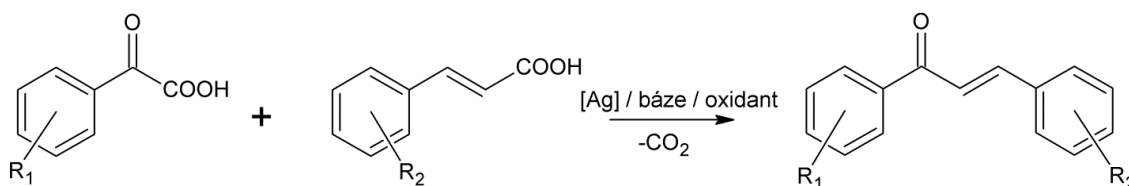
Další metodou používanou k syntéze chalkonů je Suzuki coupling mezi benzoylchloridem a kyselinou fenylvinylboronovou. Chalkony byly také připraveny v dobrém výtěžku pomocí Makaiyamovy aldolové kondenzace, ve které necyklické ketony a benzaldehydy reagovaly v přítomnosti jodidu samaritého a trimethylsilylchloridu. [10]

Styryltrifluoroboritan draselný je organokovové činidlo používané v organických syntézách, který je univerzální, netoxický, není citlivý na vlhkost a má dlouhou dobu skladovatelnosti. Toto činidlo se hojně uplatňuje v cross-couplingových reakcích. Zmíněná reakce se použila i při syntéze chalkonů. Jde o katalytický systém s použitím paladnatého katalyzátoru umožňující úspěšnou cross-couplingovou reakci mezi styryltrifluoroboritanem draselným a benzoylchloridem. Reakce probíhá v jednom kroku pod mikrovlnným ohřevem (obr. 3). [11]



Obr. 3: Syntéza chalkonů pomocí cross-couplingové reakce styryltrifluoroboritanu draselného a benzoylchloridu [11].

Již zmíněnou cross-couplingovou reakcí, ale nyní za jiných podmínek a s použitím jiných reaktantů, lze též připravit chalkony a jejich deriváty. Tentokrát jde o dvojitou dekarboxylační reakci katalyzovanou pomocí stříbrné soli s α -ketokyselinou (2-oxo-2-fenylctová kyselina) a kyselinou skořicovou ve vodě. Jako oxidační činidlo lze použít $K_2S_2O_8$, $Na_2S_2O_8$ nebo $(NH_4)_2S_2O_8$. Katalyzátorem je $AgNO_3$ a bázi K_2CO_3 . Důležitou součástí reakce je zde rozpouštědlo, kterým je voda, případně směs CH_3CN/H_2O v poměru 1:1. Celá směs se zahřívá při teplotě $50\text{ }^\circ\text{C}$ (některé deriváty chalkonů i při $100\text{ }^\circ\text{C}$) pod inertní atmosférou po dobu 24 hodin (obr. 4). [12]



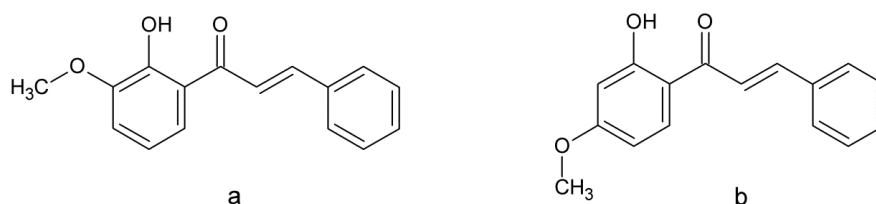
Obr. 4: Syntéza chalkonů z α -ketokyseliny a kyseliny skořicové [12].

2.1.3 Biologická aktivita

Konzumace ovoce, zeleniny, obilovin, luštěnin apod. je spojena s nižším výskytem rakoviny a jiných chronických nemocí. Tato slibná aktivita může souviset se skupinou aromatických ketonů – chalkonů, které jsou v malém množství obsaženy v těchto rostlinách. [13] Jedny z nejvýznamnějších chalkonů vyskytujících se v těchto rostlinách jsou flavokawin, butein, xanthoangelol, 4-hydroxyderricin, kardamonin a 2',4'-dihydroxychalkon. V závislosti na substituci arylových kruhů, chalkony vykazují řadu různých biologických vlastností. [14] Důležitou a velmi významnou skupinou takovýchto derivátů jsou 2'-hydroxychalkony. Bylo zjištěno, že hydroxychalkony izolované z tropické americké kapradiny, *Pityrogramma calomelanos* z čeledi křídlecnicovité, vykazují zajímavé cytotoxické účinky. Chalkony s méně substituovanými hydroxy skupinami na A nebo B kruhu ukázaly větší aktivitu ve srovnání s chalkony, které obsahovaly více hydroxylových skupin na těchto kruzích. Tento rozdíl byl přičítán kyselosti fenolických hydroxylových skupin. [15] Obecně 2'-hydroxychalkony jsou široce distribuovány v rostlinách. Hydroxy skupina v pozici 2' byla identifikována jako důležitý substituent na A kruhu pro zvýšení protizánětlivé a antibakteriální aktivity chalkonů. Kromě již zmíněné slibné aktivity je tato 2'-hydroxy skupina nutná i pro cyklizaci chalkonů za vzniku flavonů v přítomnosti UV záření. [16]

Jedním z příkladů mohou být 2'-hydroxychalkony obsahující methoxy skupiny na aromatickém kruhu A. Tyto látky byly testovány na inhibici buněčného růstu HepG2 buněk. (hepatocelulární karcinom) a bylo zjištěno, že vykazují slibné výsledky [15].

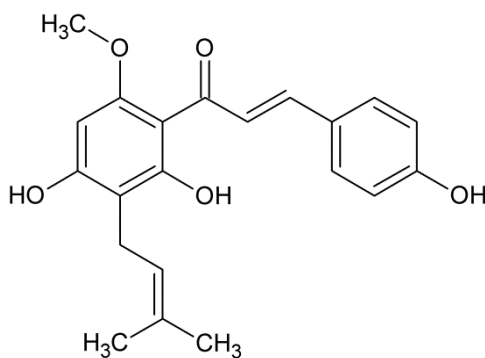
Další deriváty chalkonů, obsahující 2'-hydroxy skupinu uvedené na obr. 5, byly testovány z hlediska jejich cytotoxicity na lidské nádorové buněčné linie karcinomu nosohltanu KB, multi-rezistentního derivátu KB-VCR a karcinomu plic A549. Derivát 2'-hydroxychalkonu (5a) vykazoval výraznou aktivitu proti buněčným liniím A549 ($IC_{50} = 0,6\mu M$). (IC_{50} (hodnota označující koncentraci, která způsobuje pokles biologické aktivity na polovinu). Druhý derivát (5b) ukázal cytotoxické účinky na KB ($IC_{50} = 2,0\mu M$) i KB-VCR ($IC_{50} = 2,0\mu M$). [17]



Obr. 5: Deriváty chalkonů s různě substituovanými methoxy skupinami na A kruhu [17].

5a: 3'-methoxy-2'-hydroxychalkon; 5b: 4'-methoxy-2'-hydroxychalkon.

Xanthohumol (obr. 6) je jedním z nejznámějších a v posledních letech hojně zkoumaných prenylovaných chalkonů, který je obsažen např. ve chmelu. Byl identifikován jako širokospektrální chemopreventivní činidlo. Z těchto důvodů byla syntetizována řada takovýchto derivátů s různou substitucí na arylových skupinách (hydroxy-,methoxy-,prenyl-). Bylo potvrzeno, že tyto látky chrání játra proti poškození chemoterapeutiky. Dobré výsledky vykazovaly deriváty chalkonů mající navázány hydroxy skupiny. [18]



Obr. 6: Chemický vzorec xanthohumolu [18].

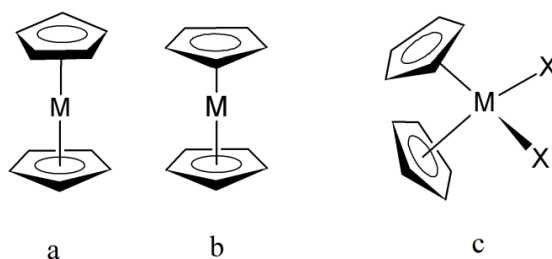
Vzhledem k protizánětlivým účinkům chalkonů, také 2',5'-dihydroxychalkony se ukázaly jako potenciální chemické látky v oblasti medicíny. Bylo zjištěno, že 2',3-dihydroxy-, 2',5'-dihydroxy-4-chloro- a 2',5'-dihydroxychalkony prokázaly pozoruhodné inhibiční efekty na otok zadní tlapky vyvolaný polymyxinem B (indukovaný otok) u testovaných myši. [19] Deriváty chalkonů obsahující fluoro-, chloro-, bromo-, jodo- a hydroxy- skupinu v pozici 2' na A kruhu významně ovlivnily příjem glukosy v modelové buňce. Byly testovány deriváty chalkonů se substituovanou skupinou na A kruhu, tak i ty, které tyto substituenty nemají. Zjistilo se, že velký význam má právě substituce na A kruhu, která podporuje buněčnou spotřebu glukosy. Řada takovýchto chalkonů je proto dále studována pro svoji potenciální anti-diabetickou aktivitu. [20]

2.2 Polosandwichové komplexy

2.2.1 Historie

Polosandwichové komplexy se řadí mezi organokovové sloučeniny, které obsahují přímou vazbu mezi kovem a uhlíkem. V roce 1951 P. Pauson a S. A. Miller nezávisle na sobě syntetizovali ferrocen a přibližně o rok později G. Wilkinson podal zprávu o jeho struktuře. [21] Tento metallocen obsahuje dva cyklopentadienidy(-1) koordinované jako π -ligandy. Díky této symetrické struktuře jsou jmenované sloučeniny často uváděny jako sandwichové komplexy. Sloučeniny s jedním aromatickým kruhem jsou známé pod názvem polosandwichové metalloceny.

Strukturně lze komplexy s bis-cyklopentadienidy(-1) rozdělit do dvou skupin. A sice „klasické“, které mají oba π -vazebné ligandy rovnoběžné a „lomené“ metalloceny obsahující mimo kruh ještě další ligand vázaný přímo na kov (např. chlor). Centrálním kovem u tohoto typu sloučenin jsou především titan, zirkonium, vanad, niob a molybden. Klasické metalloceny mají ve své struktuře jako centrální kov např. železo a kobalt se střídavým uspořádáním bis-cyklopentadienidů(-1). Také mohou mít uspořádání zákrytové, které je typické pro ruthenium (obr. 7). Všechny jmenované komplexy našly uplatnění v chemii a byla také testována jejich biologická aktivita. [22]



Obr. 7: Struktury metallocenů [22].

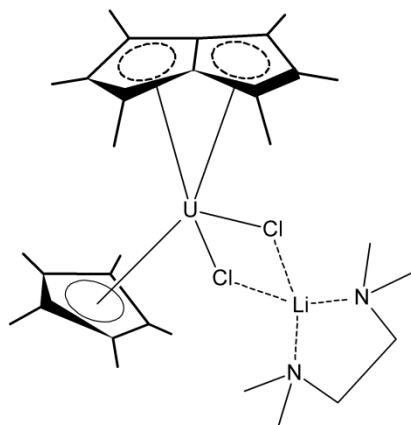
7a: střídavé uspořádání; 7b: zákrytové uspořádání; 7c: „lomené“ uspořádání.

2.2.2 Chemické složení

Hlavní motiv polosandwichových komplexů tvoří centrální atomy, kterými mohou být různé kovy, a na něj koordinované π -ligandy. Asi nejznámější je cyklopentadienid(-1) (Cp) ($\text{Cp} = \eta^5\text{-C}_5\text{H}_5^-$). Vytváří velmi pevnou vazbu s centrálním atomem, a díky tomu se stala tato skupina spolehlivým ligandem pro celou řadu komplexů $[\text{MCpL}_n]$ ($n = 2, 3$ nebo 4 ; $\text{M} = \text{kov}$). Druhou nejčastější skupinou jsou arenové ligandy. Ty se obvykle vážou k přechodným nízkovalemtním kovům. Jsou reaktivnější než cyklopentadienidy(-1) a také snadněji podléhají substitučním reakcím. Dále jsou známy i cyklobutadienidy(-1), η^7 -cykloheptatrienidy(-1) a η^8 -cyklooktatetraenidy(-2). [23]

Hojně se studují komplexy, které obsahují rhodium, iridium a ruthenium. Jedním z mnoha příkladů lze uvést polosandwichové komplexy těchto tří kovů obsahující picolinamidové ligandy s vazbou (N,N -) nebo chinolinamidové ligandy. [24] Významným kovem v rámci VIII. B skupiny je také osmium vyskytující se v těchto typech komplexů. Zkoumaly se například arenové sloučeniny Os^{II} s obecným vzorcem $[\text{Os}(\eta^6\text{-aren})(N,O)\text{Cl}]$, obsahující N,O -chelátové ligandy s primárním aminem, nebo pyridin jako N -donor a karboxylová či aryloxidová skupina jako O -donor. [25] Široce studovanou polosandwichovou látkou s přechodným kovem, která se často označuje jako cymantren, je komplex $[\text{MnCp}(\text{CO})_3]$ a jeho deriváty. [26], [27], [28] Dále byly připraveny mono- a bis-cyklopentadienidové(-1) hydrazidové sloučeniny titanu. [29] Dalším kovem vystupujícím v polosandwichových komplexech jako centrální atom může být také niob. [30] Jsou známy též polosandwichové komplexy s η^7 -cykloheptatrienidovými(-1) anionty, kde přechodné kovy IV. B a VI. B skupiny a vanad vystupují jako centrální atomy [31]. Od objevení uranocenu

[U(COT)₂] (COT = cyklooktatetraenid(-2)), se v organouranové chemii začal více studovat tento typ ligandu, díky němuž bylo nasyntetizováno mnoho polosandwichových a smíšených sandwichových derivátů. Jedněmi z nich jsou nové permethylpentalenové komplexy U^{IV} a jeho deriváty (obr. 8). [32]



Obr. 8: Permethylpentalenový komplex U^{IV} [32].

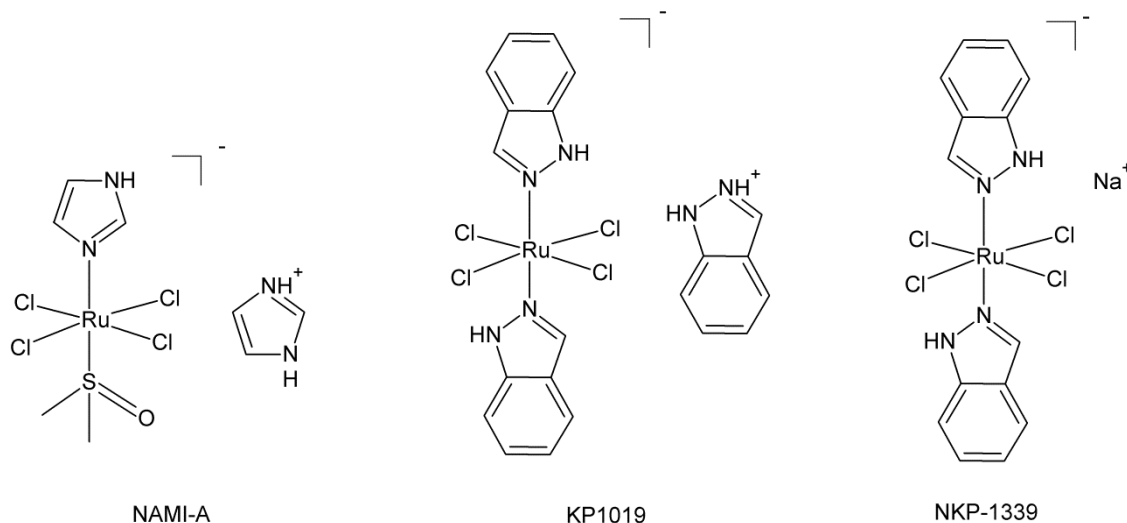
2.2.3 Biologická aktivita

Komplexy ruthenia, které jsou ve velké míře používány jako katalyzátory pro chemické reakce, se též ukázaly jako slibné látky vykazující protinádorovou aktivitu. Je známo mnoho sloučenin ruthenia s různou strukturou i vlastnostmi. Například koordinační sloučeniny, které při interakci s biologickým cílem ztrácejí ligand. Známé jsou vícejaderné komplexní sloučeniny schopné interkalace do DNA. Nebo také organokovové látky, jejichž navázání na nádorovou buňku vede k tvorbě reaktivních forem kyslíku a tím dochází k chemické modifikaci molekuly v buňce [33], [60]

2.2.3.1 Komplexy Ru^{III} obsahující indazol a imidazol

V posledních letech byla prozkoumána řada sloučenin ruthenia pro jejich schopnost inhibovat růst nádorových buněk. Hlavní důraz byl kladen na interakci mezi aktivními komplexy ruthenia s jejich možným biologickým cílem - DNA, RNA, transferrin, albumin a cytochrom c. Důležitý vědecký průlom se odráží v objevení tří nejslibnějších Ru^{III} komplexů. Jedná se o NAMI-A, KP1019 a NKP-1339 (obr. 9), které díky své aktivitě vstoupily do

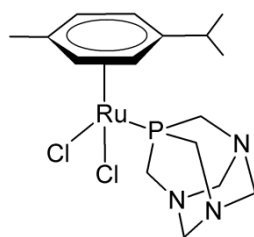
klinických testů. Hlavní účinek NAMI-A je zastavit šíření nádorových buněk do dalších částí těla, což je proces zvaný metastáza. Sloučenina byla shledána zvláště účinná vůči karcinomu plic. KP1019 je studována vůči buněčným liniím kolorektálního karcinomu (kolorektální karcinom = nádorové onemocnění tlustého střeva a konečníku). [33], [34]



Obr. 9: Chemická struktura Ru^{III} komplexů obsahující indazol a imidazol [34].

2.2.3.2 Ru^{II} polosandwichové látky

Organokovové sloučeniny jsou obecně považovány za toxické a nestabilní. Na vzduchu a ve vodě podléhají rozkladu. Je však nutno zmínit, že existuje stále větší počet takovýchto komplexních sloučenin, které jsou stabilní, ve vodě rozpustné, používané v průmyslové katalýze a jsou důležitým tématem pro studium biologicky aktivních látek. Arenové komplexy ruthenia a jejich protinádorové a antimetastatické vlastnosti byly studovány Dysonem a Sadlerem et al. [35] V roce 2001 byla pozorována protinádorová aktivita u komplexu ruthenia, známém pod názvem RAPTA-C (obr. 10). Ačkoliv RAPTA-C vykazuje pouze nízkou aktivitu *in vitro*, je naopak velmi aktivní *in vivo*. Hlavním důvodem, proč jsou arenové komplexy ruthenia dostatečně aktivní, je jejich amfifilní vlastnost za předpokladu, že arenový ligand je hydrofobní a kovové centrum je naopak hydrofilní. [34], [35], [40]

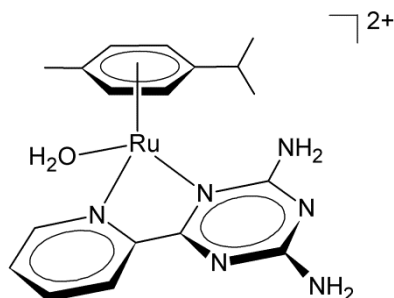


Obr. 10: RAPTA-C [34].

Během posledního desetiletí arenové komplexy ruthenia přitáhly velkou pozornost díky své chemické stabilitě, stabilitě na vzduchu, rozpustnosti ve vodě a strukturní rozmanitosti. Tyto arenové π -ligandy (např. *p*-cymen) jsou silně vázány na centrální atom a jsou relativně inertní vůči substitučním reakcím. Tři zbývající koordinační místa na rutheniu mohou obsadit další ligandy. Organokovové sloučeniny ruthenia, které obsahují vázaný aren jako π -ligand a různé mono- nebo bidentátní ligandy, jsou považovány za slibné kandidáty v léčbě rakoviny. [36] Například komplex typu $[\text{Ru}(\text{aren})(\text{en})\text{Cl}]^+$ (en = ethylendiamin), studovaný profesorem Sadlerem a jeho spolupracovníky, ukázal vysoký účinek protinádorové aktivity vůči různým rakovinným buněčným liniím. Cytotoxická aktivita mnoha arenových komplexů ruthenia obecně souvisí se zvýšenou afinitou k DNA. Tato afinita však závisí na konkrétním typu ligandu obsaženém v komplexu. Různé typy ligandů jsou proto stále vyvíjeny a studovány v kombinaci s těmito komplexy ruthenia pro zlepšení jejich vlastností k navázání se na DNA, taktéž aby bylo dosaženo slibné biologické aktivity a maximalizace jejich účinnosti jako terapeutické látky. [37]

Polosandwichové organokovové komplexy Ru^{II} s obecným vzorcem $[\text{Ru}(\text{aren})\text{XYZ}]^{0/+}$ mají různou aktivitu vzhledem k typu ligandů, které se vážou na centrální kov. Pokud X, Y a Z jsou monodentátní ligandy, sloučeniny vykazují nízkou cytotoxicitu kvůli rychlé hydrolyze a slabé afinitě na DNA (ačkoliv výjimku tvoří již zmíněný RAPTA-C), která se zvyšuje s velikostí arenů. Ztráta cytotoxicity se objevuje i v komplexech, kde X, Y jsou 1,10-fenanthrolin nebo 2,2'-bipyridin. V případě 2,2'-bipyridinu může být jeho aktivita obnovena 3,3'-hydroxylací aromatických kruhů. Použití jiného silného π -akceptorového chelatačního ligandu, hydroxy- nebo *N,N*-dimethylfenylazopyridinu (Z je jodid), vede k hydrolyticky inertním komplexům, jenž dokážou inhibovat rakovinné buňky jiným způsobem. Tím může být oxidace glutathionu a produkce reaktivních forem kyslíku v buňce (ROS). [38] Příkladem polosandwichových komplexů ruthenia s cytotoxickými účinky mohou být Ru^{II} arenové aqua-komplexy s 2,4-diamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazinovým ligandem, které ukázaly slibné funkční vlastnosti. Nejlepší výsledky byly prokázány u ruthenatého aqua-komplexu (obr. 11).

Studie *in vitro* naznačily slibné cytotoxické účinky na A2780 (karcinom vaječníku) ($IC_{50} = 6,58 \mu M$). Navíc se zjistilo, že sloučenina je méně toxická u plicních fibroblastů (MRC-5) než cisplatina. [39]

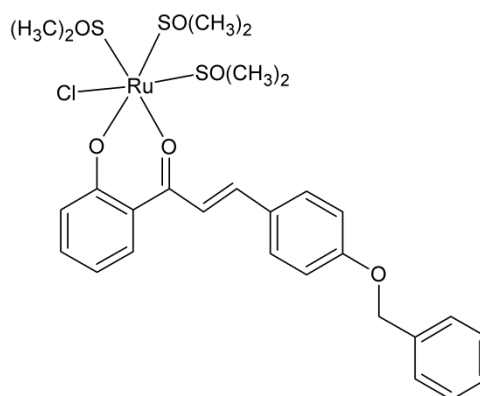


Obr. 11: Chemická struktura Ru^{II} arenového aqua-komplexu [39].

Thiosemikarbazony (TSC) dosáhly značné pozornosti díky široké škále farmakologických účinků. Arenové polosandwichové komplexy ruthenia s TCS ligandy a 9-antracenyl-TSC deriváty byly dále testovány *in vitro* na jejich antiproliferační aktivitu vůči karcinomu žaludku SGC-7901 ($IC_{50} = 17,0 \mu M$) karcinomu jater BEL-7404 ($IC_{50} = 17,1 \mu M$) a embryonálním buňkám ledvin HEK-293T. Avšak některé, ve srovnání s cis-platinou, měly srovnatelné hodnoty IC_{50} . [40]

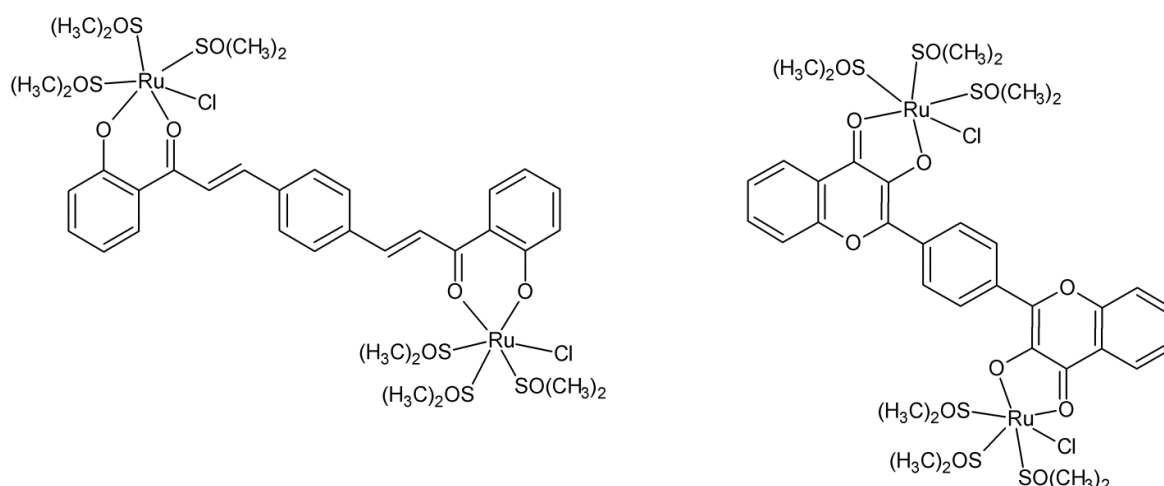
2.2.3.3 Ru komplexy s chalkonovým ligandem

Studie komplexace 2'-hydroxychalkonů s některými přechodnými kovovými ionty (Cu^{II} , Pt^{II} , Pd^{II} , Co^{II} , Ni^{II}) vedly k syntéze stabilních sloučenin. [41] Bylo také připraveno a charakterizováno množství komplexů s přechodným kovovým iontem Ru^{II} . Tyto komplexy byly získány reakcí *cis*- $RuCl_2(DMSO)_2$ (DMSO = dimethylsulfoxid) s vhodnými chalkony s obecným chemickým vzorcem $[RuL_2(DMSO)_2]$ (L = chalkon). Dále byly připraveny takové komplexní sloučeniny Ru^{II} s chalkony a flavonoidy, které byly dále testovány *in vitro* vůči buněčným liniím Daltonova lymfomu ($IC_{50} = 0,319 \mu M$) (obr. 12). [42]



Obr. 12: Komplex Ru^{II} s chalconovým ligandem [42].

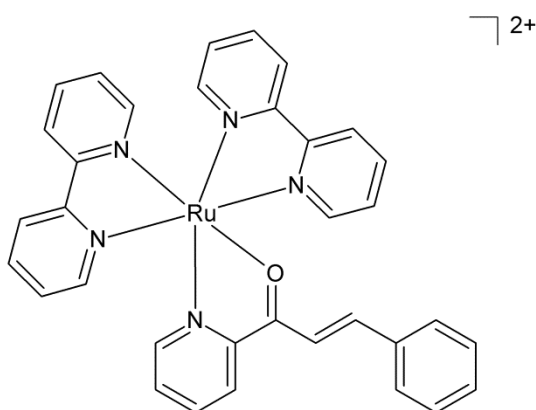
Dalším z příkladů mohou být komplexy Ru^{II} s obecným chemickým vzorcem $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{PPh}_3)(\text{L})(\text{B})]$, kde L je 2'-hydroxychalkon a B je PPh_3 , pyridin, nebo piperidin. Tyto sloučeniny byly použity jako katalyzátory pro aerobní oxidaci alkoholů a taktéž byly provedeny studie *in vitro* vůči různým bakteriím a plísním. Výsledky ukazují, že komplexy jsou toxickejší, než samotné ligandy. [43] Také byly připraveny binukleární Ru^{II} komplexy s bis-chalkony a bis-flavonoly (obr. 13), u nichž bylo studováno fotoštěpení DNA a inhibice topoisomerázy I. Komplex s bis-chalkonovým ligandem má vysoce konjugovanou strukturu, což mu umožňuje interkalaci s DNA do malého žlábků. V druhém případě komplex obsahující bis-flavonol upřednostňuje vazbu do velkého žlábků. [44]



Obr. 13: Binukleární Ru^{II} komplexy s bis-chalkonem a bis-flavonolem [44].

Byly připraveny i oktaedrické Ru^{III} komplexy typu $[\text{RuX}(\text{EPh}_3)(\text{L})_2]$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$; $\text{E} = \text{P}, \text{As}$; $\text{L} = 2'$ -hydroxychalkon) vykazující katalytickou aktivitu při oxidaci primárních a sekundárních alkoholů na jejich odpovídající aldehydy a ketony v přítomnosti NMO

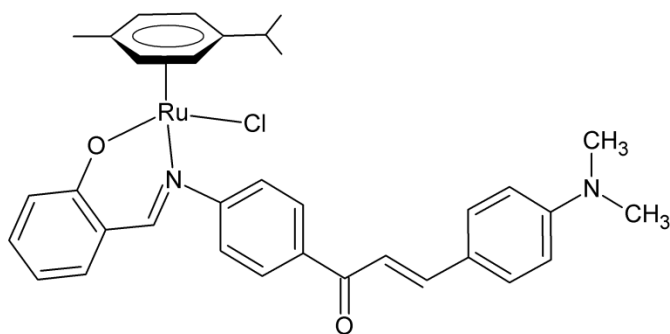
(*N*-methylmorfolin-*N*-oxid). [45] Dalším z příkladů jsou polypyridylové komplexy Ru^{II} a Ru^{III} obsahující pyridin nebo chalkon jako koligand, u kterých byla testována jejich cytotoxicita na osmi rakovinných buněčných liniích a anti-HIV aktivita. Nejslibnější protinádorovou aktivitu prokázal komplex na obr. 14 vůči HCT-8 (ileocekální adenokarcinom) (IC₅₀ = 1,0 μM) (ileocekální oblast = oblast přechodu tenkého a tlustého střeva) a adenokarcinomu vaječníku (IC₅₀ = 4,1 μM). Anti-HIV účinky vykazoval pouze komplex s pyridinovým ligandem, ne však s chalkonovým. [46]



Obr. 14: Polypyridylový komplex ruthenia [46].

2.2.3.4 Polosandwichové komplexy Ru^{II} s chalkonovým ligandem

Byla syntetizována arenová sloučenina Ru^{II} s bidentátním *N,O*-chalkonovým ligandem (obr. 15) a dále studována pro její možnou biologickou aktivitu. Výsledky však nebyly zrovna ideální, jelikož komplex vykazoval nízkou aktivitu vůči chronické myeloidní leukémii (K-562) (IC₅₀ = 53,25 μM). [47]

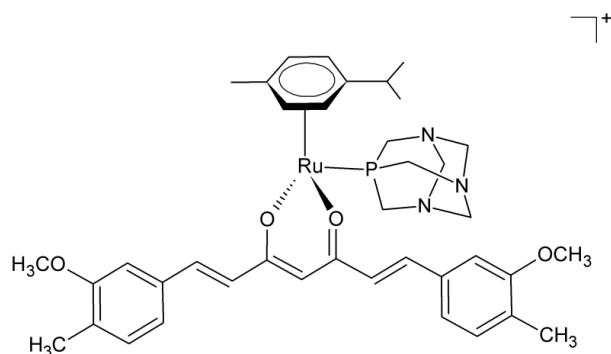


Obr. 15: Arenový komplex Ru^{II} s bidentátním *N,O*-chalkonovým ligandem [47].

2.2.3.5 Polosandwichové komplexy Ru^{II} s bidentátními *O,O*-ligandy

Komplexní sloučeniny nesoucí *N,N*-chelátové ligandy prokázaly cytotoxicitu srovnatelnou s cispatinou v řadě buněčných linií [3], [48]. Byla zkoumána i biologická aktivita u *O,O*- a *S,O*- ligandů koordinovaných na kovová centra Ru^{II}. [49], [55] Deriváty chinolonů jsou reprezentované zejména syntetickými antibakteriálními látkami, které jsou využívány v klinické praxi (kyselina nalidixová, ofloxacin, cinoxacin). Jsou vhodné jako ligandy obsahující *O, O*-chelátový motiv. Navíc bylo prokázáno, že tyto látky i jejich značné množství derivátů vykazují inhibiční vlastnosti na rakovinné buňky. Arenové komplexy Ru^{II} s těmito deriváty chinolonů byly připraveny a dále studovány *in vitro* vůči několika nádorovým buněčným liniím. Slibné výsledky vykazoval komplex Ru^{II} s ofloxacinem vůči rakovinným buněčným liniím karcinomu vaječníku (IC₅₀ = 18μM) [50]

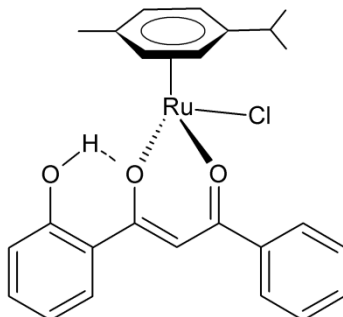
Byly studovány arenové komplexy Ru^{II} s kurkuminovými ligandy (obr. 16). Kurkumin je bioaktivní látka extrahována z oddenků kurkumy (indický šafrán), který vykazuje mnoho zajímavých léčivých vlastností. Byl rozsáhle studován jako chemoterapeutické činidlo a prokázal také protizánětlivé a antioxidantní účinky. Ovšem kurkumin je nestálý a nerozpustný ve vodě. U syntetizovaných ve vodě rozpustných komplexů se studovala jejich antiproliferační aktivita *in vitro* vůči karcinomu vaječníku (IC₅₀ = 1,15μM) a ledvinovým buňkám (IC₅₀ = 30μM). Tyto látky ukázaly slibnou inhibici růstu nádorových buněk, dokonce jsou některé účinnější než cisplatina a jsou méně toxické na zdravé ledvinové buňky. [51], [52]



Obr. 16: Příklad arenového komplexu s kurkuminovým ligandem [51].

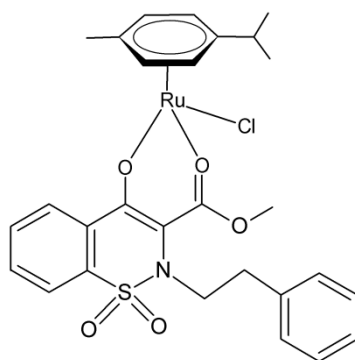
Další polosandwichové komplexy ruthenia byly připraveny a poté studovány z hlediska jejich možné protinádorové aktivity. Jedná se o arenový komplex Ru^{II} s *ortho*-

hydroxydibenzoylmethanem (HDBH) s obecným chemickým složením $[\text{Ru}(p\text{-cym})(\text{HDB})\text{Cl}]$ (obr. 17). Cytotoxické účinky vůči nádorovým buněčným liniím vaječníku měly hodnotu $\text{IC}_{50} = 57,5\mu\text{M}$. [53]



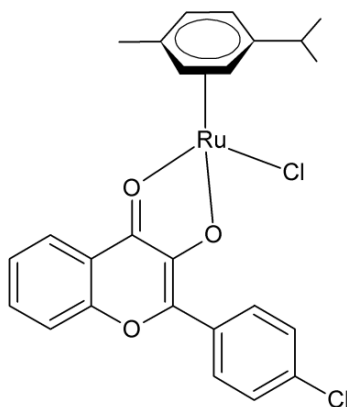
Obr. 17: Arenový komplex Ru^{II} s obecným chemickým složením $[\text{Ru}(p\text{-cym})(\text{HDB})\text{Cl}]$ [53].
ortho-hydroxydibenzoylmethan (HDBH)

Oxicamy jsou skupinou NSAID (nesteroidní protizánětlivé léky). Zejména meloxicam a piroxicam mají široké uplatnění v medicíně u řady zánětlivých a revmatických onemocnění. Proto se začalo uvažovat o tom, připravit sloučeninu nesoucí bioaktivní oxicam s organokovovým $\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-}p\text{-cymen})$ fragmentem známým pro jeho protirakovinné účinky. Výsledkem byla syntéza čtyř Ru^{II} arenových komplexů nesoucích *O,O*-bidentátní ligandy a *in vitro* studie vůči karcinomu tlustého střeva HCT116 a buněčné linie adenokarcinomu prsu MDA-MB-231. Ukázalo se, že cytotoxicita byla silně závislá na lipofilitě sloučenin. Nejvíce lipofilní komplex je zobrazen na obr. 18. Jeho aktivita byla nejvíce účinná v buňkách HCT116 ($\text{IC}_{50} = 80\mu\text{M}$). [54]



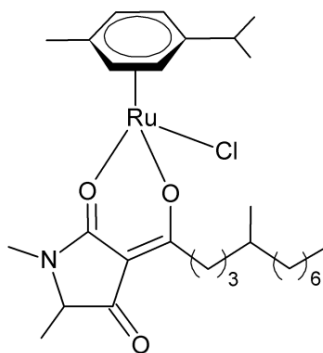
Obr. 18: Komplexní sloučenina Ru^{II} s derivátem oxicamu [54].

Dále byly připraveny polosandwichové komplexy Ru^{II} nesoucí bioaktivní 3-hydroxyflavonový ligand s cílem studovat jejich cytotoxické účinky *in vitro*. Protirakovinná aktivita byla stanovena u několika rakovinných buněčných linií. Komplex na obr. 19 prokázal velmi slibné účinky proti karcinomu vaječníku ($\text{IC}_{50} = 0,86\mu\text{M}$). [55]



Obr. 19: Ru^{II} komplex s 3-hydroxyflavonovým ligandem [55].

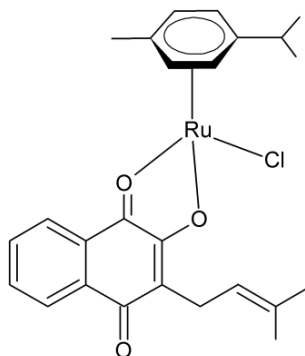
Melophlin C byl izolovaná z mořské houby a dále zkoumána pro svoji bioaktivitu. [56] Byla připravena polosandwichová komplexní sloučenina Ru^{II} obsahující bidentátní *O,O*-ligand s touto látkou (obr. 20) a studována aktivita na třech rakovinných buněčných liniích. Největší cytotoxické účinky prokázal komplex u A-498 (karcinom ledvin) ($\text{IC}_{50} = 1,0\mu\text{M}$). [57]



Obr. 20: Polosandwichový komplex Ru^{II} s melophlinem C [57].

Je známá i komplexní sloučenina Ru^{II} s lapacholem (obr. 21), která byla testována na několika liniích nádorových buněk. Lapachol vykazuje antibiotické a protirakovinné účinky a byl zkoumán v klinických testech jako protinádorové činidlo. [58] Proto se připravily sloučeniny obsahující bioaktivní lapachol a organokovovou skupinu pro možné cytotoxické účinky. Studie ukázaly, že samotný ligand (lapachol) vykazuje nižší cytotoxickou aktivitu než

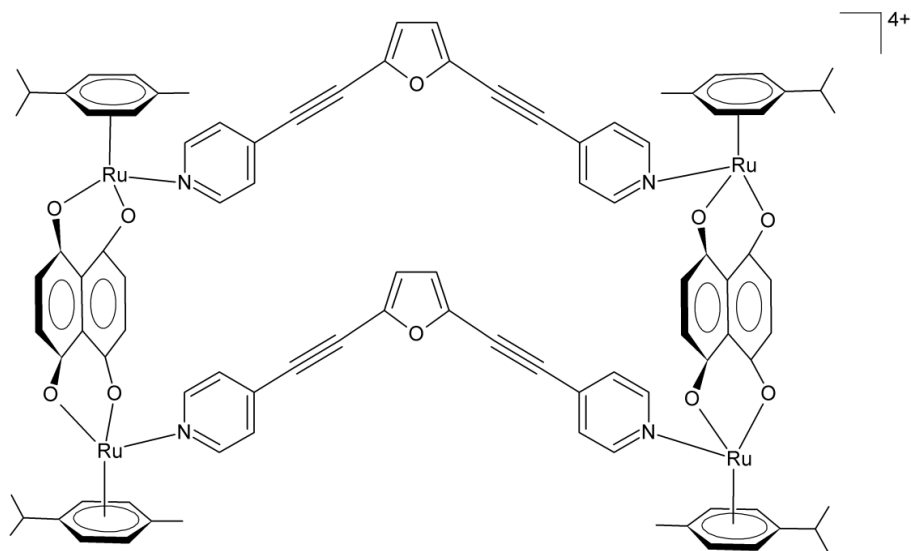
komplexní sloučenina ruthenia s tímto ligandem. Cisplatinou je v porovnání s komplexem $[\text{Ru}(p\text{-cym})(\text{L})\text{Cl}]$ ($\text{L} = \text{lapachol}$) aktivnější u všech pěti testovaných nádorových buněčných linií (např. u rakovinné buněčné linie vaječníku: komplex $\text{IC}_{50} = 4,1\mu\text{M}$ v porovnání s cisplatinou $\text{IC}_{50} = 0,14\mu\text{M}$). [59]



Obr. 21: Komplexní sloučenina Ru^{II} s lapacholem [59].

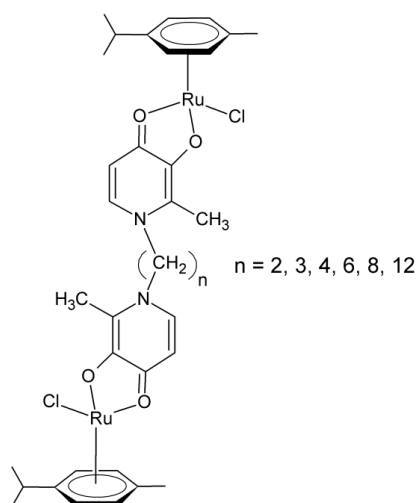
2.2.3.6 Vícejaderné Ru^{II} komplexy

Studie ukázaly, že i supramolekulární sloučeniny ruthenia vykazují biologickou aktivitu. Byly nasyntetizovány arenové supramolekulární komplexy ruthenia se zaměřením na potenciální protinádorovou aktivitu. Studie *in vitro* a *in vivo* vůči HCT-15 (střevní nádorová buněčná linie) ($\text{IC}_{50} = 27\mu\text{M}$) a AGS (rakovinné buňky žaludku) ($\text{IC}_{50} = 23\mu\text{M}$) naznačily, že tyto látky inhibovaly růst nádorových buněčných linií, zvláště pak komplex na obr. 22. [60]



Obr. 22: Arenový supramolekulární komplex ruthenia [60].

Dále to mohou být dvoujaderné arenové komplexy Ru^{II} obsahující bis(piridino)alkanový můstkující ligand, které byly připraveny a dále testovány jejich cytotoxické účinky vůči mnoha buněčným liniím (obr. 23). Antiproliferační aktivita byla prokázána u buněk karcinomu tlustého střeva (SW480) ($\text{IC}_{50} = 76\mu\text{M}$ pro $n=2$; $\text{IC}_{50} = 0,29\mu\text{M}$ pro $n=12$) a buněk A2780 ($\text{IC}_{50} = 84\mu\text{M}$ pro $n=2$; $\text{IC}_{50} = 1,5\mu\text{M}$ po $n=12$). Studie naznačily, že s délkou alkanového řetězce (n) se zvyšují cytotoxické účinky. Čím delší je řetězec, tím je komplex hydrofobnější, což přispívá ke zvýšení transportu komplexu do buněk a tím zvýšení jeho antiproliferačních vlastností. [61]



Obr. 23: Dvoujaderný Ru^{II} arenový komplex:

1,2-Bis{chlorido[3-(oxo- κO)-2-methyl-4(1H)pyridinonato- $\kappa O4$](*p*-cym)ruthenium(II)}ethan
kde $n = 2$ [61].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a přístroje

Materiály:

2'-hydroxyacetofenon (99%) (VWR Chemicals) 2'-hydroxy-4'-methoxyacetofenon (99%) (VWR Chemicals), 4-methoxybenzaldehyd (98%) (Sigma-Aldrich Chemistry), 2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyd (99%) (Sigma-Aldrich Chemistry), 4-(dimethylamino)-benzaldehyd (100%) (Sigma-Aldrich Chemistry), 3,4,5-trimethoxybenzaldehyd (98%) (Sigma-Aldrich Chemistry), hydroxid sodný (100%) (Sigma-Aldrich Chemistry), α -terpinen (90%), (Sigma-Aldrich Chemistry), chlorid ruthenitý hydrát (35-40%) (VWR Chemicals), *n*-hexan (99%) (PENTA s.r.o), kyselina chlorovodíková (35%) (PENTA s.r.o), ethanol (96%), (PENTA s.r.o), methanol (99,97%) (PENTA s.r.o), ethylacetát (99,96%) (PENTA s.r.o), dichlormethan (99,96%) (PENTA s.r.o), chloroform (99,87%) (PENTA s.r.o), diethylether (99,7%) (PENTA s.r.o), acetonitril (99,80%) (PENTA s.r.o), bis(trimethylsilyl)amid sodný (95%) (Acros Organics), bis(trimethylsilyl)amid lithný (97%) (Acros Organics).

Přístroje:

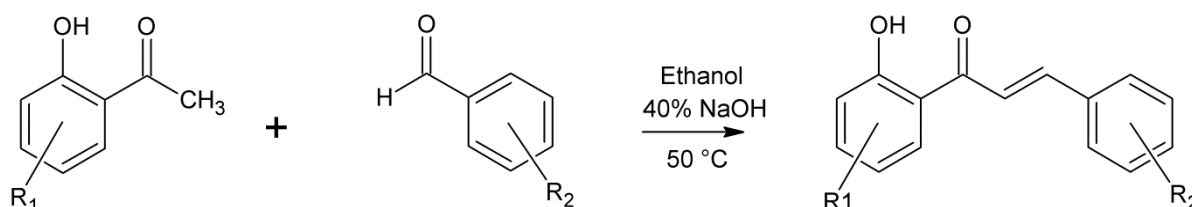
- 400 MHz NMR spektrometr firmy Varian pro měření spekter vysokého rozlišení vzorků v roztoku
- C, H, N, S chemická analýza prvků - Thermo Scientific Flash 2000 Analyzátor
- FT-IR spektrometr ThermoNicolet Nexus 670 (transmisní, ATR, DRIFT techniky) s FT-Ramanovým modulem Nicolet NXR 9650 s NXE Genie germaniovým detektorem
- HPLC s vícedetektorovou detekcí (DAD spektrálním detektorem + hmotnostním spektrometrem s indukčně vázaným plazmatem ICP-MS) Agilent 1260 + Agilent ICP-MS 7700x
- Mikrovlnný reakční systém Monowave 300 (Anton Paar) - reaktor pro mikrovlnnou syntézu se širokým rozsahem provozních podmínek (300 °C, 30 bar)
- Monokrystalový difraktometr Oxford Diffraction Xcalibur2 vybavený CCD detektorem Sapphire2 určený k měření v rozsahu teplot 300-90 K

3.2 Syntéza 2'-hydroxychalkonů

Připravila jsem celkem pět derivátů 2'-hydroxychalkonů, které jsem dále použila jako bidentátní *O,O*-ligandy k syntéze polosandwichových Ru^{II} komplexů:

2-hydroxy-5-nitro-4'-methoxy-2'-hydroxychalkon (**HL**₁), 4,4'-dimethoxy-2'-hydroxychalkon (**HL**₂), 4-(dimethylamino)-2'-hydroxychalkon (**HL**₃), 3,4,5-trimethoxy-2'-hydroxychalkon (**HL**₄), 4-methoxy-2'-hydroxychalkon (**HL**₅).

Při syntézách těchto ligandů jsem postupovala s malými modifikacemi dle publikovaných postupů [62] a [63]. Zmíněné 2'-hydroxychalkony jsem připravila podle Claisen-Schmidty kondenzace, v níž jsem nechala reagovat derivát acetofenonu s derivátem benzaldehydu v přítomnosti báze (obr. 24).

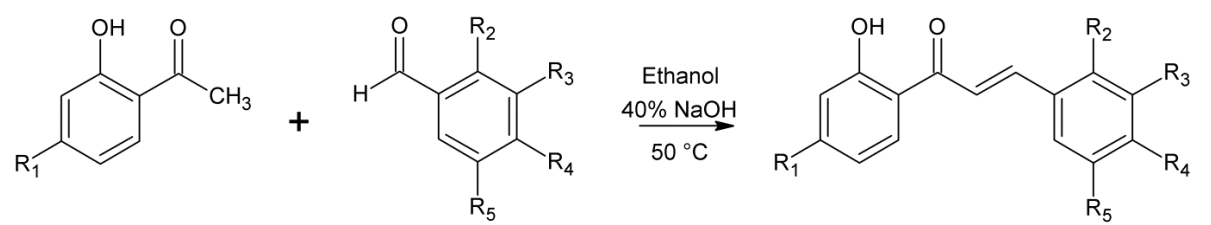


Obr. 24: Obecný postup syntézy ligandů [9].

Syntézy všech pěti ligandů byly takřka totožné. Navážky výchozích látek jsem si vypočítala pro teoretický výtěžek 3mmol produktu. Nejprve jsem rozpustila příslušný derivát acetofenonu (2'-hydroxyacetofenon 0,36ml; 2'-hydroxy-4'-methoxyacetofenon 0,50g) ve 20 ml ethanolu, přidala 1,6ml 40% roztoku NaOH a nechala důkladně míchat deset minut. Poté jsem k roztoku pomalu přidávala určitý derivát benzaldehydu (2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyd 0,50g; 4-methoxy-benzaldehyd 0,33ml; 4-(dimethylamino)-benzaldehyd 0,48g; 3,4,5-trimethoxybenzaldehyd 0,60g). Takto připravený roztok jsem nechala zahřívát pod zpětným chladičem na elektromagnetické míchačce při teplotě 50 °C po dobu 16 hodin. Dále jsem roztok ochladila, přidala k němu studenou destilovanou vodu (zhruba 20ml) a neutralizovala 1M HCl. Vzniklou sraženinu jsem zfiltrovala a v posledním kroku jsem důkladně promyla výsledný produkt destilovanou vodou (5x5ml) a nakonec ho nechala vysušit v exsikátoru nad KOH.

HL₁: Tmavě žlutý prášek. Výtěžnost 62 %, **HL**₂: Žlutý prášek. Výtěžnost 50 %, **HL**₃: Fialové krystalky. Výtěžnost 65 %, **HL**₄: Světle žluté jehličky. Výtěžnost 48 %, **HL**₅: Oranžový prášek. Výtěžnost 70 %.

Tab. 1: Obecný postup syntézy vybraných derivátů 2'-hydroxychalkonů **HL₁-HL₅** s vybranými substitučními skupinami na arylových kruzích.

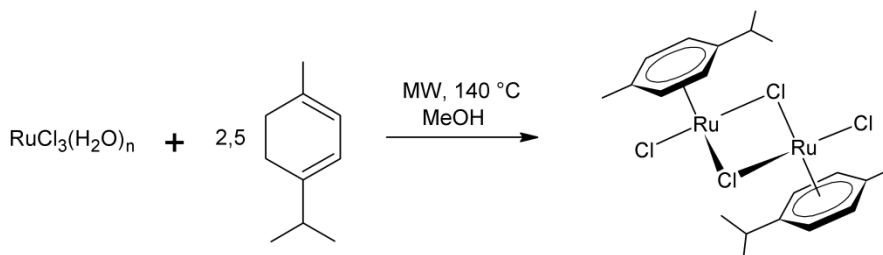


Ligand	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
HL ₁	OCH ₃	OH	H	H	NO ₂
HL ₂	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H
HL ₃	H	H	H	N(CH ₃) ₂	H
HL ₄	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
HL ₅	H	H	H	OCH ₃	H

3.3 Syntéza komplexních sloučenin ruthenia s 2'-hydroxychalkony

3.3.1 Syntéza [Ru(*p*-cym)Cl₂]₂

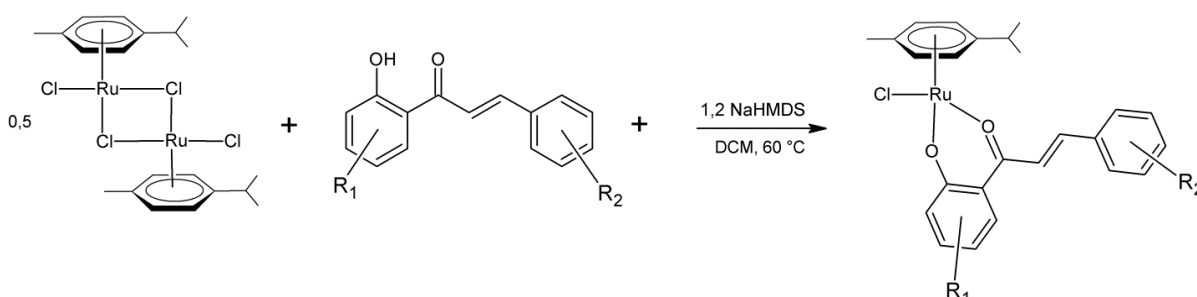
Při syntéze [Ru(*p*-cym)Cl₂]₂ jsem postupovala podle článku [64]. Nejprve jsem RuCl₃·xH₂O (průměrný obsah x=3) (2,0mmol; 0,50g) důkladně rozpustila v 5ml methanolu ve vialce určené do reaktoru pro mikrovlnnou syntézu. Poté jsem přidala α -terpinen (5,7mmol; 0,94ml). Takto připravený roztok byl vložen do mikrovlnného reakčního systému, míchán a zahříván na teplotu 140 °C po dobu 2 minut (obr. 25). Dále jsem provedla 5x extrakci pomocí *n*-hexanu, abych odstranila případně nezreagovaný zbytek α -terpinenu z roztoku. Nakonec jsem nechala čistý methanolický roztok s produktem zahustit ke krystalizaci a výsledný dimer [Ru(*p*-cym)Cl₂]₂, ve formě tmavě červených krystalů, jsem izolovala filtrací a použila jako výchozí látku k syntéze komplexů. Výtěžnost 59 %.



Obr. 25: Potup syntézy [Ru(*p*-cym)Cl₂]₂ [64].

3.3.2 Syntéza komplexů s předpokládaným složením [Ru(*p*-cym)LCI]

U syntéz komplexů jsem vycházela z publikovaných postupů [65], [66] a [67]. Ačkoliv jsem postupovala dle uvedených publikací, musela jsem postupy upravovat, jelikož nevzniklo chemické individuum. Po změření elementární analýzy neodpovídalo vypočítané složení uhlíku skutečným hodnotám, a proto jsem se následně rozhodla modifikovat postupy syntézy. V člancích se vědci zabývají syntézou a charakterizací organokovových sloučenin Ru^{II} s deriváty acetylacetonu (*O,O*-ligandy) obecného složení [Ru(*p*-cym)(F₃C-acac-Ar)Cl] (Ar = fenyl), [Ru(*p*-cym)LLCl] (LL = 1-benzoylacetone). Při syntézách komplexních sloučenin jsem vycházela z připraveného dimeru [Ru(*p*-cym)Cl₂]₂ a derivátů 2'-hydroxychalkonů (obr. 26)



Obr. 26: Obecný postup syntézy komplexů obecného složení [Ru(*p*-cym)(L)Cl], kde L = 2'-hydroxychalkon a NaHMDS = |B| = báze.

V publikovaných člancích, ze kterých jsem vycházela, používali methanol jako rozpouštědlo. Po několika pokusech připravit výsledné komplexy jsem zjistila, že je nutno použít suchý methanol, protože případná voda a vlhkost nedovolila vzniku požadovaných produktů, jelikož výsledky elementární analýzy neodpovídali požadovanému složení komplexů. Ukázalo se však, že ani suchý methanol není ideální rozpouštědlo pro syntézu těchto komplexů, poněvadž se stalo, že po rekrystalizaci produktu z methanolu vykrytalizoval čistý ligand, což se potvrdilo jak elementární analýzou, tak rentgenovou strukturální analýzou. Poté jsem vyzkoušela směs methanolu/DCM v poměru 1:1 a směs 10% methanolu v DCM. Ani tyto směsi rozpouštědel nebyly ideální, a proto jsem nakonec přešla pouze na DCM, ve kterém je vedlejší produkt (NaCl) nerozpustný a rovnováha reakce se proto posouvá směrem k požadovanému produktu. Jako bázi pro přípravu solí ligandů jsem postupně použila methoxid sodný, NaOH, triethylamin, LiHMDS a NaHMDS. Jako nejvhodnější jsem shledala NaHMDS, jelikož se jedná o silnou bázi, která deprotonuje

pouze kyselý vodík na 2'-OH. Syntézy jsem nejprve prováděla za laboratorní teploty. Produkty po rekrystalizaci však nebyly čisté, a proto jsem začala roztok zahřívat pod zpětným chladičem na 60 °C. Délka reakcí byla taktéž měněna, pohybovala se od 3 hodin, 6 hodin, 24 hodin až po tři dny. Díky vybavení laboratoře jsem začala používat dusík, který byl ovšem vlhký a nedovolil vzniku produktu. Poté, co jsem se přestěhovala do jiné laboratoře, kde bylo možné použít argon, shledala jsem, že je účinnější než dusík. Nakonec bylo potřeba izolovat produkt z roztoku. Zkoušela jsem vysrážet komplex z roztoku pomocí *n*-hexanu, kdy jsem poměry objemů roztoku a *n*-hexanu měnila v závislosti na různé substituci na 2'-hydroxychalkonech. Sraženina však, podle elementární analýzy, neměla patřičné složení. Proto jsem nechala roztok odpařit dosucha, na dně nádoby se vytvořila souvislá vrstva, kterou jsem rekrystalizovala z acetonitrilu a izolovala filtrací. Nakonec jsem se začala soustředit pouze na přípravu komplexní sloučeniny s jedním ligandem **HL₄**.

Konečné shrnutí možné přípravy komplexů, podle které jsem vycházela: Nejprve jsem rozpustila 1,0mmol příslušného ligandu **HL₁** (0,32g); **HL₂** (0,28g); **HL₃** (0,27g); **HL₄** (0,31g); **HL₅** (0,25g) v 15ml dichlormethanu (DCM). Poté jsem bis(trimethylsilyl)amid sodný (NaHMDS) (1,2mmol; 0,23g) přidala k 15ml DCM. Oba roztoky jsem slila dohromady do dvouhrdlé baňky. Takto připravenou směs jsem nechala zahřívat na elektromagnetické míchačce pod zpětným chladičem při 60 °C 1 hodinu. Pak jsem roztok odpařila dosucha. Dále jsem si navázila potřebné množství [Ru(*p*-cym)Cl₂]₂ (0,5mmol; 0,31g) a rozpustila v 15ml DCM. Sůl ligandu jsem taktéž rozpustila v 15ml DCM a přilila k ní připravený roztok [Ru(*p*-cym)Cl₂]₂. V tomto kroku jsem nechala do baňky foukat argon. Opět jsem roztok nechala zahřívat na elektromagnetické míchačce pod zpětným chladičem při 60 °C 3 hodiny. Tmavě červený roztok jsem zfiltrovala, abych se zbavila NaCl (65mg), a filtrát jsem dala na 1 den do lednice. Dále jsem roztok odpařila na vakuové odparce dosucha a rekrystalizovala z methanolu. Po ochlazení jsem vypadlou sraženinu zfiltrovala a filtrát, který obsahoval komplex, jsem nechala volně odpařit. Sraženinu jsem ještě nakonec rekrystalizovala z acetonitrilu, sraženinu zfiltrovala a promyla diethyletherem.

Vzhledem ke všem okolnostem a obtížím, které nastaly během pokusů připravit výsledné komplexy, se mi podařilo nasyntetizovat jednu látku odpovídající možnému komplexu **4**, která měla ze všech připravených vzorků nejpříznivější výsledek elementární analýzy a pokusila jsem se ji tedy charakterizovat dostupnými analytickými metodami, zda jde opravdu o výsledný komplex (**4**) s 3,4,5-trimethoxy-2'-hydroxychalkonem (**HL₄**).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Deriváty 2'-hydroxychalkonů

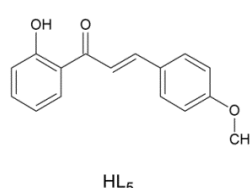
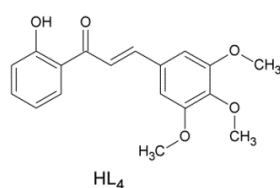
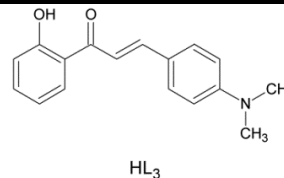
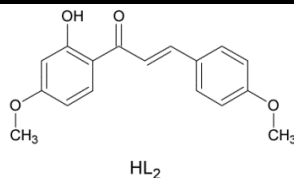
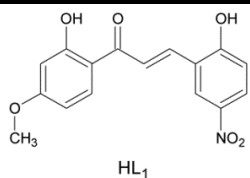
U syntéz ligandů jsem postupovala podle článků [62] a [63], jen jsem místo míchání roztoku aldehydu s acetofenonem za laboratorní teploty na elektromagnetické míchače zahřívala roztok po dobu 16 hodin při 50 °C pod zpětným chladičem.

Všech pět připravených derivátů 2'-hydroxychalkonů jsem vždy zkontrolovala pomocí TLC (tenkovrstvá chromatografie), zda jsou výsledné produkty čisté a neobsahují nezreagované výchozí látky. Malé množství produktu jsem rozpustila v methanolu a provedla TLC společně se standardem, kde mobilní fázi tvořil roztok *n*-hexanu s ethylacetátem v poměru 7:3. Na destičce (silufolu) se objevila jen jedna skvrna ve stejné výšce se standardem. Jedna skvrna se stejným R_f mi potvrdila, že ligand je čistý. Pokud se tak nestalo, provedla jsem rekrytalizaci z ethanol/voda v poměru 1:1.

Další metodou, kterou jsem použila pro zjištění empirického složení a čistoty všech pěti derivátů 2'-hydroxychalkonů, byla elementární analýza. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Elementární složení ligandů (vypočítané / skutečné)

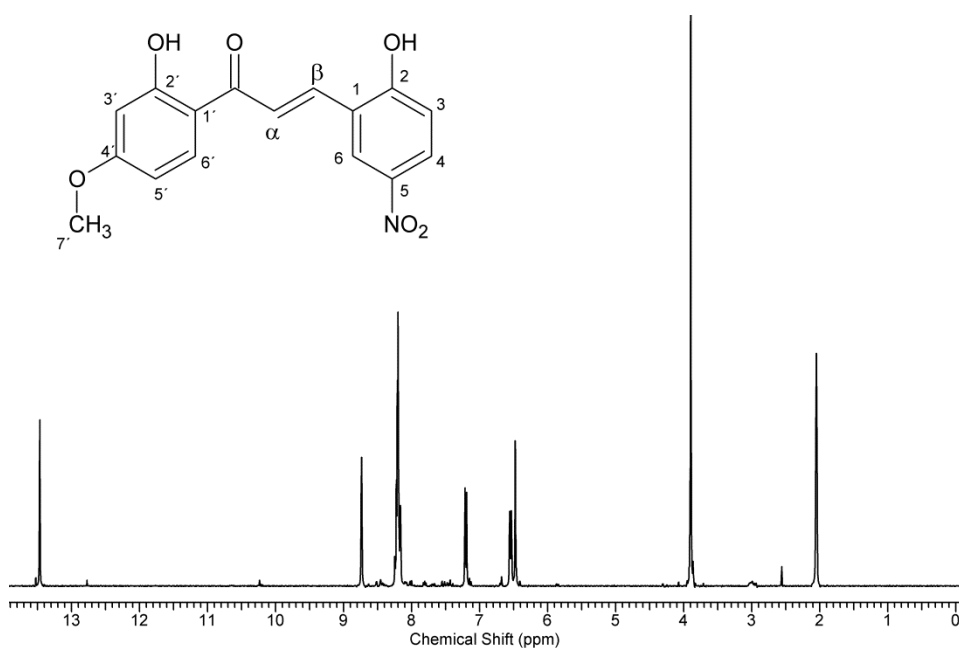
Označení a složení ligandu	N (%)	C (%)	H (%)
HL ₁ (C ₁₆ H ₁₃ NO ₆)	4,5 / 4,4	60,7 / 60,9	4,2 / 4,2
HL ₂ (C ₁₇ H ₁₆ O ₄)	0,0 / 0,0	71,5 / 71,8	5,9 / 5,7
HL ₃ (C ₁₇ H ₁₇ NO ₂)	5,4 / 5,2	76,0 / 76,3	6,9 / 6,4
HL ₄ (C ₁₈ H ₁₈ O ₅)	0,0 / 0,0	68,8 / 68,8	5,6 / 5,8
HL ₅ (C ₁₆ H ₁₄ O ₃)	0,0 / 0,0	75,4 / 75,6	5,7 / 5,6



4.2 NMR spektroskopie derivátů 2'-hydroxychalkonů

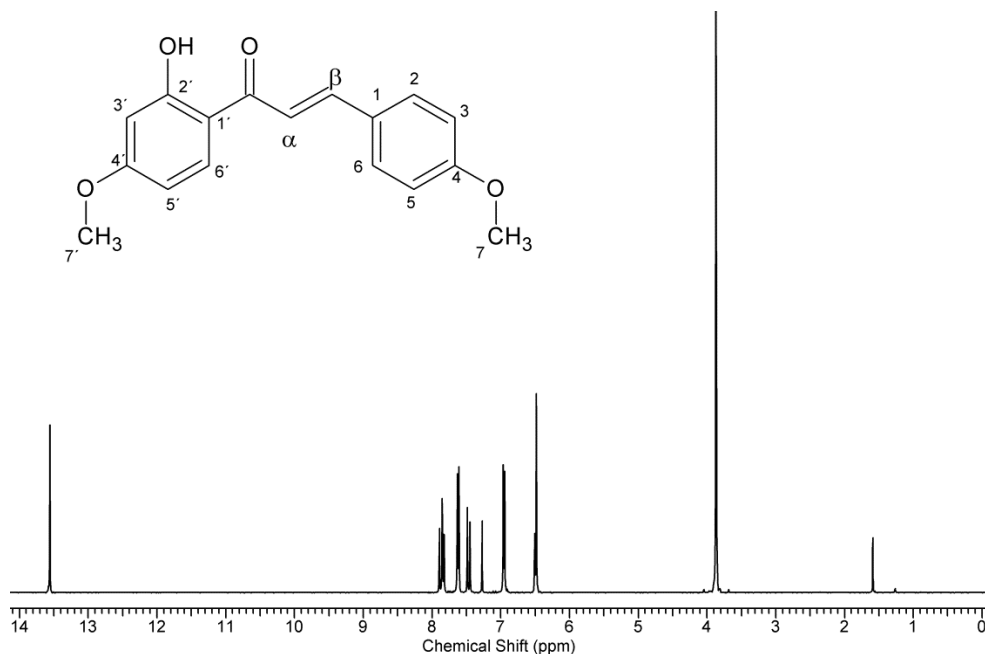
Byly naměřeny ^1H NMR spektra všech pěti ligandů. Vzorek byl rozpuštěn v deuterovaném chloroformu (u HL_1 v deuterovaném acetonu z důvodu špatné rozpustnosti) a ten se změřil na 400 MHz NMR spektrometru. Tato metoda mi prokázala přítomnost nasyntetizovaných ligandů v dostatečné čistotě. Interpretaci spekter ligandů jsem prováděla pomocí článků [68], [69], [70], [71] a [72].

Ve všech ^1H -NMR spektrech bylo pozorováno několik signálů. Největší chemický posun měl vždy vodík na 2'-OH skupině. Signály v oblasti od 9,00ppm do 5,00ppm patří aromatickým vodíkům. Dále byl ve spektru zaznamenán signál se 7,27ppm, který přísluší rozpouštědлу CDCl_3 a v případě spektra HL_1 signál 2,05ppm acetonu- d_6 . Nejméně odstíněné jsou neštěpené signály vodíků z methoxy skupin. Spektra jsou zobrazena na obrázcích 27-31.



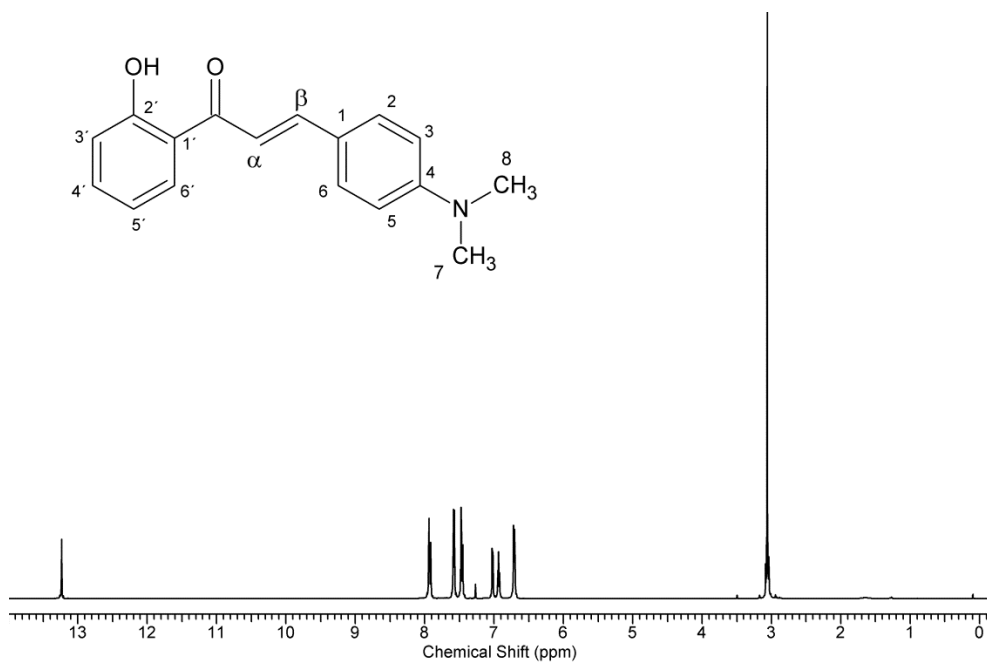
Obr. 27: ^1H -NMR spektrum HL_1 .

Popis spektra HL_1 : ^1H NMR (400 MHz, Aceton- d_6 , ppm): δ 13,46 (s, 1H, 2'-OH); 8,73 (s, 1H, 2-OH); 8,25 (d, 1H, 6'-H); 8,21 (d, 2H, 4-,6-H); 8,20 (d, 1H, β -H); 8,17 (d, 1H, 3-H); 7,21 (d, 1H, α -H); 6,56 (d, 1H, 5'-H); 6,48 (s, 1H, 3'-H); 3,90 (s, 3H, 7'-H).



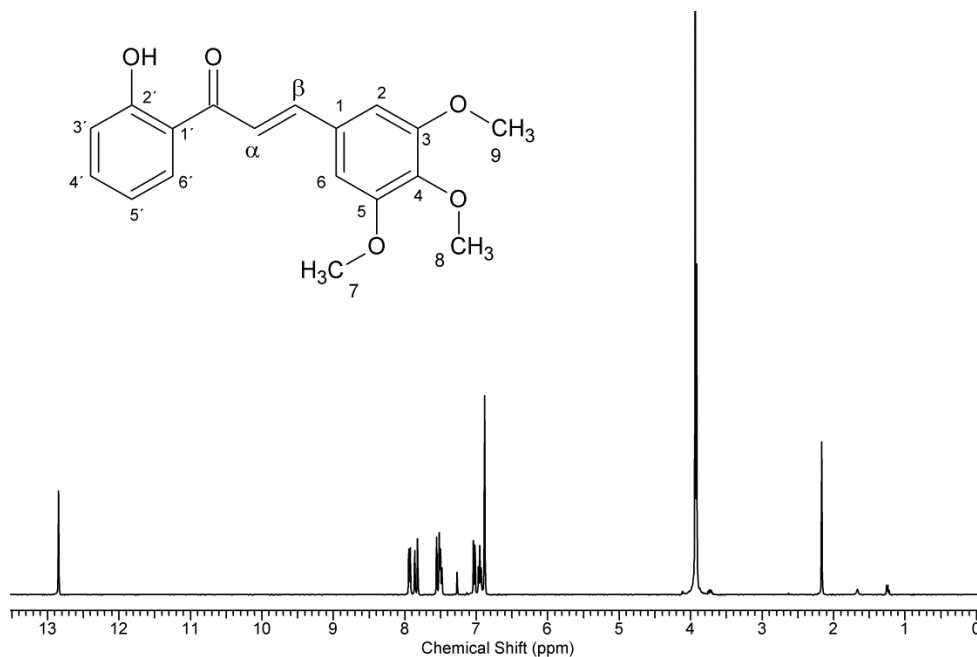
Obr. 28: $^1\text{H-NMR}$ spektrum **HL₂**.

Popis spektra **HL₂**: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 13,56 (s, 1H, 2'-OH); 7,89 (d, 1H, β -H); 7,83 (m, 1H, 6'-H); 7,63 (d, 2H, 2-,6-H); 7,49 (d, 1H, α -H); 6,96 (d, 2H, 3-,5-H); 6,51 (m, 2H, 3',5'-H); 3,87 (s, 6H, 7,7'-H).



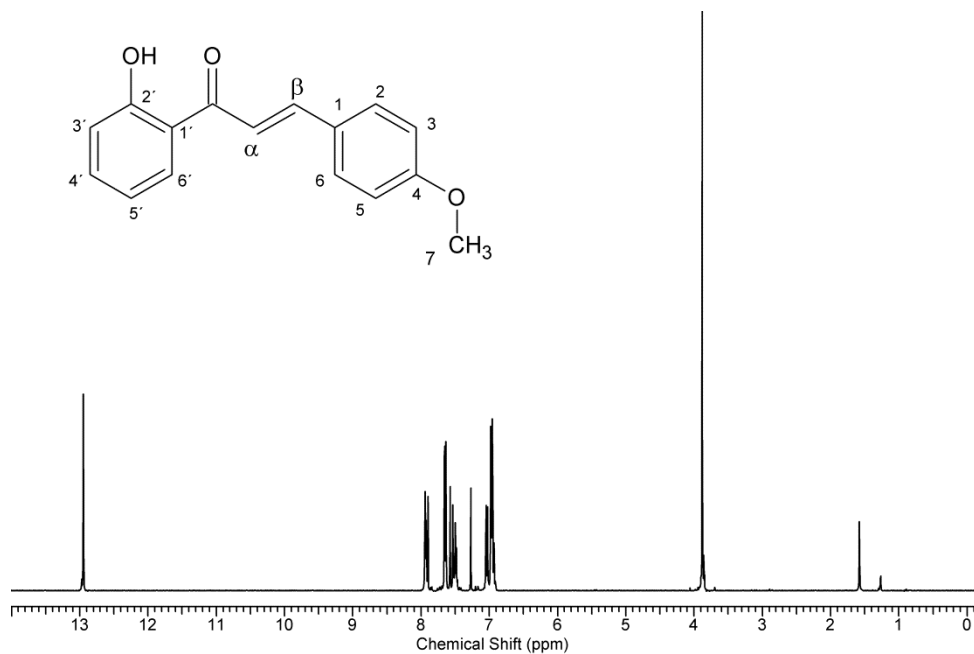
Obr. 29: $^1\text{H-NMR}$ spektrum **HL₃**.

Popis spektra **HL₃**: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 13,24 (s, 1H, 2'-OH); 7,94 (d, 1H, β -H); 7,91 (m, 1H, 3'-H); 7,58 (m, 2H, 2-,6-H); 7,45 (m, 2H, 3-,5-H); 7,03 (d, 1H, α -H); 6,93 (t, 1H, 5'-H); 6,72 (m, 2H, 4',6'-H,); 3,06 (s, 6H, 7-,8-H).



Obr. 30: $^1\text{H-NMR}$ spektrum **HL₄**.

Popis spektra **HL₄**: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 12,85 (s, 1H, 2'-OH); 7,94 (d, 1H, 6'-H); 7,86 (d, 1H, β -H); 7,55 (d, 1H, α -H); 7,52 (m, 1H, 4'-H); 7,04 (d, 1H, 3'-H); 6,95 (t, 1H, 5'-H); 6,89 (s, 2H, 2-,6-H); 3,92 (s, 3H, 8-H); 3,94 (s, 6H, 7-,9-H).

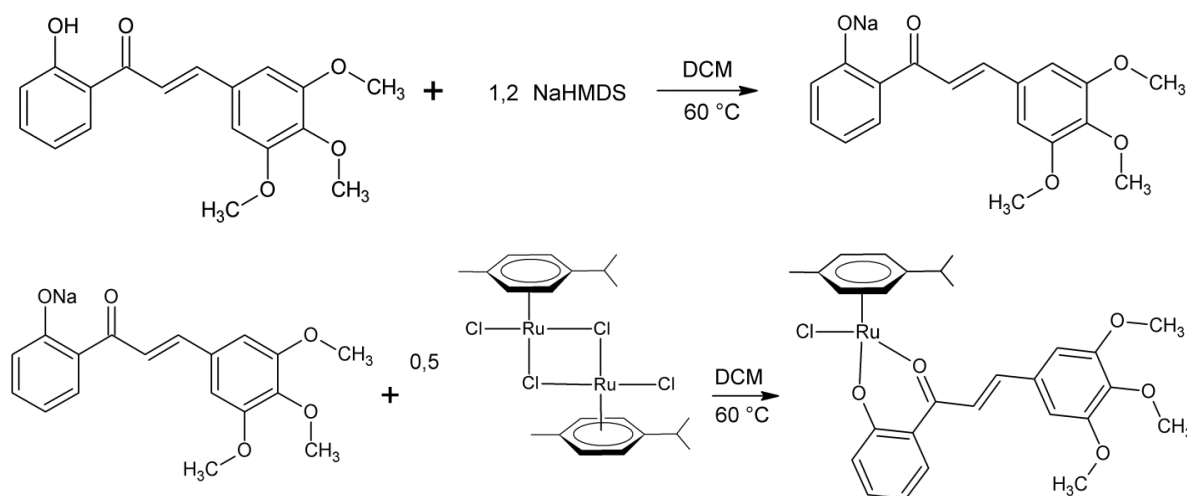


Obr. 31: $^1\text{H-NMR}$ spektrum **HL₅**.

Popis spektra **HL₅**: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 12,95 (s, 1H, 2'-OH); 7,93 (d, 1H, 6'-H); 7,90 (d, 1H, β -H); 7,66 (d, 2H, 2-,6-H); 7,55 (d, 1H, α -H); 7,50 (m, 1H, 4'-H); 7,03 (d, 1H, 3'-H); 6,98 (d, 2H, 3-,5-H); 6,96 (m, 1H, 5'-H); 3,88 (s, 3H, 7-H).

4.3 Organokovové sloučeniny Ru^{II} s 2'-hydroxychalkony

Podle postupu, který jsem nakonec zvolila (obr. 32), se mi podařilo nasyntetizovat látku (červené krystalky, výtěžnost 40 %), která měla slibné výsledky z elementární analýzy (tab. 3) pro možné složení komplexu Ru^{II} (**4**) s 3,4,5-trimethoxy-2'-hydroxychalkonem (**HL₄**). Ačkoliv rozdíly mezi vypočítanými a skutečnými hodnotami byly v případě uhlíku větší než 0,4 %, pokusila jsem se komplex **4** charakterizovat dostupnými fyzikálně-chemickými metodami, zda jde opravdu o chemické individuum.



Obr. 32 : Postup syntézy komplexu **4**.

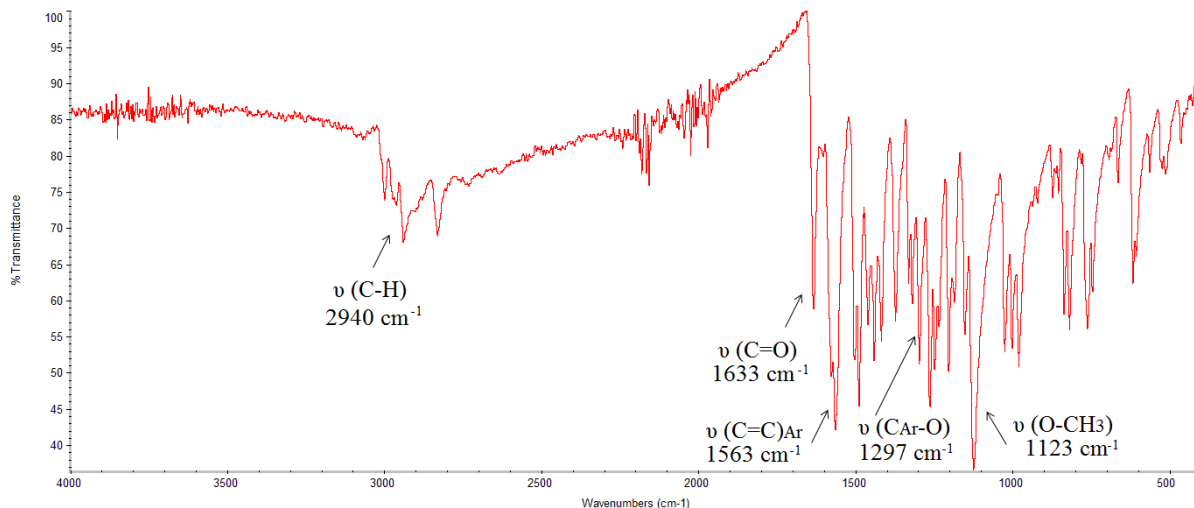
Tab. 3: Elementární složení komplexu **4** (vypočítané / skutečné).

Složení komplexu 4	N(%)	C(%)	H(%)
4 (C ₂₈ H ₃₀ ClO ₅ Ru)	0,0 / 0,0	57,0 / 57,7	5,6 / 5,2

Výsledný komplex **4** byl dále měřen na IR spektrometru, NMR spektrometru, na MS spektrometru včetně jeho stability v roztocích obsahujících vodu a taktéž byla provedena rentgenová strukturní analýza.

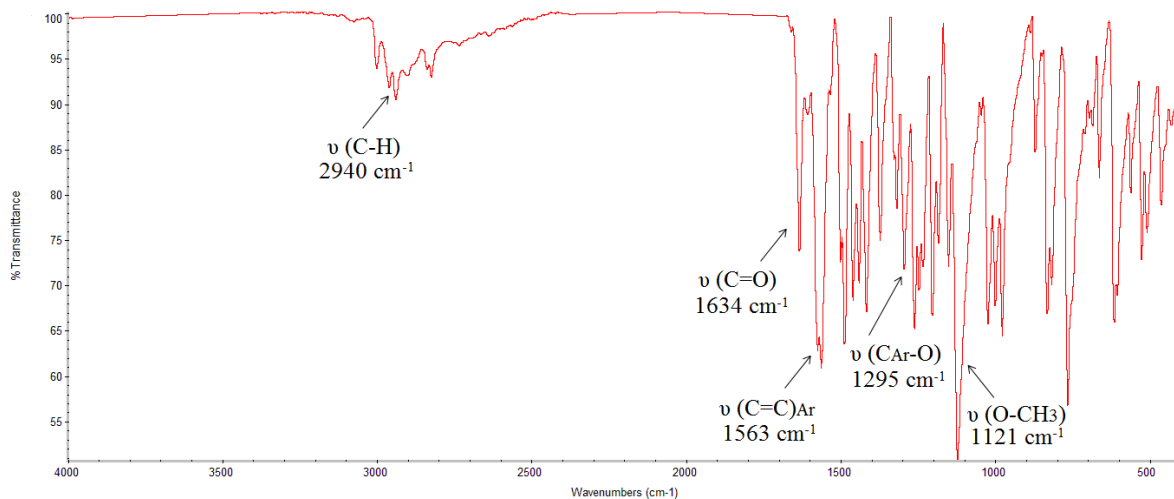
4.4 IR spektroskopie ligandu HL₄ a komplexu 4

IR spektra byla měřena v rozsahu vlnočtů 4000-400cm⁻¹, která jsou uvedena na obr. 33 a 34.



Obr. 33: IR spektrum ligandu HL₄.

Popis IR spektra HL₄ (ATR, cm⁻¹): 616m, 760m, 817m, 979m, 1024m, 1123s (O-CH₃), 1202m, 1247m, 1263s, 1297m (C_{Ar}-O), 1372m, 1417m, 1440m, 1488s, 1563s (C=C)_{Ar}, 1633m (C=O), 2831w, 2940w(C-H), 2962w, 3000w.



Obr. 34: IR spektrum komplexu 4.

Popis spektra komplexu 4 (ATR, cm⁻¹): 615m, 766s, 832m, 978m, 1023m, 1121s (O-CH₃), 1204m, 1246w, 1261m, 1295w (C_{Ar}-O), 1417m, 1487m, 1563s (C=C)_{Ar}, 1634m (C=O), 2825w, 2940w(C-H), 3002w.

Na obou IR spektrech lze pozorovat vibrační vlničky pro charakteristické absorpční pásy funkčních skupin. V oblasti vlničtů 3000 - 2850 cm^{-1} se nachází vibrace vazeb C-H. Oblast 1900 - 1500 cm^{-1} je charakteristická pro absorpci dvojných vazeb, proto ve spektru jsou zřetelné vazby C=C a C=O. Do části spektra 1400-1250 cm^{-1} spadá vibrace vazby C-O. V porovnání IR spekter ligandu a komplexu došlo jen k minimálním posunům u funkčních skupin o 1 až 2 cm^{-1} , takže očekávané posuny způsobené komplexací nebyly vidět. Interpretace spekter byla provedena podle článku [73].

4.5 MS spektrometrie a stabilita komplexu 4

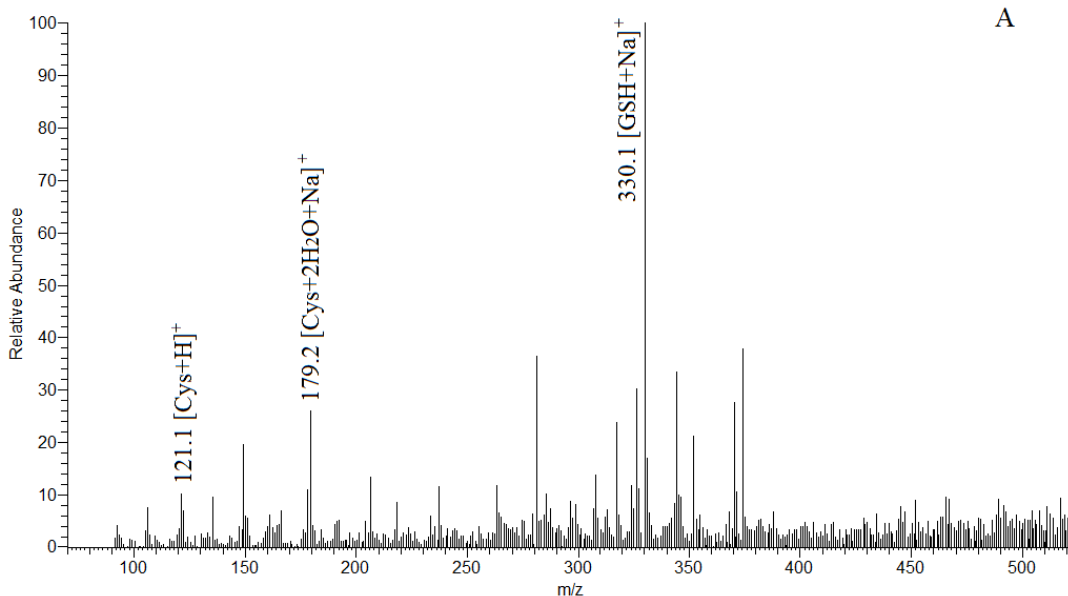
Pro studium stability a dalších možných interakcí s biomolekulami byla měřena ESI+MS spektra v kladném módu pro směsi: obr. 35(A) L-cystein (290 μM) a L-glutathion (6 μM) ve vodě, obr. 35(B) komplex 4 (10 μM) v methanolu po 1 hodině, obr. 35(C) komplex 4 (10 μM) v methanolu po 96 hodinách, obr. 35(D) systém komplexu 4 s L-cysteinem a L-glutathionem v methanol:voda (1:1)

V hmotnostním spektru (A) vzorku obsahujícího pouze L-cystein a L-glutathion ve vodě byly pozorovány pouze druhy odvozené od těchto sloučenin: $[\text{Cys}+\text{H}]^+$ 121.3 m/z; $[\text{Cys}+2\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$ 179.2 m/z; $[\text{GSH}+\text{Na}]^+$ 330.1 m/z;.

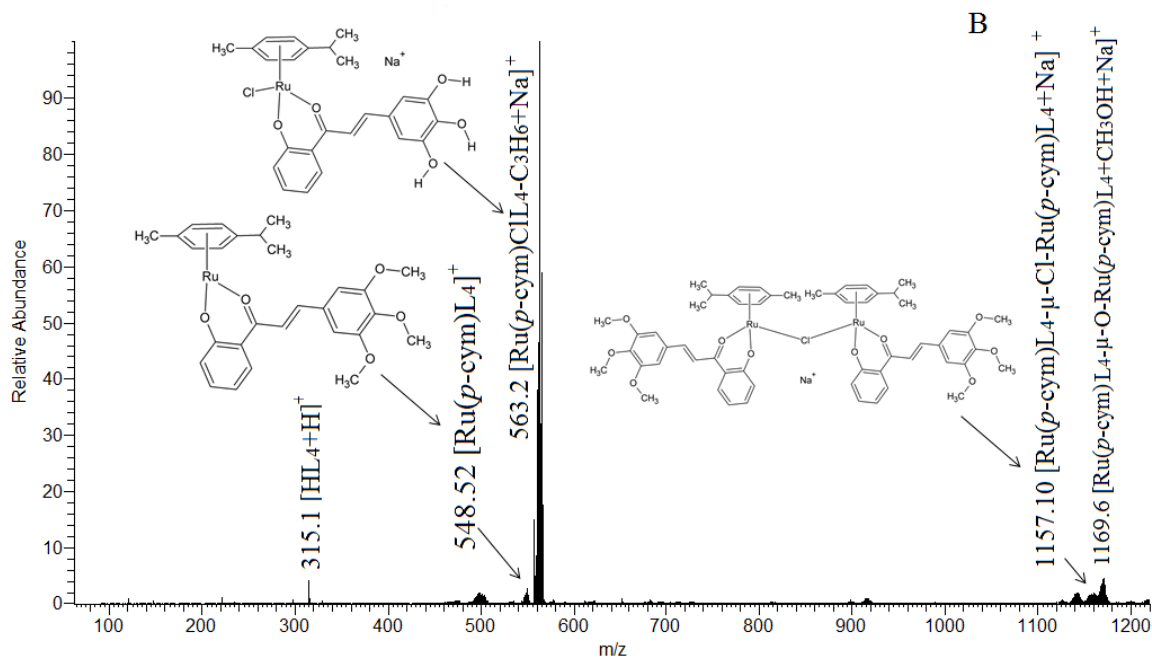
Ve spektru (B) komplexu v methanolu lze identifikovat po jedné hodině následující typy iontových druhů: $[\text{HL}_4+\text{H}]^+$ 315.1 m/z; $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{L}_4]^+$ 548.52 m/z; $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{ClL}_4\text{-C}_3\text{H}_6+\text{Na}]^+$ 563.2 m/z; $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{L}_4\text{-}\mu\text{-Cl-Ru}(p\text{-cym})\text{L}_4+\text{Na}]^+$ 1157,1 m/z; $[(\text{Ru}(p\text{-cym})\text{L}_4\text{-}\mu\text{-O-Ru}(p\text{-cym})\text{L}_4+\text{CH}_3\text{OH}+\text{Na})]^+$ 1169.6 m/z. Dále ve spektru (C) komplexu v methanolu lze identifikovat po 96 hodinách další typy iontových druhů: $[\text{HL}_4+\text{H}]^+$ 315.12 m/z; $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{ClL}_4\text{-C}_3\text{H}_6+\text{Na}]^+$ 563.10 m/z; $[(\text{Ru}(p\text{-cym})\text{L}_4\text{-}\mu\text{-(OH)}_3\text{-(Ru}(p\text{-cym})\text{L}_4+5\text{CH}_3\text{OH}+\text{Na})]^+$ 756.00 m/z. Je zřejmé, že komplex obsahuje labilně vázaný chlorido- ligand, který podléhá hydrolyze v roztocích obsahujících vodu.

Hmotnostní spektrum (D) směsi komplexu 4, L-cysteinu a L-glutathionu v methanol:voda (1:1) prokázalo nové druhy iontů, které potvrzují schopnost komplexu interagovat s biomolekulami obsahující síru: $[\text{Cys}+\text{H}]^+$ 121.1 m/z; $[\text{GSH}+\text{Cys}+2\text{H}_2\text{O}-2\text{H}]^{2+}$ 221.2 m/z; $[\text{HL}_4+\text{H}]^+$ 315.1 m/z; $[\text{GSH}+\text{Na}]^+$ 329.2 m/z; $[\text{Ru}(p\text{-cym})+\text{Cys}+\text{H}]^+$ 356.1 m/z; $[\text{Ru}(p\text{-cym})+\text{Cys}+\text{Na}]^+$ 378.0 m/z; $[\text{GSH}+4\text{CH}_3\text{OH}+\text{Na}]^+$ 458.1 m/z; $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{L}_4+\text{Cys}+3\text{H}_2\text{O}]^+$ 667.1 m/z; $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{ClL}_4+\text{Cys}+2\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 787.9 m/z;

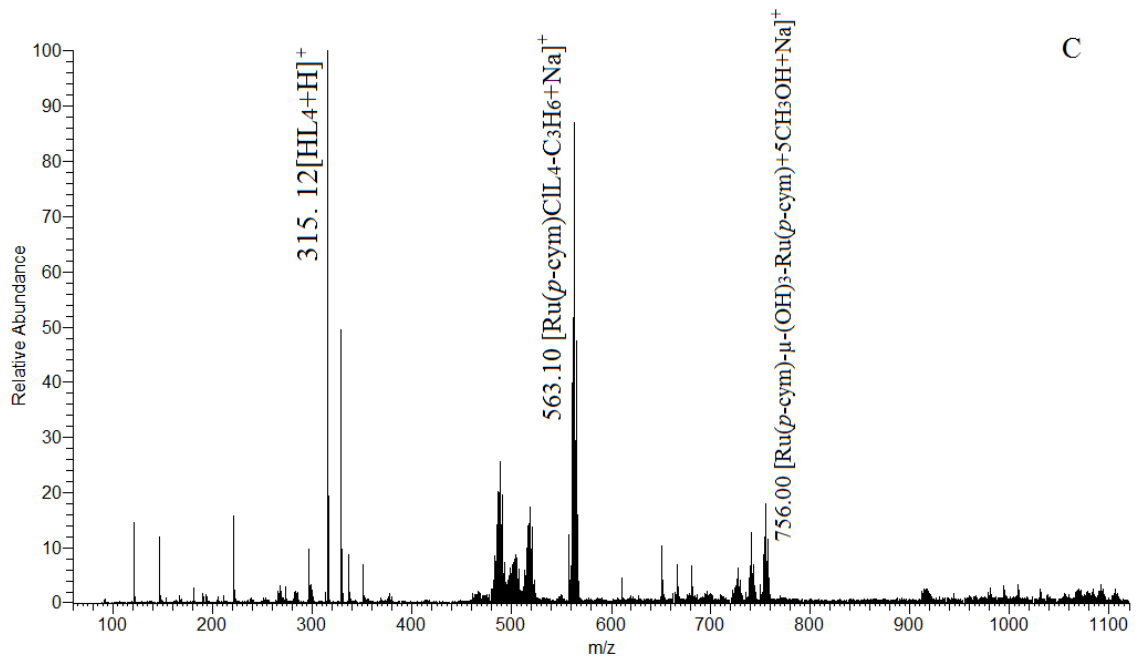
$[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{ClL}_4\text{-C}_3\text{H}_6\text{+GSH+Na}]^+$ 870.8 m/z; $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{H}_2\text{OL}_4\text{-CH}_2\text{+GSH+CH}_3\text{OH+H}]^+$ 892.7 m/z; $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{H}_2\text{OL}_4\text{+GSH+Cys+CH}_3\text{OH+H}]^+$ 1008.8 m/z. Tyto nové iontové druhy s biomolekulami naznačují možnou biologickou aktivitu látek.



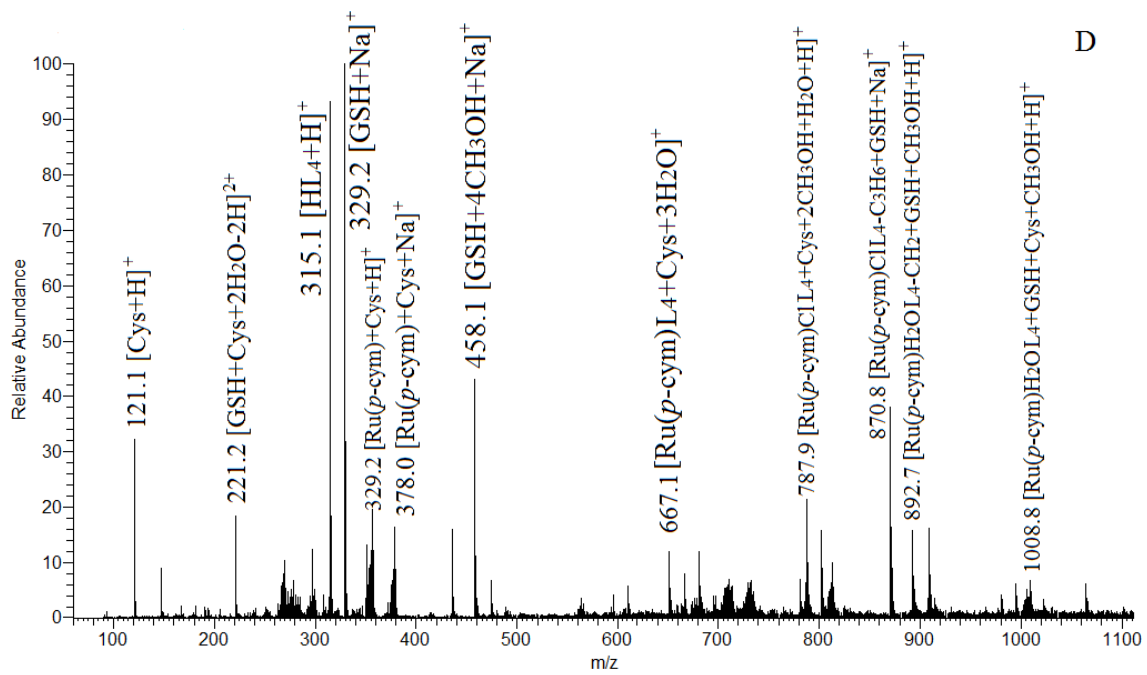
Obr. 35(A): ESI+MS spektrum: L-cystein (290 μM) a L-glutathion (6 μM) ve vodě.



Obr. 35(B): ESI+MS spektrum: komplex 4 (10 μM) v methanolu po 1 hodině.



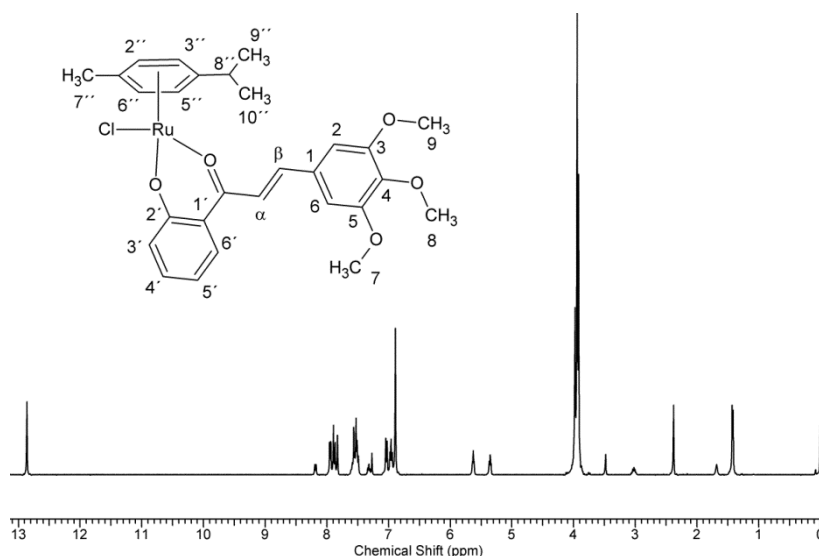
Obr. 35(C): ESI+MS spektrum: komplex **4** (10 μM) v methanolu po 96 hodinách.



Obr. 35(D): ESI+MS spektrum: směs komplexu **4** (10 μM) s L-cysteinem (290 μM) a L-glutathionem (6 μM) v methanol:voda (1:1).

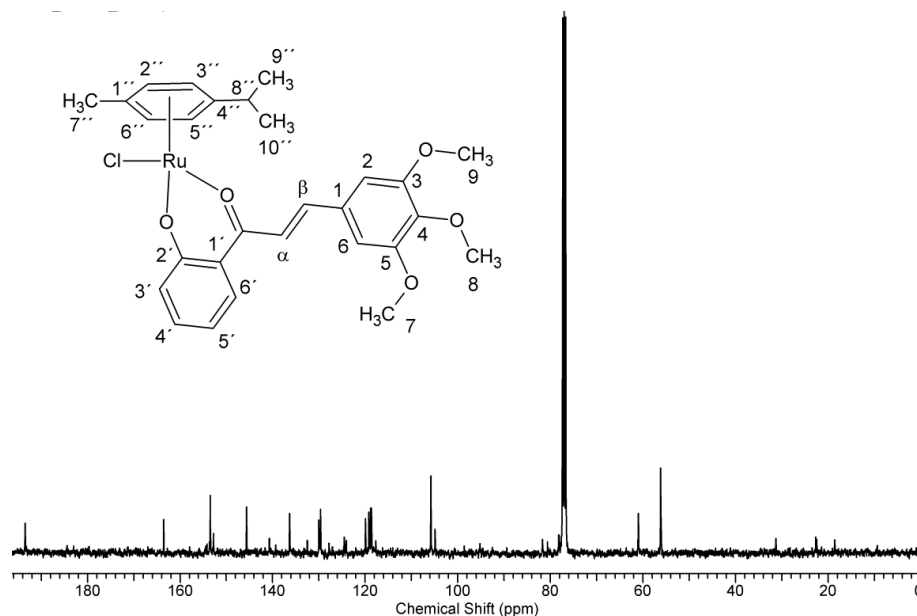
4.6 NMR spektroskopie komplexu 4

Bylo naměřeno $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spektrum komplexu **4** (obr. 36, 37). Ve spektru lze pozorovat chemické posuny jak ligandu **HL4**, tak *p*-cymenu. Chemický posun, v $^1\text{H-NMR}$ spektru, 12,86ppm odpovídá vodíku na 2'-OH skupině z ligandu. Navíc signály patřící vodíkům na *p*-cymenu jsou oproti signálům ligandu nepatrné a s malou intenzitou. Z čehož plyne, že se jedná o směs ligandu **HL4** a komplexu **4**, a že komplex **4** je ve směsi oproti ligandu zastoupen jen z cca 30 %. Což bylo zjištěno z integrace počtu vodíků. Signály v oblasti od 4,00ppm do 1,00ppm patří alifatickým vodíkům. Signály od 9,00ppm do 5,00ppm náleží aromatickým vodíkům. Dále byl ve spektru zaznamenán signál se 7,27ppm, který přísluší rozpouštědлу CDCl_3 . Oproti $^1\text{H-NMR}$ spektru ligandu, jsou zde chemické posuny 3,02ppm; 2,38ppm a 1,43ppm odpovídající alifatickým vodíkům a 5,63ppm a 5,35ppm náležící aromatickým vodíkům na *p*-cymenu. V $^{13}\text{C-NMR}$ spektru komplexu **4** byl nejvíce odstíněn karbonylový uhlík. Signál v oblasti 77,00ppm odpovídá rozpouštědлу CDCl_3 , jedná se o triplet. Nejmenší chemický posun měly uhlíky na methoxy skupinách. Interpretace spekter komplexu **4** byla provedena podle článků [55] a [72].



Obr. 36: $^1\text{H-NMR}$ spektrum komplexu **4**.

Popis spektra komplexu **4**: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 12,86 (s, 1H, 2'-OH); 7,96 (m, 1H, 6'-H); 7,87 (m, 1H, β -H); 7,56 (m, 1H, α -H); 7,53 (m, 1H, 4'-H); 7,05 (d, 1H, 3'-H); 6,96 (t, 1H, 5'-H); 6,89 (s, 2H, 2-,6-H); 5,63 (m, 2H, 3'',5''-H); 5,35 (m, 2H, 2'',6''-H); 3,98-3,92 (m, 9H, 7-,8-,9-H); 3,94 (s, 6H, 8-,9-H); 3,02 (septet, 1H, 8''-H); 2,38 (s, 3H, 7''-H); 1,43 (m, 6H, 9'',10''-H).

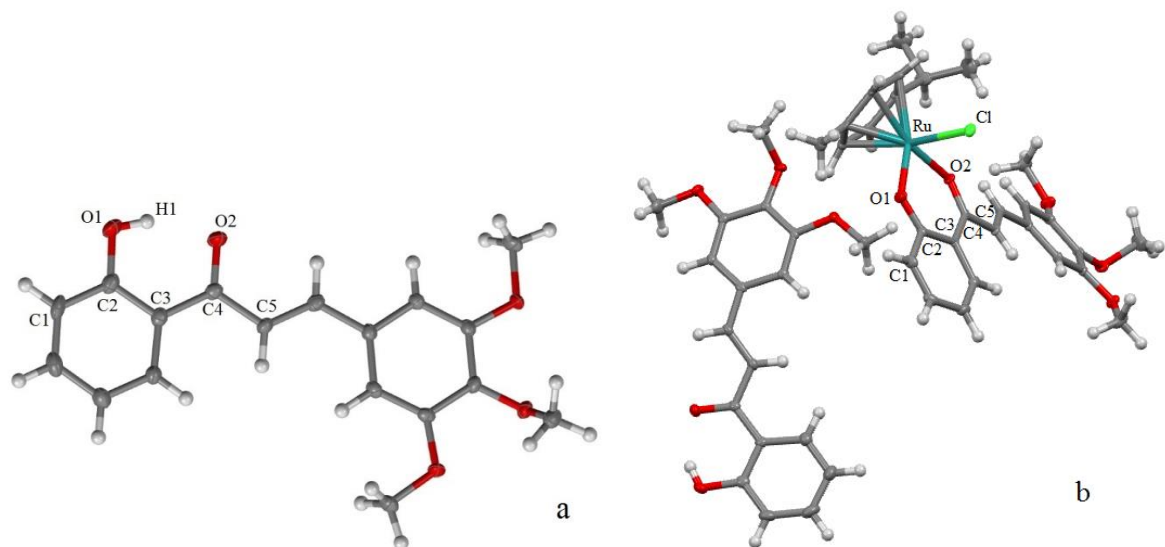


Obr. 37: ^{13}C -NMR spektrum komplexu **4**.

Popis spektra komplexu **4**: ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 193,46 (s, 1C, C=O); 163,51 (s, 1C, C2); 153,44 (m, 2C, C3,C5); 145,6 (s, 1C, β -C); 140,68 (s, 1C, C4); 136,33 (s, 1C, C4'); 130,0 (s, 1C, C1); 129,59 (s, 1C, C6'); 119,93 (s, 1C, C1'); 119,18 (m, 1C, α -C); 118,77 (s, 1C, C5'); 118,59 (s, 1C, C3'); 117,7 (s, 1C, C8''); 105,82 (m, 2C, C2,C6); 104,8 (s, 1C, C1''); 95,20 (s, 1C, 4'-H); 80,65 (m, 2C, C2'',C6''); 78,19 (m, 2C, C3'',C5''); 61,01 (s, 1C, C8); 56,21 (s, 2C, C7,C9); 31,33 (s, 1C, C9''); 22,71 (d, 1C, C10''); 18,58 (s, 1C, C7'').

4.7 Rentgenová strukturní analýza

Při syntéze komplexu **4** vznikl kokrytal komplexu s ligandem (obr. 38b) Po rekrystalizaci tohoto vzorku z methanolu vykrytalizoval samotný čistý ligand (obr. 38a). Vazebná délka ligandu se po komplexaci mezi C2-O1 zkrátila o 0,064Å a mezi C4-O2 prodloužila o 0,017Å. Vazebný úhel ligandu O1-C2-C3 se v komplexní částici zvětšil o 5,03°, a taktéž se zvětšil úhel C3-C4-O2 o 4,72°. Velikosti vybraných vazebných délek a úhlů jsou v tab. 4 a 5. Molekulovou strukturu ligandu **HL₄** jsem porovnála s již známou strukturou z článku [74].



Obr. 38: Molekulová struktura ligandu **HL₄** (a) a kokryystalu **HL₄** + komplexu **4** (b)

Tab. 4: Vybrané vazebné dĺžky ligandu **HL₄** a komplexu **4**

	Dĺžka vazeb HL₄ (Å)	Dĺžka vazeb známe struktury (Å)	Komplex 4	Dĺžka vazeb (Å)
C2-O1	1,337	1,350	C2-O1	1,286
C4-O2	1,252	1,239	C4-O2	1,256
C2-C3	1,411		C2-C3	1,434
C3-C4	1,464		C3-C4	1,456
C4-C5	1,468		C4-C5	1,481
O1-H1	0,845	0,832		
H1...O2	1,733	1,790		

Tab. 5: Vybrané vazebné úhly ligandu **HL₄** a komplexu **4**

	Úhel vazeb HL₄ (°)	Úhel vazeb známe struktury (°)	Komplex 4	Úhel vazeb (°)
C1-C2-O1	117,91		C1-C2-O1	115,65
O1-C2-C3	121,80		O1-C2-C3	126,83
C3-C4-O2	119,94	119,9	C3-C4-O2	124,66
O2-C4-C5	119,31	120,4	O2-C4-C5	116,13
O1-H1..O2	154,83	146,0	C2-O1-Ru	128,96
			C4-O2-Ru	130,05
			O1-Ru-Cl	85,95
			O2-Ru-Cl	84,45

5. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat, na základě odborné literatury (Scifinder, Web of Knowledge, Reaxys, vědecké publikace dle doporučení školitele), literární rešerši zaměřenou na biologicky zajímavé deriváty 2'-hydroxychalkonů a komplexních sloučenin ruthenia se zajímavými biologickými aktivitami. Dle prostudovaných publikací jsem do své práce zahrnula obecnou charakterizaci a přípravu chalkonů a biologickou aktivitu celkem dvanácti derivátů chalkonů. Dále jsem se zaměřila na komplexní sloučeniny ruthenia (klasické i organokovové sloučeniny), které vykazují slibnou biologickou aktivitu vůči rakovinným buňkám. V práci bylo uvedeno celkem dvacet komplexních sloučenin ruthenia, u kterých byla prokázána slibná cytotoxicita vůči řadě buněčných nádorových linií (např. A2780, A498, HCT-15, KB) a některé z nich se proto dostali až do fáze klinického testování (např. NAMI-A, KP1019, NKP-1339, nebo polosandwichový komplex RAPTA-C).

Dalším cílem této práce bylo připravit vybrané deriváty 2'-hydroxychalkonů (bylo jich celkem pět) a použít je společně s komplexem $[\text{Ru}(p\text{-cym)}\text{Cl}_2]_2$ jako výchozí látky pro syntézu organokovových sloučenin ruthenia obecného složení $[\text{Ru}(p\text{-cym})(\text{L})\text{Cl}]$, dle postupů uvedených v odborné literatuře. Již od počátku se však u produktů objevovaly problémy s čistotou, a proto bylo nutné zavedené postupy z literatury podrobit řadě variací, a to zejména výběrem co nejvhodnější báze, úpravou reakčních podmínek (teplota, délka syntéz, použité rozpouštědlo, systém otevřený nebo s použitím inertních plynů apod.) a metodami rekrystalizace a purifikace produktů. V pokročilejší fázi pokusů byla pak vyselektována jediná látka, na které byly intenzifikovány uvedené variace, zejména z důvodu celkové úspory chemikálií.

Posledním cílem bylo nasyntetizované sloučeniny charakterizovat vhodnými analytickými metodami. Na základě výsledků elementární analýzy byl vyselektován jeden z produktů, který měl být s největší pravděpodobností chemickým individuem, a ten byl dále charakterizován pomocí IR spektroskopie, NMR spektroskopie, MS spektrometrie, i rentgenové strukturní analýzy ve spolupráci se zaměstnanci katedry Anorganické chemie. Na základě zhodnocení výsledků jsem došla k závěru, že se nejedná o chemické individuum patřičného složení, ale o směs výchozího ligandu, a komplexní sloučeniny očekávaného složení s podílem asi 30% (na základě analýzy $^1\text{H-NMR}$ spektra).

Definitivním řešením uvedeného problému, které by ale vyžadovalo další časově náročné experimenty, by mohlo spočívat v rozdělení směsi s použitím vhodných preparativních chromatografických metod (např. flash chromatografie nebo preparativní HPLC).

6. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

A2780	Lidská buněčná linie karcinomu vaječníku
A498	Lidská buněčná linie karcinomu ledvin
A549	Lidská buněčná linie karcinomu plic
AGS	Lidská buněčná linie karcinomu žaludku
BEL-7404	Lidská buněčná linie karcinomu jater
bpy	2,2'-bipyridin
CDCl ₃	Chloroform
COT	Cyklooktatetraenid(-2)
Cp	Cyklopentadienid(-1) (η^5 -C ₅ H ₅ ⁻)
Cp*	[Me ₅ Cp] (Me = methyl)
Cys	L-cystein
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dppz	Dipyridofenazin (dipyrido[3,2- <i>a</i> :2',3'- <i>c</i>]fenazin)
en	Ethylendiamin
ESI+MS	Elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie
GSH	L-glutathion
HCT-8	Lidská buněčná linie ileocekálního adenokarcinomu
HCT116	Lidská buněčná linie karcinomu tlustého střeva
HCT-15	Střevní nádorová lidská buněčná linie
HDBH	<i>Ortho</i> -hydroxydibenzoylmethan
HEK-293T	Zdravé embryonální buňky ledvin
HepG2	Lidská buněčná linie hepatocelulárního karcinomu
IC ₅₀	Koncentrace, způsobující pokles biologické aktivity na polovinu
IR	Infračervená (spektroskopie)
K-562	Chronická myeloidní leukémie
KB	Lidská buněčná linie karcinomu nosohltanu
KB-VCR	Multi-rezistentní varianta buněčné linie KB
LiHMDS	Bis(trimethylsilyl)amid lithný

MDA-MB-231	Lidská buněčná linie adenokarcinomu prsu
MRC-5	Lidská buněčná linie plicních fibroblastů
MS	Hmotnostní spektrometrie
NaHMDS	Bis(trimethylsilyl)amid sodný
NMO	<i>N</i> -methylnorfolin- <i>N</i> -oxid
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NSAID	Nesteroidní protizánětlivé léky
<i>p</i> -cym	<i>para</i> -cymen
phen	1,10-fenanthrolin
R _f	Retenční faktor
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SGC-7901	Lidská buněčná linie karcinomu žaludku
SW480	Lidská buněčná linie karcinomu tlustého střeva
TSC	Thiosemikarbazon
TLC	Tenkovrstvá chromatografie

7. CITOVANÁ LITERATURA

- [1] Peacock A. F. A, Habtemariam A., Fernandez R., et al.: *J. AM. CHEM. SOC.* 128, 1739-1748, **2006**.
- [2] Clarke M. J.: *Coord. Chem. Rev.* 236, 209-233, **2003**.
- [3] Moucheron C.: *New J. Chem.* 33, 235-245, **2009**.
- [4] Křikavová R., Vančo J., Trávníček Z., Hutýra J., et al.: *J. Inorg. Biochem.* 163, 8-17, **2016**.
- [5] Kozłowski D., Trouillas P., Calliste C., et al.: *J. Phys. Chem. A* 111, 1138-1145, **2007**.
- [6] Dimmock J. R., Elias D.W., Beazely M.A., Kandepu N.M.: *Curr. Med. Chem.* 6, 1125-49, **1999**.
- [7] Batovska D. I., Todorova I. T.: *Curr. Clin. Pharmacol.* 5, 1-29, **2010**.
- [8] Gutierrez R. M. P., Ramirez A. M., Saucedo J. V.: *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 9, 237-357, **2015**.
- [9] Singh P., Anand A., Kumar V.: *Eur. J. Med. Chem.* 85, 758-777, **2014**.
- [10] Go M. L., Wu X., Liu X. L.: *Curr. Med. Chem.* 12, 483-499, **2005**.
- [11] Al-Masum M., Ng E., Wai M. Ch.: *Tetrahedron Lett.* 52, 1008-1010, **2011**.
- [12] Zhang N., Yang D., Wei W., Yuan L., et al.: *J. Org. Chem* 80, 3258-3263, **2015**.
- [13] Yadav V. R., Prasad S., Sung B., Aggarwal B. B.: *Int. Immunopharmacol.* 11, 295-309, **2011**.
- [14] Syam S., Abdelwahab S. I., et al.: *Molecules* 17, 6179-6195, **2012**.
- [15] Echeverria C., Santibanez J. F., Donoso-Tauda O., et al.: *Int. J. Mol. Sci* 10, 221-231, **2009**.
- [16] Niemeyer E. D., Brodbelt J. S.: *J. Nat. Prod.* 76, 1121-1132, **2013**.
- [17] Tatsuzaki J., Bastow K. F., Nakagawa-Goto K., et al.: *J. Nat. Prod.* 69, 1445-1449, **2006**.
- [18] Zenger K., Dutta S., Wolff H., Genton M. G., Kraus B.: *Toxicol.* 336, 26-33, **2015**.
- [19] Hsieh H.-K., Lee T.-H., Wang J.-P., et al.: *Pharmacol. Res.* 15, 39-46, **1998**.
- [20] Hsieh Ch.-T., Hsieh T.-J., El-Shazly M., et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 3912-3915, **2012**.

- [21] Vogel G. C., Perry W. D.: *J. Chem. Educ.* 68, 607-608, **1991**.
- [22] Gasser G., Ott I., Metzler-Nolte N.: *J. Med. Chem.* 54, 3-25, **2011**.
- [23] Crabtree R. H.: *The Organometallic Chemistry of the Transition metals*, Wiley-Interscience, **2005**.
- [24] Almodares Z., Lucas S. J., Crossley B. D., et al.: *Inorg. Chem.* 53, 727-736, **2014**.
- [25] Peacock A. F. A., Parsons S., Sadler P. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 3348-3357, **2007**.
- [26] Laws D. R., Chong D., Nash K., Rheingold A. L., Geiger W. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 130, 9859-9870, **2008**.
- [27] Splith K., Hu W., Schatzschneider U., et al.: *Bioconjugate Chem.* 21, 1288-1296, **2010**.
- [28] Glans L., Hu W., Jöst Ch., et al.: *Dalton Trans.* 41, 6443-6450, **2012**.
- [29] Selby J. D., Feliz M., Schwarz A. D., Clot E., Mountford P.: *Organometallics* 30, 2295-2307, **2011**.
- [30] Ignatov S. K., Rees N. H., Merkoulov A. A., et al.: *Chem. Eur. J.* 14, 296-310, **2008**.
- [31] Roberts K. A. E., Brown N. J., Roberts H. N., et al.: *Polyhedron* 86, 89-97, **2015**.
- [32] Chadwick F. M., O'hare D. M.: *Organometallics* 33, 3768-3774, **2014**.
- [33] Dobrowiak J. C.: *Metals in Medicine*, Wiley, **2009**.
- [34] Motswainyana W. M., Ajibade P. A.: *Adv. Chem.* 2015, 1-21, **2015**.
- [35] Süss-Fink G.: *Dalton Trans.* 39, 1673-1688, **2010**.
- [36] Nikolić S., Opsenica D. M., Filipović V., et al.: *Organometallics* 34, 3464-3473, **2015**.
- [37] Ghebreyessus K., Peralta A., Katdare M., et al.: *Inorg. Chem. Acta* 434, 239-251, **2015**.
- [38] Alessio E.: *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, **2012**.
- [39] Busto N., Valladolid J., Martínez-Alonso M., et al.: *Inorg. Chem.* 52, 9962-9974, **2013**.
- [40] Su W., Qian Q., Li P., Lei X., et al.: *Inorg. Chem.* 52, 12440-12449, **2013**.
- [41] Silva A. M. S., Cavaleiro J. A. S., Tarrago G., Marzin C.: *New J. Chem.*, 329-335, **1999**.
- [42] Prajapati R., Dubey S. K., Gaur R., et al.: *Polyhedron* 29, 1055-1061, **2010**.
- [43] Kaveri M.V., Prabhakaran R., Karvembu R., Natarajan K.: *Spectrochim. Acta, Part A* 61, 2915-2918, **2005**.
- [44] Gaur R., Mishra L.: *RSC Adv.* 3, 12210-12219, **2013**.
- [45] Muthukumar M., Viswanathamurthi P., Prabhakaran R., Natarajan K.: *J. Coord. Chem.*

63, 3833-3848, **2010**.

- [46] Mishra L., Sinha R., Itokawa H., et al.: *Bioorg. Med. Chem.* 9, 1667-1671, **2001**.
- [47] Pitchaimani J., Raja M. R. Ch., Sujatha S.: *RSC Adv.* 6, 90982–90992, **2016**.
- [48] Chen H., Parkinson J. A., Parsons. S., et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 124, 3064-3082, **2002**.
- [49] Kandioller W., Hartinger Ch. G., Nazarov A. A., et al.: *Organometallics* 28, 4249–4251, **2009**.
- [50] Kljun J., Bytzek A. K., Kandioller W., et al.: *Organometallics* 30, 2506-2512, **2011**.
- [51] Pettinari R., Marchetti F., Condello F., et al.: *Organometallics* 33, 3709–3715, **2014**.
- [52] Li. P., Su W., Xiao L., et al.: *Appl. Organometal. Chem*, 1–8, **2016**.
- [53] Pettinari R., Petrini A., et. al.: *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1800–1806, **2017**.
- [54] Aman F., Hanif M., Siddiqui W. A., et al.: *Organometallics* 33, 5546-5553, **2014**.
- [55] Kurzwernhart A., Kandioller W., Kandioller S., et al.: *J. Med. Chem.* 55, 10512–10522, **2012**.
- [56] Wang Ch., Wang B., et al.: *J. Nat. Prod.* 66, 51-56, **2003**.
- [57] Biersack B., Diestel R., Jagusch C., et al.: *J. Inorg. Biochem.* 103, 72–76, **2009**.
- [58] Peres R., Santos G., et al.: *Arthritis Research & Therapy*, 1-12, **2017**.
- [59] Kandioller W., Balsano E., Meier S. M., et al.: *Chem. Commun.* 49, 3348--3350, **2013**.
- [60] Dubey A., Jeong Y. J., Jo J. H., et al.: *Organometallics* 34, 4507-4514, **2015**.
- [61] Mendoza-Ferri M. G., Hartinger Ch. G., Mendoza M. A., et al. : *J. Med. Chem.* 52, 916-925, **2009**.
- [62] Jianzhang W., Jianling L., Yuepiao C., et al.: *J. Med. Chem.* 54, 8110–8123, **2011**.
- [63] Choudhary A. N., Juyal V.: *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3, 125128, **2011**.
- [64] Tönnemann J., Risse J., Grote Z., et al: *Eur. J. Inorg. Chem.*, 4558–4562, **2013**.
- [65] Seršen S., Kljun J., Kryeziu K., et al.: *J. Med. Chem.* 58, 3984–3996, **2015**.
- [66] Nongbri S. L., Das B., Rao K. M.: *J. Organomet. Chem.* 694, 3881–3891, **2009**.
- [67] Habtemariam A., Melchart M., Fernandez R., et al.: *J. Med. Chem* 49, 6858-6868, **2006**.
- [68] Teshima T., Takeishi M., Arai T.: *New J. Chem.* 33, 1393–1401, **2009**.
- [69] Barros A. I. R. N. A., Silva A. M. S., Alkorta I., Elguero J.: *Tetrahedron* 60, 6513–6521, **2004**.

- [70] Mewett K. N., Fernandez S. P., Pasricha A. K., et al: *Bioorg. Med. Chem.*17, 7156-7173, **2009**.
- [71] Krohn K., Steingrover K., Rao M. S.: *Phytochemistry* 61, 931–936, **2002**.
- [72] Hwang D., Hyun J., Jo G.: *Magn.: Reson. Chem.* 49, 41–45, **2011**.
- [73] Prasad Y. R., Ra A. L., Rambabu R.: *E-Journal of Chemistry* 5, 461-466, **2008**.
- [74] Wu. H, Xu Z., et al.: *Acta Cryst.* 61, 1434–1435, **2005**.