Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Anorganická chemie



Bc. Miroslav Pniok

Makrobicyklické ligandy pro aplikace v MRI
Macrobicyclic ligands for use in MRI

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2011

Podpis

Název: Makrobicyklické ligandy pro aplikace v MRI

Řešitel: Bc. Miroslav Pniok

Ústav: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta

Školitel: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

E-mail školitele: modrej@natur.cuni.cz

Abstrakt: Cílem této diplomové práce byla příprava nových makrobicyklických ligandů pro komplexaci iontů Ln^{3+}, hlavně Gd^{3+}, z hlediska jejich potenciálního využití jako kontrastní látky v tomografii magnetické rezonance. Jednou ze strategií jak zvýšit účinnost (relaxivitu) kontrastních látek pro MRI je příprava dihydratovaných komplexů Gd^{3+} s rychlou výměnou koordinované vody. Základní skelet kryptandových ligandů je cyklen, který je v N^1,N^4- a N^1,N^7-poloze přemostěn acyklickým můstkem s fosfinovými skupinami. N^1,N^7-izomer $Et_2\mathbf{L^1}$ byl připraven v malém množství, proto byl studován pouze N^1,N^4-izomer $H_2\mathbf{L^3}$. Byly stanoveny protonizační konstanty ligandu $H_2\mathbf{L^3}$ pomocí pH ^{31}P NMR titrace.

Klíčová slova: cyklen, ligandy, kryptand, MRI, fosfinát

Title: Macrobicyclic ligands for use in MRI

Autor: Bc. Miroslav Pniok

Department: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science

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

Supervisor's e-mail address: modrej@natur.cuni.cz

Abstract: The aim of this project is to synthesize new kind of macrobicyclic ligands for Ln^{3+} ions, especially Gd^{3+} ion. Gadolinium(III) complexes are widely used in the clinical practice as contrast agents for MR imaging and an improvement of their properties is in the center of interest of many scientific teams. The macrobicyclic ligands have been designed to make possible coordination of two water molecules in the first coordination sphere with fast water exchange. The macrocyclic core (cyclen) is combined with a linking phosphinate chain in N^1,N^4- and N^1,N^7-positions forming a cryptand-like structure. The N^1,N^7-isomer $Et_2\mathbf{L^1}$ was synthesized in a small amount so only the N^1,N^4-isomer $H_2\mathbf{L^3}$ has been studied. The protonation constants have been determined by pH ^{31}P NMR titration.

Keywords: cyclen, chelating agent, cryptand, MRI, phosphinate

Obsah

1. POUŽITÉ ZKRATKY 8

2. ÚVOD 11

3. TEORETICKÁ ČÁST 12

3.1. TOMOGRAFIE MAGNETICKÉ REZONANCE (MRI) 12
3.2. CHEMICKÁ POVAHA KONTRASTNÍCH LÁTEK 13
3.2.1. Kontrastní látky založené na komplexech Gd^{3+} 14
3.3. NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE (NMR) 16
3.3.1. Fyzikální princip 17
3.3.2. Relaxační procesy 18
3.4. RELAXACE V PŘÍTOMNOSTI PARAMAGNETIK 18
3.4.1. Vnitřní koordinační sféra 19
3.4.2. Vnější koordinační sféra 21
3.4.3. Druhá koordinační sféra 23
3.5. METODY STUDIA T_1 KONTRASTNÍCH LÁTEK 23
3.5.1. Hydratační číslo 24
3.5.2. Rotační korelační čas 27
3.5.3. Rychlost výměny vody 28
3.6. DESIGN T_1 KONTRASTNÍCH LÁTEK 31
3.6.1. Zvýšení hydratačního čísla 31
3.6.2. Optimalizace rotačního korelačního času 32
3.6.3. Optimalizace rezidenčního času 34
3.7. REGIOSELEKTIVNÍ N^1,N^4- A N^1,N^7-DIFUNKCIONALIZACE CYKLENU 36

4. MOTIVACE A CÍLE PRÁCE 41

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 42

5.1. NMR SPEKTROSKOPIE 42
5.2. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE 42
5.3. TENKOVRSTVÁ CHROMATOGRAFIE 43
5.4. RENTGENOSTRUKTURNÍ ANALÝZA 43
5.5. ANALYTICKÁ HPLC A SEMIPREPARATIVNÍ HPLC 43
5.6. ELEMENTÁRNÍ ANALÝZA 44
5.7. PH ^{31}P NMR TITRACE 44
5.8. SYNTETICKÁ ČÁST 45
5.8.1. Benzylamin-bis(methylenfosfinová kyselina) (2) 47
5.8.2. Benzylamin-bis[methylen(hydroxymethylfosfinová kyselina)] (3) 48
5.8.3. Diethyl benzylamin-bis[methylen(hydroxymethylfosfinát)] (4) 49
5.8.4. Diethyl benzylamin-bis{methylen[*O*,*O*′-bis(methansulfonyl)hydroxymethylfosfinát]} (5) 50
5.8.5. 1,4,7,10-Tetraazabicyklo[8.2.2]tetradekan-11,12-dion (7) 51
5.8.6. 4,7-Dibenzyl-1,4,7,10-tetraazabicyklo[8.2.2]tetradekan-11,12-dion (8) 52

5.8.7. 1,4-Dibenzyl-1,4,7,10-tetraazadodekan (9) 53
5.8.8. Perhydro-2a,4a,6a,8a-tetraazacyklopent[*f*,*g*]acenaftylen (10) 53
5.8.9. *cis*-2a,6a-Dibenzyldekahydro-2a,4a,6a,8a-tetraazacyklopent[*f*,*g*]acenaftylenium dibromid (11a) 54
5.8.10. *cis*-2a,6a-Dimethyldekahydro-2a,4a,6a,8a-tetraazacyklopent[*f*,*g*]acenaftylenium dijodid (11b) 55
5.8.11. 1,7-Dibenzyl-1,4,7,10-tetraazadodekan (12a) 55
5.8.12. 1,7-Dimethyl-1,4,7,10-tetraazadodekan (12b) 56
5.8.13. 1,7-Bis(benzyloxykarbonyl)-1,4,7,10-tetraazadodekan (13) 57
5.8.14. 5-Benzyl-12,17-bis(benzyloxykarbonyl)-3,7-bis[(ethoxy)oxy]-1,5,9,12,17-pentaaza-3,7-difosfabicyklo[7.5.5]nonadekan (14) 58
5.8.15. 5,12,17-Tribenzyl-3,7-bis[(ethoxy)oxy]-1,5,9,12,17-pentaaza-3,7-difosfabicyklo[7.5.5]nonadekan (15a) 58
5.8.16. 5-Benzyl-12,17-dimethyl-3,7-bis[(ethoxy)oxy]-1,5,9,12,17-pentaaza-3,7-difosfabicyklo[7.5.5]nonadekan (15b) 59
5.8.17. Diethyl benzylamin-bis[methylen(piperidylmethylfosfinát)] (17) 59
5.8.18. 5-Benzyl-3,7-bis[(ethoxy)oxy]-1,5,9,12,17-pentaaza-3,7-difosfabicyklo[7.5.5]nonadekan (18) 14-benzyl-12,16-bis[(ethoxy)oxy]-1,4,7,10,14-pentaaza-12,16-difosfabicyklo[8.7.2]nonadekan (19) 60
5.8.19. 4,7,14-Tribenzyl-12,16-bis[(ethoxy)oxy]-1,4,7,10,14-pentaaza-12,16-difosfabicyklo[8.7.2]nonadekan (20) 61
5.8.20. 4,7,14-Tribenzyl-12,16-bis[(hydroxy)oxy]-1,4,7,10,14-pentaaza-12,16-difosfabicyklo[8.7.2]nonadekan (21) 62
5.8.21. 12,16-Bis[(hydroxy)oxy]-1,4,7,10,14-pentaaza-12,16-difosfabicyklo[8.7.2]nonadekan (H_2L^3) . 63

6. VÝSLEDKY A DISKUZE 64

6.1. SYNTÉZA PREKURZORŮ 64
6.2. SYNTÉZA N^1,N^4- A N^1,N^7- IZOMERŮ MAKROBICYKLICKÝCH LIGANDŮ 67
6.3. PROTONIZAČNÍ KONSTANTY LIGANDU 72

7. ZÁVĚR 74

8. PŘÍLOHY 75

9. POZNÁMKY 76

10. LITERATURA 77

Poděkování

Mé velké díky patří mým rodičům, kteří mě odmala podporovali v mém zájmu o chemii a statečně snášeli více či méně podařené pokusy v improvizované domácí laboratoři. Děkuji jim také za finanční podporu, bez které bych nemohl nerušeně studovat. Poděkování také patří učitelům a profesorům, kteří mi velmi ochotně pomáhali ve všech stádiích mého studia chemie.

Konkrétně chci poděkovat svému školiteli Janu Kotkovi za ochotu mi poradit s jakýmkoliv problémem, za podnětné poznámky a korektury při sepisování této práce, za zpracování krystalových struktur a pomoc při zpracování titračních dat. Petrovi Hermannovi děkuji za četné rady ohledně syntézy v průběhu celé práce. Dále chci poděkovat svým kolegům a kolegyním z laboratoře za vytvoření příjemného a podněcujícího pracovního prostředí. Jmenovitě Plutovi za měření speciálních NMR experimentů a interpretaci dat z nich získané a za pomoc při modelování struktur ligandů. Bohoušovi za měření speciálních NMR experimentů a pomoc při tvorbě doprovodných obrázků v teoretické části. Láďovi za ochotu kdykoliv vyřešit hardwareový nebo softwareový problém.

Děkuji také Ivaně Císařové za naměření rentgenových struktur a Ivaně Strašlipkové za provedení elementárních analýz. Poděkování patří také Janu Veselému za oponenturu této práce.

Rád bych poděkoval své přítelkyni Martince za psychickou a fyzickou podporu, zvláště v závěru sepisování této práce. Svými připomínkami se zasloužila k lepší čitelnosti textu.

Tato práce byla financována z grantu GAČR P207/11/1437.

1. Použité zkratky

AAZTA	6-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepintetraoctová kyselina
Bn	benzyl
BOPTA	4-karboxy-5,8,11-tris(karboxymethyl)-1-fenyl-2-oxa-5,8,11-triazatridekan-13-ová kyselina
CA	contrast agent (kontrastní látka)
cis-DO2A	1,4-bis(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4-dioctová kyselina)
COSY	correlation spectroscopy (korelační spektroskopie)
CT	computed tomography (počítačová tomografie)
cyklen	1,4,7,10-tetraazacyklododekan
DCC	*N*,*N*′-dicyklohexylkarbodiimid
DCU	*N*,*N*′-dicyklohexylmočovina
DD	dipól–dipólový mechanismus
DIPEA	*N*-ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	*N*,*N*-dimethylformamid
DO3A	1,4,7-tris(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina)
DO3A-BUTROL	10-[(2*R*,3*S*)-2-(hydroxy)-3-hydroxy-1-(hydroxymethyl)propyl]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trictová kyselina
DOTA	1,4,7,10-tetrakis(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina)
DPDP	*N*,*N*′-dipyridoxylethylendiamin-*N*,*N*′-diacetát 5,5′-bis(fosfát)
DTPA	3,6,9-tris(karboxymethyl)-3,6,9-triazaundekandiová kyselina (1,1,4,7,7-diethylentriaminpentaoctová kyselina)
DTPA-BMA	5,8-bis(karboxymethyl)-11-[2-(methylamino)-2-oxoethyl]-3-oxo-2,5,8,11-tetraazatridekan-13-ová kyselina
DTPA-BMEA	6,9-bis(karboxymethyl)-3-[2-[(2-methoxyethyl)amino]-2-(oxo)ethyl]-11-oxo-15-oxa-3,6,9,12-tetraazahexadekanová kyselina

ENDOR	electron-nuclear double resonance
EOB-DTPA	*N*-[(2*S*)-2-bis(karboxymethyl)amino]-3-(4-ethoxyfenyl)propyl]-*N*-[2-bis(karboxymethyl)amino]ethyl]glycin
EPR	electron paramagnetic resonance (elektronová paramagnetická rezonance)
Et	ethyl
EtOH	ethanol
EXSY	exchange spectroscopy
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HOPO	hydroxypyrididon
HP-DO3A	1,4,7-tris(karboxymethyl)-10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina)
HPLC	high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HSA	human serum albumine (lidský sérový albumin)
HSQC	heteronuclear single quantum correlation
IS	inner-sphere (vnitřní koordinační sféra)
LIS	lanthanide induced shift (lanthanoidy-indukovaný posun)
Me	methyl
MeCN	acetonitril
MEMRI	manganese enhanced magnetic resonance imaging
MeOH	methanol
MRI	magnetic resonance imaging (tomografie magnetické rezonance)
MS-325	(4*R*)-4-[bis(karboxymethyl)amino]-6,9-bis(karboxymethyl)-1-[(4,4-difenylcyklohexyl)oxy]-1-hydroxy-2-oxa-6,9-diaza-1-fosfaundekan-11-ová kyselina
MsCl	methansulfonylchlorid
NMR	nuclear magnetic resonance (nukleární magnetická rezonance)
NMRD	nuclear magnetic relaxation disperzion
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
NSF	nefrogenic systemic fibrosis (nefrogenní systémová fibróza)
OS	outer-sphere (vnější koordinační sféra)

PCTA	3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15),11,13-trien-3,6,9-trioctová kyselina
PET	positron emission tomography (pozitronová emisní tomografie)
py	pyridin
RT	laboratorní teplota
SA	square antiprism (čtvercové prizma)
SBM	Solomonova–Bloembergenova–Morganova teorie
SC	skalární mechanismus
SPECT	single-photon emission tomography (jednofotonová emisní tomografie)
SS	second-sphere (druhá koordinační sféra)
TACN	1,4,7-triazacyklononan
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TMSB	trimethylsilylbromid
trans-DO2A	1,7-bis(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,7-dioctová kyselina)
TSA	twisted square antiprism (zkřížené čtvercové antiprizma)
UV–Vis	spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti
Z	benzyloxykarbonyl
ZFS	zero field splitting (štěpení při nulovém poli)

2. Úvod

Nic není objeveno a zároveň hned dokonalé.

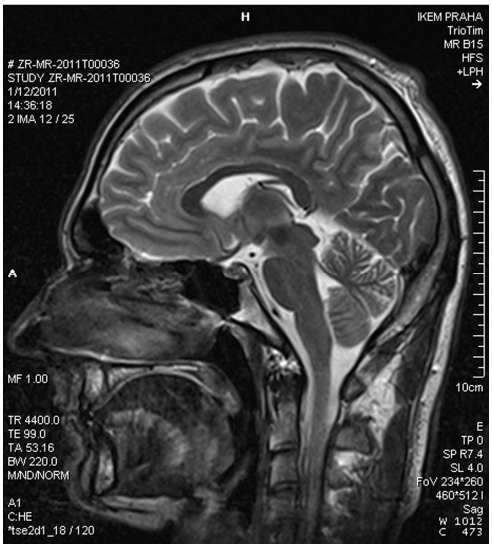
MARCUS TULLIUS CICERO

Molekulární zobrazování je pravděpodobně jedna z nejrychleji se rozvíjejících oblastí výzkumu. Tímto termínem se označuje studium biologického procesu za podmínek *in vivo* a neinvazivně na buněčné a molekulární úrovni.[1] Jedna ze zobrazovacích metod je tomografie magnetické rezonance (MRI). Tato diagnostická a zobrazovací technika poskytuje snímky s vysokým prostorovým rozlišením (pod 1 mm^3) a ve srovnání s dalšími zobrazovacími metodami, jako jsou např. počítačová tomografie (CT), jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT) nebo pozitronová emisní tomografie (PET), nevystavuje sledovaný objekt vlivům vysoce energetického ionizujícího záření. Jistým omezením je ale citlivost této metody ve srovnání s radiodiagnostickými nebo optickými metodami. Moderní přístup v zobrazovacích technikách je cílené zobrazení zkoumané tkáně nebo její funkce pomocí specifické vazby na zkoumanou tkáň, tzv. targeting. V obecném případě se kontrastní látka skládá z části odpovědné za kontrast, která je vázáná přes spacer na biologicky aktivní molekulu. Jako biomolekuly se používají, např. krátké peptidy či polypeptidy, monoklonální protilátky, sacharidy, různé enzymové substráty atd., které mají vysokou specifickou afinitu ke zkoumané tkáni. Koncentrace receptorů pro biomolekuly se pohybuje v řádu 10^{-6}–10^{-10} mM. Za předpokladu cíleného zobrazování při použití dnešní klinicky používané kontrastní látky pro MRI s relaxivitou ~4 $mM^{-1}\,s^{-1}$ je pro dostatečný kontrast snímku zapotřebí koncentrace kontrastní látky ve zkoumané tkáni ~125 μM, tedy v případě poměru kontrastní látka:biomolekula 1:1 je zapotřebí koncentrace receptorů ~125 μM. Proto je snahou mnoha vědeckých týmů připravit kontrastní látky pro MRI s vysokou relaxivitou. Je popsáno mnoho přístupů jak toho dosáhnout a některé budou popsány v dalších kapitolách (viz kap. 3.6). Předkládaná diplomová práce je zaměřena na přípravu makrobicyklických ligandů, které byly designovány pro přípravu dihydratovaných komplexů Gd^{3+} s rychlou výměnou koordinované vody, tedy přípravu T_1 kontrastních látek pro MRI s vysokou relaxivitou.

3. Teoretická část

3.1. Tomografie magnetické rezonance (MRI)

Fyzikální princip této metody je založen na využití NMR efektu. V roce 1973 Paul Christian Lauterbur použil NMR princip při pokusech se silným a slabým magnetickým polem, aby určil pozici jednotlivých jader v prostoru.[2] O šest let později v roce 1979 zjistil, že v přítomnosti paramagnetického iontu Mn^{2+} dramaticky narůstá protonová relaxivita v oblasti po infarzaci* psího srdce.[4] Nejčastěji měřeným jádrem je proton v molekule vody, jejíž obsah je v měkkých tkáních vysoký. Díky tomu lze sledovat patologické či fyziologické změny. Podle uspořádání MRI experimentu lze získat obraz odpovídající distribuci vody ve zkoumané tkáni nebo také hodnotám T_1 a T_2 relaxačních časů. Takto lze získat různé snímky, označované jako tzv. vážené protonovou hustotou nebo T_1 či T_2 vážené (Obrázek 3-1). Vzniklý kontrast je poté dán skutečností, že T_1 a T_2 relaxační časy se mezi různými tkáněmi liší, a to i mezi zdravou a patologicky změněnou částí téže tkáně. Hodnoty relaxačních časů se mění v závislosti na biochemických podmínkách (koncentrace vody, teplota, pH, koncentrace solí atd.) ve zkoumané tkáni. Uměle je lze změnit aplikací tzv. kontrastní látky (CA, Contrast Agent). Po intravenózním podání kontrastní látka putuje krevním řečištěm až do sledované tkáně. Její nerovnoměrnou distribucí pak na snímku MRI vzniká kontrast.[5] V klinické praxi se kontrastní látky používají při vyšetření orgánové perfúze, integrity hematoencefalické membrány, abnormalit clearance ledvin a v angiografii.[6] Podle údajů Americké radiologické společnosti je v celém světě provedeno ročně přes sto milionů vyšetření MR a ve více než 35 % se používají kontrastní látky.



Obrázek 3-1. T_{2w} snímek autorovy hlavy – sagitální řez.

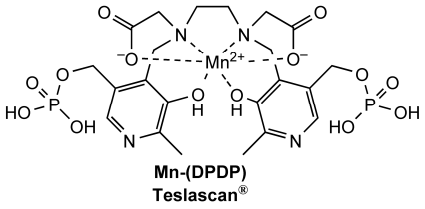
* Infarzace je v tomto textu myšlena jako vznik infarktu – odumření (nekróza) tkáně, která vzniká uzavřením přívodové tepny zásobující danou část orgánu krví. Uzávěr bývá způsoben nejčastěji ateroskleróz ou, embolií nebo trombózou.[3]

3.2. Chemická povaha kontrastních látek

Z fyzikálního pohledu lze kontrastní látky rozdělit na T_1 kontrastní látky, označované jako paramagnetické, a T_2 kontrastní látky, označované jako superparamagnetické.[5] Zatímco T_1 kontrastní látky indukují pozitivní kontrast, tj. zesilují ^{1}H NMR signál ve tkáni, tak T_2 kontrastní látky způsobují lokální snížení ^{1}H signálu, které se projeví ztmavnutím zobrazované tkáně.[7] T_1 kontrastní látky jsou chemickou povahou komplexy paramagnetických iontů kovů s vhodnými ligandy. V naprosté většině se jedná o komplexy Gd^{3+}, méně často o komplexy Fe^{3+} a Mn^{2+}.[8]

Jak už bylo řečeno dříve, ionty Mn^{2+} hrály důležitou roli v historii MRI. Ve vysokospinových komplexech má Mn^{2+} pět nepárových elektronů, pomalý elektronový relaxační čas a rychlou výměnu koordinované vody. Tyto vlastnosti z něj činí možnou alternativu ke Gd^{3+} kontrastním látkám. Chlorid manganatý se používá jako kontrastní látka pro studium neuroarchitektury zvířat za podmínek *in vivo*. Technika, která se k tomu využívá, se označuje MEMRI (Manganese Enhanced MRI).[9] V klinické praxi se používá jen jeden preparát – Teslascan®, komplex iontu Mn^{2+} a DPDP (*N*,*N*′-dipyridoxylethylendiamin-*N*,*N*′-diacetát 5,5′-bis(fosfát)) (Obrázek 3-2). Jeho hlavní použití je při diagnostice lézí v játrech, protože je internalizován zdravými hepatocyty, ve kterých je rychle metabolizován a transmetalován zinkem.[10] Protože např. nádorové buňky metastází nemohou internalizovat kontrastní látku, projeví se jejich přítomnost na T_{1w} snímku jako tmavé skvrny na světlém pozadí zdravých částí jater.

Novější skupinou jsou T_2 kontrastní látky. Většinou se jedná o nanočástice oxidů železa (magnetit Fe_3O_4, maghemit γ-Fe_2O_3) pokryté vrstvou např. dextranu nebo polyethylenglykolu. Protože je biologická distribuce těchto nanočástic přímo závislá na jejich velikosti, jsou rozděleny na tři hlavní skupiny: (*i*) MPIO (Micrometer-sized Paramagnetic Iron Oxide) – hydrodynamický průměr částic v řádu mikrometrů; (*ii*) SPIO (Superparamagnetic Iron Oxide) – několik magnetických jader s průměrem 4–5 nm na jednu částici s hydrodynamickým průměrem v řádu stovek nanometrů; (*iii*) USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide) – jedno magnetické jádro s průměrem 4–5 nm na částici s hydrodynamickým průměrem < 50 nm.[11]



Obrázek 3-2. Struktura jediného Mn^{2+} komplexu používaného v klinické praxi jako T_1 kontrastní látka v MRI.

3.2.1. Kontrastní látky založené na komplexech Gd^{3+}

Gadolinitý ion má sedm nepárových *f*-elektronů, které způsobují vysoký efektivní magnetický moment μ_{eff} = 7,94 B.M.* Ačkoli některé lanthanoidy mají μ_{eff} ještě vyšší, např. Dy^{3+} a Ho^{3+} (Tabulka 3-1), je další výhodou iontu Gd^{3+} jeho totálně symetrický elektronový stav $^8S_{7/2}$, díky kterému má 10^4–10^5-krát delší elektronové relaxační časy T_{1e} a T_{2e} než ostatní lanthanoidy.[13] Právě tato vlastnost má zásadní vliv na schopnost iontu Gd^{3+} urychlovat relaxaci okolních jader. Vzhledem k poloze iontu Gd^{3+} mezi lanthanoidy může být jeho koordinační číslo v komplexech 8–9 (energetická bariéra pro přechod mezi okta- a nonakoordinovanými částicemi je nízká).

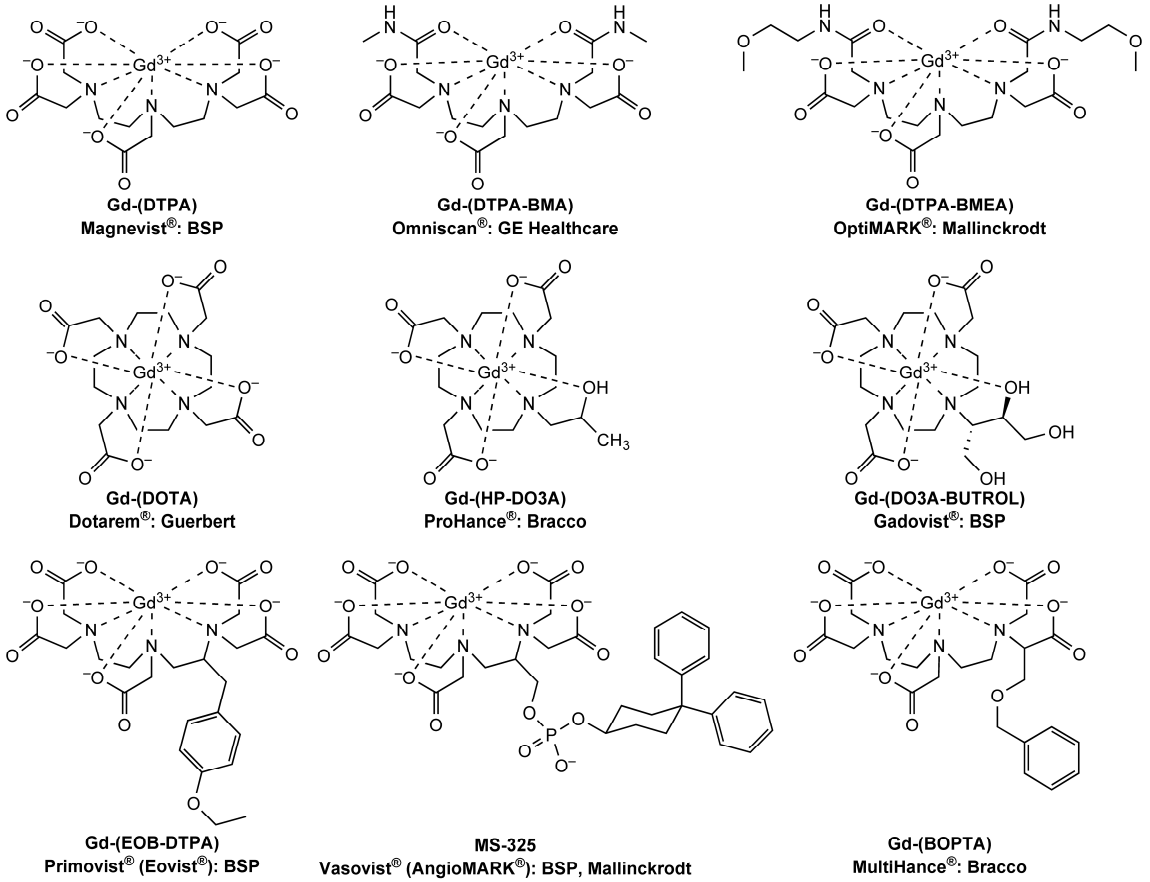
Volné ionty Gd^{3+}, resp. $[Gd(H_2O)_9]^{3+}$, jsou toxické (LD_{50} = 0,2 mmol kg^{-1} u myši).[14] Jejich toxicita je vysvětlována akumulací v játrech a kostech, a díky podobnému iontovému poloměru jako ionty Ca^{2+} (99 pm resp. 100 pm)[15] blokují vazebná místa vápníku v biologických systémech.[16] Musí být tedy podávány ve formě stabilních komplexů. Na stabilitu komplexů v roztoku lze nahlížet termodynamickým nebo kinetickým pohledem. Vysokých konstant stability je dosaženo vhodnou volbou ligandu. Mnohem důležitější je však kinetická stabilita, kde se jedná hlavně o kinetickou inertnost vůči transmetalaci biogenními prvky (hlavně Ca^{2+} a Zn^{2+}), transchelataci pomocí volných ligandů přítomných v organismu a kyselé dekomplexaci. Podle Pearsonova konceptu se ionty Gd^{3+} řadí mezi tvrdé kyseliny, proto vhodné ligandy musí obsahovat tvrdé donorové atomy (aniontový *O*-donorový atom a *N*-donorový atom). Dobrými ligandy pro komplexaci Gd^{3+} jsou deriváty polyamino-karboxylových kyselin. Lze je rozdělit do dvou strukturních skupin odvozených od makro-cyklického ligandu DOTA (resp. DO3A) a acyklického ligandu DTPA. Všechny klinicky používané komplexy (Obrázek 3-3) s těmito oktadentátními ligandy mají nanejvýš jedno volné koordinační místo pro další ligand,

Tabulka 3-1. Efektivní magnetické momenty iontů Ln^{3+}. Hodnoty jsou uvedeny v hodnotách Bohrova magnetonu (B.M.*).[13]

Ln^{3+}	μ_{eff} B.M.
Ce^{3+}	2,56
Pr^{3+}	3,62
Nd^{3+}	3,68
Sm^{3+}	1,55–1,65
Eu^{3+}	3,40–3,51
Gd^{3+}	7,94
Tb^{3+}	9,70
Dy^{3+}	10,6
Ho^{3+}	10,6
Er^{3+}	9,60
Tm^{3+}	7,60
Yb^{3+}	4,50

* Bohrův magneton B.M. vyjadřuje přibližně magnetický moment elektronu a je dán vztahem $\mu_B = e\hbar/2m_e$. V SI jednotkách má hodnotu μ_B = 927,400915(23) J T^{-1}.[12]

nejčastěji vodu. Prvních šest komplexů jsou nespecifické extracelulární kontrastní látky. Po intravenózním podání jsou tyto látky rychle distribuovány do extracelulárního prostoru, kde se rychle ustaví rovnováha mezi intersticiálním a intravaskulárním prostorem a následně jsou během cca 1,5 h eliminovány ledvinami (Obrázek 3-4).[17,18,19]

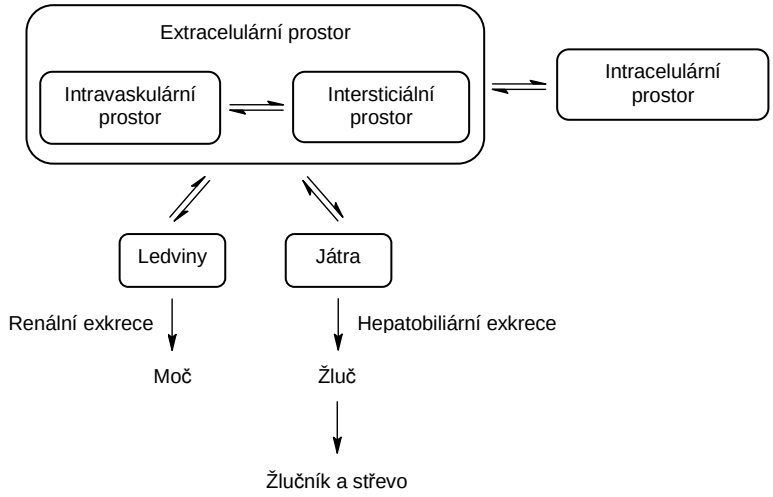


Obrázek 3-3. Struktury klinicky používaných nízkomolekulárních komplexů Gd^{3+} jako kontrastní látky v MRI. Koordinovaná voda ($q = 1$ pro všechny komplexy) byla pro přehlednost vynechána. (BSP = Bayer Schering Pharma).

U pacientů s renální insuficiencí může dojít v souvislosti s používáním Gd^{3+} kontrastních látek k onemocnění zvanému nefrogenní systémová fibróza (NSF, Nefrogenic Systemic Fibrosis). Toto onemocnění postihuje kůži, ledviny, srdce, játra a plíce.[20] Jedná se hlavně o komplexy Gd^{3+} s acyklickými ligandy odvozenými od ligandu DTPA. Tento efekt je vysvětlován menší kinetickou inertností těchto komplexů vůči kyselé dekomplexaci a delší dobou, kterou kontrastní látka stráví v těle v důsledku snížené funkce ledvin.[21]

Preparáty Gd-(EOB-DTPA) a Gd-(BOPTA) jsou orgánově specifické a z extracelulárního prostoru jsou vychytávány hepatocyty a následně vyloučeny hepatobiliární exkrecí. Přítomnost

aromatického kruhu zvyšuje afinitu k sérovému albuminu* a také k hepatocytům, proto jsou určeny k vyšetření jater.[23] Poslední preparát, MS-325, má také vysokou afinitu k sérovému albuminu, na který se váže hydrofilní interakcí. Tato reverzibilní nekovalentní interakce snižuje koncentraci volné kontrastní látky v krvi, která by se jinak vyloučila v ledvinách glomerulární filtrací, což vede k prodloužení retenčního času v krvi. Ve spojení s vysokou relaxivitou je tato kontrastní látka vhodná pro angiografii.[24] Amfifilní povaha tohoto komplexu je důležitá, protože záporně nabitá fosfodiesterová skupina snižuje afinitu k hepatocytům a zvyšuje elektrostatickou interakci s kladně nabitým vazebným místem albuminu. Tento příklad dobře ilustruje důležitost designu komplexů, jako nástroj ovlivnění klíčových vlastností kontrastních látek (o designu kontrastních látek viz kap. 3.6).



Obrázek 3-4. Hlavní distribuční místa a exkreční cesty pro intravenózně podané rozpustné komplexy iontů kovů.[19]

3.3. Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je velmi rozšířená technika, která je založena na interakci jaderného spinu s vnějším magnetickým polem. V roce 1946 Felix Bloch a Edward Mills Purcell nezávisle na sobě zjistili†, že některá atomová jádra mohou absorbovat energii radio-frekvenčního elektromagnetického pole, když jsou umístěna v externím magnetickém poli. S nástupem počítačů a pulzních technik se stala tato metoda nepostradatelná při zkoumání chemické struktury, sledování dynamických procesů či určování konformací molekul.

* Sérový albumin je nejvíce zastoupený protein v plasmě; jeho koncentrace je 600–700 μM.[22]

† Za tento objev obdrželi v roce 1952 Nobelovu cenu za fyziku.[25]

3.3.1. Fyzikální princip[26,27]

Spinové kvantové číslo jádra I je charakteristická vlastnost jader. Může být nulové, nebo nabývat poločíselných a celočíselných hodnot. Jádra se sudým protonovým a nukleonovým číslem (^{12}C, ^{16}O) mají $I = 0$. Jádra s lichým protonovým číslem a sudým nukleonovým číslem mají I = celočíselné (^{14}N, ^{2}H). A konečně jádra s lichým nukleonovým číslem mají I = poločíselné (^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{31}P). V NMR spektroskopii jsou aktivní jen jádra s nenulovým spinovým kvantovým číslem ($I \neq 0$).

Velmi důležitou vlastností částic s nábojem je magnetický moment $\boldsymbol{\mu}$. Pro jeho z-ovou komponentu μ_z platí rovnice (1).

$$\mu_z = \gamma m_\mathrm{I} \hbar \tag{1}$$

kde je:

γ gyromagnetický poměr jádra

m_I moment hybnosti; nabývá hodnot $m_\mathrm{I} = I, I-1, \ldots, -I$

$\hbar$ redukovaná Planckova konstanta; $\hbar = h/2\pi$

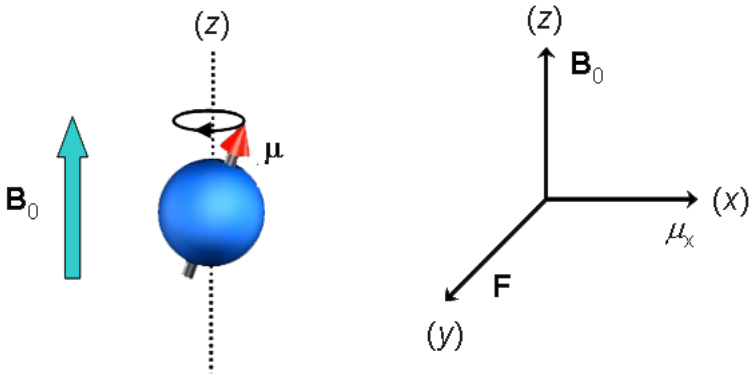
Spinové stavy jádra jsou prostorově kvantovány a nabývají $2I + 1$ hodnot. Jednotlivé spinové stavy popisuje hodnota m_I. V základním stavu nejsou jaderné spiny v prostoru nijak uspořádány a neexistují mezi nimi žádné energetické rozdíly. Situace se ovšem změní, pokud na tento spinový systém působíme vnějším magnetickým polem $\mathbf{B}_0$. Pro jádra s $I = \frac{1}{2}$ dochází k uspořádání spinů v paralelním nebo antiparalelním směru s vektorem $\mathbf{B}_0$. Každé orientaci přísluší jistá energie E_{m_I}, pro kterou platí rovnice (2).

$$E_{m_\mathrm{I}} = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar B_0 m_\mathrm{I} \tag{2}$$

Energetický rozdíl mezi dvěma energetickými hladinami je poté $\Delta E = \gamma \hbar B_0$. Jaderný magnetický moment vykonává ve vnějším magnetickém poli precesní pohyb (Obrázek 3-5), který lze popsat Larmorovou frekvencí ν_L, rovnice (3).

$$\nu_\mathrm{L} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \tag{3}$$

Bývá proto zvykem v NMR spektroskopii vyjadřovat intenzitu magnetického pole v jednotkách Larmorovy frekvence (MHz) daného jádra, např. pro ^{1}H je 1 T ≡ 42,576 MHz.



Obrázek 3-5. Ve vnějším magnetickém poli $\mathbf{B}_0$ vykonává magnetický moment $\boldsymbol{\mu}$ precesní pohyb charakterizovaný Larmorovou frekvencí. Precesní pohyb je způsoben interakcí $\mathbf{B}_0$ a μ_x. Síla **F**, která nutí magnetický moment k precesi, je dána vektorovým součinem $\mathbf{F} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}$ a je orientována ve směru osy *y*. Protože je **F** kolmá na $\mathbf{B}_0$ a $\boldsymbol{\mu}$, opisuje $\boldsymbol{\mu}$ kruhovou dráhu kolem osy *z*.

3.3.2. Relaxační procesy[26]

Pro popis reálného vzorku se zavádí pojem „soubor spinových stavů“. Každému spinu v tomto souboru přísluší jaderný magnetický moment. Vektorovým součtem těchto jednotlivých příspěvků pak vzniká makroskopická veličina **M** zvaná magnetizace, která je orientována ve směru vnějšího magnetického pole $\mathbf{B}_0$. Vektor magnetizace lze sklopit o libovolný úhel aplikací různě dlouhého pulzu s magnetickou indukcí $\mathbf{B}_1$. Takto sklopený vektor magnetizace je nucen vykonávat precesní pohyb o Larmorově frekvenci dané intenzitou magnetického pole $\mathbf{B}_0$. Mechanismy, které navracejí vektor magnetizace do rovnovážné polohy, se označují jako relaxační procesy. Rozlišujeme dva možné mechanismy: (*i*) spin–mřížkovou relaxaci, která souvisí s nárůstem složky vektoru magnetizace ve směru osy *z* (M_z), označovanou jako longitudinální, charakterizovanou časovou konstantou T_1, a (*ii*) spin–spinovou relaxaci, označovanou jako transverzální. Ta souvisí s úbytkem složky vektoru magnetizace z roviny *xy* (M_{xy}) a popisuje ji časová konstanta T_2.

3.4. Relaxace v přítomnosti paramagnetik

Přítomnost paramagnetického centra blízko jiných molekul, např. rozpouštědla, se projeví zkrácením longitudinálního a transverzálního relaxačního času (T_1, T_2). Pozorované hodnoty relaxačních časů ($T_{1,\mathrm{obs}}$, $T_{2,\mathrm{obs}}$) rozpouštědla jsou dány součtem diamagnetického příspěvku ($T_{1,\mathrm{d}}$, $T_{2,\mathrm{d}}$) relaxačních časů samotného rozpouštědla bez přítomnosti paramagnetické látky a paramagnetického příspěvku ($T_{1,\mathrm{p}}$, $T_{2,\mathrm{p}}$). Ve zředěných roztocích platí Solomonova–Bloembergenova–Morganova teorie (SBM)[28] popisující relaxaci jader rozpouštědla v přítomnosti paramagnetické

látky, rovnice (4). Tato teorie také zavádí pojem relaxační rychlost R jako reciprokou hodnotu relaxačního času T. S využitím tohoto vztahu může být rovnice (4) přepsána do rovnice (5).

$$\frac{1}{T_{i,\mathrm{obs}}} = \frac{1}{T_{i,\mathrm{d}}} + \frac{1}{T_{i,\mathrm{p}}}, \quad i = 1,2 \tag{4}$$

$$R_{i,\mathrm{obs}} = R_{i,\mathrm{d}} + R_{i,\mathrm{p}}, \quad i = 1,2 \tag{5}$$

Protože je paramagnetický člen přímo úměrný koncentraci paramagnetické látky [M], lze rovnici (5) zapsat také jako:

$$R_{i,\mathrm{obs}} = R_{i,\mathrm{d}} + r_i[\mathrm{M}], \quad i = 1,2 \tag{6}$$

Konstanta úměrnosti r_i se nazývá relaxivita a charakterizuje schopnost paramagnetické látky změnit relaxační rychlost. Uvádí se v jednotkách $\mathrm{mM^{-1}\,s^{-1}}$. Protože v MRI se jedná nejčastěji o relaxaci protonů vody, označuje se r_i jako protonová relaxivita.

Relaxace protonů v blízkosti paramagnetického centra probíhá interakcí dipól–dipól mezi jadernými spiny a fluktuujícím lokálním magnetickým polem nespárovaných elektronových spinů. Magnetické pole kolem paramagnetického centra velmi rychle klesá se vzdáleností, proto je nutné, aby se molekuly vody z okolí dostaly do blízkosti kovového iontu. Jsou známy tři typy specifických chemických interakcí. Celková hodnota relaxivity je poté dána součtem příspěvku vnitřní koordinační sféry (IS, inner-sphere), vnější koordinační sféry (OS, outer-sphere) a druhé koordinační sféry (SS, second-sphere), rovnice (7).

$$r_i = r_i^{\mathrm{IS}} + r_i^{\mathrm{OS}} + r_i^{\mathrm{SS}}, \quad i = 1,2 \tag{7}$$

3.4.1. Vnitřní koordinační sféra

Ve vnitřní koordinační sféře jsou molekuly vody přímo koordinovány na paramagnetický ion kovu. Tyto molekuly jsou nejblíže k paramagnetickému centru a mají nejvíce urychlenou relaxaci vodíkových jader. Relaxační rychlost ve vnitřní koordinační sféře je vyjádřena rovnicemi (8) a (9).

$$R_1^{\mathrm{IS}} = \frac{qP_{\mathrm{m}}}{T_{1\mathrm{m}} + \tau_{\mathrm{m}}} \tag{8}$$

$$R_2^{\mathrm{IS}} = qP_{\mathrm{m}} \frac{1}{\tau_{\mathrm{m}}} \left[\frac{T_{2\mathrm{m}}^{-1}(\tau_{\mathrm{m}}^{-1} + T_{2\mathrm{m}}^{-1}) + \Delta\omega_{\mathrm{m}}^2}{(\tau_{\mathrm{m}}^{-1} + T_{2\mathrm{m}}^{-1})^2 + \Delta\omega_{\mathrm{m}}^2} \right] \tag{9}$$

kde je:

q hydratační číslo (počet koordinovaných molekul vody)

P_{m} molární zlomek koordinovaných molekul vody

$T_{i\mathrm{m}}$ $i = 1, 2$, relaxační čas vodíkových jader koordinované vody

τ_m rezidenční čas molekuly vody ve vnitřní koordinační sféře (reciproká hodnota τ_m je rychlostní konstanta výměny vody, k_{ex})

$\Delta\omega_m$ rozdíl Larmorovy frekvence vodíkových jader koordinované vody a okolní vody

Z rovnice (8) vyplývá, že pokud bude výměna vody velmi rychlá ($\tau_m << T_{1m}$), pak relaxační rychlost bude řízena pouze relaxačním časem vodíkových jader koordinované vody. Pro protony se uplatňují dva typy relaxačních mechanismů: dipól–dipólový mechanismus (DD) a skalární (kontaktní) mechanismus (SC), rovnice (10).

$$\frac{1}{T_{im}} = \frac{1}{T_i^{DD}} + \frac{1}{T_i^{SC}}, \quad i = 1, 2 \tag{10}$$

Jednotlivé příspěvky relaxačních časů jsou obecně vyjádřeny modifikovanými Solomonovými–Bloembergenovými rovnicemi (11–14).[29,30]

$$\frac{1}{T_1^{DD}} = \frac{2}{15}\left(\frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r^6}\right) S(S+1)\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left(\frac{3\tau_{c1}}{1+\omega_I^2\tau_{c1}^2} + \frac{7\tau_{c2}}{1+\omega_s^2\tau_{c2}^2}\right) \tag{11}$$

$$\frac{1}{T_1^{SC}} = \frac{2S(S+1)}{3}\left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \left(\frac{\tau_{e2}}{1+\omega_s^2\tau_{e2}^2}\right) \tag{12}$$

$$\frac{1}{T_2^{DD}} = \frac{1}{15}\left(\frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r^6}\right) S(S+1)\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left(\frac{3\tau_{c1}}{1+\omega_I^2\tau_{c1}^2} + \frac{13\tau_{c2}}{1+\omega_s^2\tau_{c2}^2} + 4\tau_{c1}\right) \tag{13}$$

$$\frac{1}{T_2^{SC}} = \frac{S(S+1)}{3}\left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \left(\frac{\tau_{e2}}{1+\omega_s^2\tau_{e2}^2} + \tau_{e1}\right) \tag{14}$$

kde je:

γ_I gyromagnetický poměr protonu

g g-faktor elektronu

μ_B Bohrův magneton

r vzdálenost mezi iontem Gd^{3+} a vodíkovým atomem koordinované vody

ω_I Larmorova frekvence protonu

ω_s Larmorova frekvence elektronu

$A/\hbar$ konstanta hyperjemného štěpení

τ_{ci} a τ_{ei} i = 1, 2, korelační časy popsané rovnicemi (15) a (16)

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_m}, \quad i = 1, 2 \tag{15}$$

$$\frac{1}{\tau_{ei}} = \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_m}, \quad i = 1, 2 \tag{16}$$

kde je:

T_{ie} i = 1, 2, elektronový relaxační čas iontu kovu

τ_R rotační korelační čas

Elektronové relaxační rychlosti popisuje Bloembergenova–Morganova teorie, rovnice (17–19).[28] Tato teorie vychází z předpokladu, že srážkami komplexu s molekulami vody, popř. molekulovými vibracemi, dochází k rozštěpení degenerovaných elektronových hladin iontu kovu, tzv. Zero Field Splitting (ZFS). Ačkoliv byla tato teorie původně odvozena pro komplexy s oktaedrickou symetrií, zpravidla postačuje i pro komplexy s nižší symetrií, které mají kromě dočasného i statické ZFS.[31]

$$\frac{1}{T_{1e}} = 2C\left(\frac{1}{1+\omega_s^2\tau_v^2} + \frac{4}{1+4\omega_s^2\tau_v^2}\right) \tag{17}$$

$$\frac{1}{T_{2e}} = C\left(\frac{5}{1+\omega_s^2\tau_v^2} + \frac{2}{1+4\omega_s^2\tau_v^2} + 3\right) \tag{18}$$

$$C = \frac{1}{50}\Delta^2\tau_v\left[4S(S+1)-3\right] \tag{19}$$

kde je:

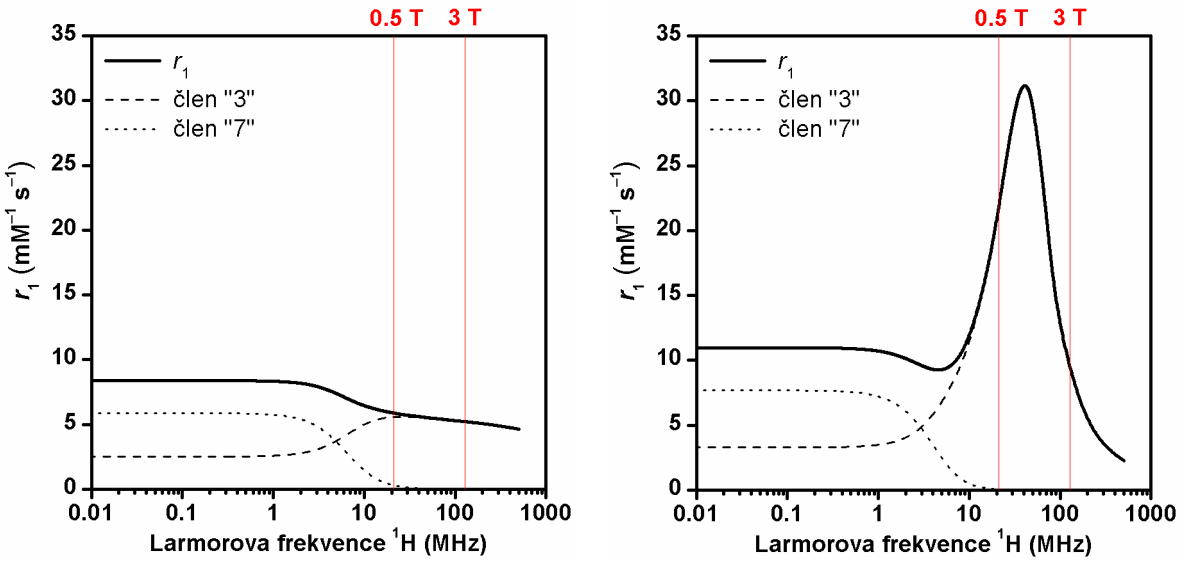
Δ^2 kvadrát stopy tenzoru ZFS

τ_v korelační čas modulace ZFS interakce

V rovnici (11) vystupují dva členy označované jako disperzní, protože když je $\omega^2\tau_c^2 > 1$, pak relaxační rychlost klesá s rostoucí intenzitou magnetického pole. Protože Larmorova frekvence elektronu je 658-krát větší něž protonu, bude člen „7“ klesat k nule při nižších polích než člen „3“. Když prodloužíme rotační korelační čas, je možno pozorovat při vyšších polích nárůst relaxivity a následně pokles členu „3“ (Obrázek 3-6).

3.4.2. Vnější koordinační sféra

Paramagnetický ion kovu ovlivňuje i relaxaci molekul vody, které na něj nejsou přímo koordinovány, ale nacházejí se v dostatečné blízkosti paramagnetického centra. Tento příspěvek popisuje člen r_i^{OS} a je srovnatelný s r_i^{IS}. Delší vzdálenost molekul vody od paramagnetického centra je vyvážena větším počtem přítomných molekul vody. Relaxace je primárně ovlivněna difúzním koeficientem vody a vzdáleností vody od komplexu. Relaxační rychlosti popisují rovnice (20) a (21).[32]



Obrázek 3-6. Počítačová simulace závislosti příspěvku vnitřní koordinační sféry k longitudinální ^{1}H relaxivitě na magnetickém poli komplexu $[Gd(dtpa)(H_2O)]^{2-}$ (298 K) pro různá τ_R: (a) τ_R = 100 ps, (b) τ_R = 10 ns. Křivky označené člen „3“ a člen „7“ představují jednotlivé příspěvky členů v rovnici (11). Na obrázku je také vyznačena klinicky používaná oblast magnetického pole (0,5–3 T).

$$\frac{1}{T_1^{OS}} = C\left[3j(\omega_I) + 7j(\omega_S)\right] \tag{20}$$

$$\frac{1}{T_2^{OS}} = C\left[2 + 1{,}5j(\omega_I) + 6{,}5j(\omega_S)\right] \tag{21}$$

kde je:

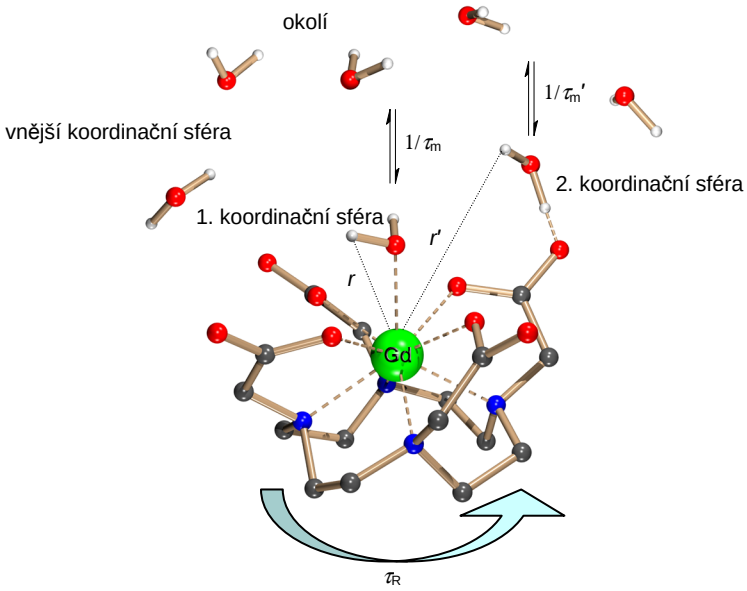
$$C = \left(\frac{32\pi}{405}\right)\gamma_I^2\gamma_S^2\hbar^2 S(S+1)\frac{N_A[M]}{1000aD}$$

$$j(\omega_S) = \mathrm{Re}\left[\frac{1 + 1/4\left(i\omega\tau_D + \frac{\tau_D}{T_{1e}}\right)^{1/2}}{1 + \left(i\omega\tau_D + \frac{\tau_D}{T_{1e}}\right)^{1/2} + 4/9\left(i\omega\tau_D + \frac{\tau_D}{T_{1e}}\right) + 1/9\left(i\omega\tau_D + \frac{\tau_D}{T_{1e}}\right)^{3/2}}\right]$$

N_A	Avogadrovo číslo
[M]	koncentrace komplexu
a	vzdálenost molekuly vody od komplexu
D	suma difúzních koeficientů vody a komplexu
$j(\omega_S)$	funkce spektrální hustoty
τ_D	difúzní korelační čas, $\tau_D = a^2/D$

3.4.3. Druhá koordinační sféra

Speciální případ vnější koordinační sféry je druhá koordinační sféra. Tuto sféru tvoří molekuly vody vázané na paramagnetický komplex jiným typem interakce, např. vodíkovou vazbou. Molekuly vody tak setrvají v blízkosti paramagnetického centra déle, než odpovídá výměně způsobené difúzí. Relaxační rychlost lze popsat setem rovnic, analogických těm, které popisují relaxaci v první koordinační sféře, rovnice (8) a (11). Pro odlišení se parametry popisující relaxaci v druhé koordinační sféře označují apostrofem: q', r', τ_m' atd. Je obtížné zjistit hydratační číslo v druhé koordinační sféře, stejně tak vzdálenost Gd–H. Výměna vody je rychlá, takže relaxační rychlost je řízena T_{1m}. Schématické znázornění tří typů molekul vody kolem paramagnetického centra ilustruje Obrázek 3-7.



Obrázek 3-7. Model Gd^{3+} komplexu v roztoku jako kontrastní látky a znázornění některých molekulárních parametrů ovlivňujících relaxivitu.

3.5. Metody studia T_1 kontrastních látek

Pro studium potenciálních kontrastních látek se používá závislost relaxační rychlosti na magnetickém poli (NMRD, Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion). Nejčastěji se popisuje relaxační rychlost protonu vody, $1/T_1$, v přítomnosti komplexu Gd^{3+}. Relaxivita v první koordinační sféře je popsána rovnicemi (8), (11) a (12). Vzhledem k iontovému charakteru komplexů Gd^{3+} a vzdálenosti protonů vody od iontu Gd^{3+} je hodnota konstanty hyperjemného štěpení, $A/\hbar$, zanedbatelná. Proto se skalární mechanismus relaxace, rovnice (12), nepodílí na relaxaci. Navíc člen $1/\omega_s^2$ disperguje při frekvencích nad 10 MHz. Hodnotu $1/T_1^{IS}$ tedy určuje $1/T_1^{DD}$, rovnice

(11), a τ_m, rovnice (8). Proměnnými v těchto rovnicích jsou τ_m, τ_R, q, r, T_{1e} a T_{2e}. Elektronové relaxační časy jsou definovány Δ^2 a τ_v. Tyto parametry nemohou být jednoduše vypočteny ze změřené relaxivity. Naštěstí lze některé parametry stanovit nezávisle a ostatní mohou být nasimulovány. Pochopení vlivu těchto parametrů na výsledný NMRD profil je klíčem k přípravě kontrastních látek s vyšší relaxivitou. V této kapitole jsou uvedeny metody, kterými lze tyto parametry stanovit.

3.5.1. Hydratační číslo

Z rovnice (8) je zřejmé, že zvýšením hydratačního čísla lze přímo úměrně zvýšit příspěvek vnitřní koordinační sféry k longitudinální relaxivitě. Na druhou stranu zvýšení q je často spojeno se snížením termodynamické stability a kinetické inertnosti komplexů. Hydratační číslo lze stanovit několika metodami. V pevné fázi je to rentgenostrukturní analýza, kterou ale nelze použít pro studium koordinační sféry ve vodném roztoku. Jedna z metod, kterou lze použít, je LIS (Lanthanide Induced Shift).[13] Indukovaný posun jádra i v blízkosti iontu Ln^{3+} j způsobují tři mechanismy: diamagnetický, kontaktní a pseudokontaktní. Diamagnetický posun (Δ_{ij}^{dia}) je obvykle malý a je vyvolán konformační změnou a indukčním efektem. Jeho hodnotu lze stanovit z indukovaného posunu vyvolaného diamagnetickými ionty (La^{3+} a Lu^{3+}). Původ kontaktního posunu ($\Delta_{ij}^{kontakt}$) je v interakci přes vazbu nepárových spinů 4*f*-elektronů s pozorovaným jádrem. Pseudokontaktní posun ($\Delta_{ij}^{pseudokontakt}$) je výsledkem dipolární interakce přes prostor. Odečtením diamagnetického příspěvku získáme posun způsobený čistě iontem Ln^{3+} (Δ'_{ij}), rovnice (22).

$$\Delta'_{ij} = \Delta_{ij} - \Delta_{ij}^{dia} = \Delta_{ij}^{kontakt} + \Delta_{ij}^{pseudokontakt} \tag{22}$$

Oba členy $\Delta_{ij}^{kontakt}$ a $\Delta_{ij}^{pseudokontakt}$ lze vyjádřit součinem členů charakteristických pro ion Ln^{3+}, ale nezávislých na ligandu ($\langle S_z \rangle$ a C_j pro $\Delta_{ij}^{kontakt}$ a $\Delta_{ij}^{pseudokontakt}$), a druhého členu charakterizujícího studované jádro, ale nezávislého na iontu Ln^{3+} (F_i a G_i pro $\Delta_{ij}^{kontakt}$ a $\Delta_{ij}^{pseudokontakt}$), rovnice (23). Teoreticky vypočtené hodnoty pro $\langle S_z \rangle$ a C_j uvádí Tabulka 3-2.[13]

$$\Delta'_{ij} = \langle S_z \rangle F_i + C_j G_i \tag{23}$$

kde je:

$\langle S_z \rangle$ očekávaná hodnota spinu

C_j relativní magnetická konstanta

Rovnici (23) lze přepsat do dvou lineárních forem, rovnice (24) a (25), a z hodnoty směrnice lze určit člen F_i resp. G_i.

$$\Delta'_{ij}/C_j = (\langle S_z \rangle / C_j) F_i + G_i \tag{24}$$

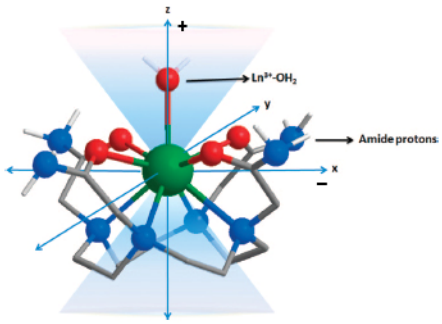
$$\Delta'_{ij}/\langle S_z \rangle = F_i + (C_j/\langle S_z \rangle) G_i \tag{25}$$

Tabulka 3-2. Teoretické hodnoty konstanty $\langle S_z \rangle$ a relativní hodnoty konstanty C_j při 298 K.[13]

Ln^{3+}	$\langle S_z \rangle$	C_j
Ce^{3+}	−0,974	−6,3
Pr^{3+}	−2,956	−11,0
Nd^{3+}	−4,452	−4,2
Sm^{3+}	0,224	−0,7
Eu^{3+}	7,569	4,0
Gd^{3+}	31,500	0,0
Tb^{3+}	31,853	−86
Dy^{3+}	28,565	−100
Ho^{3+}	22,642	−39
Er^{3+}	15,382	33
Tm^{3+}	8,210	53
Yb^{3+}	2,584	22

Když je série komplexů Ln^{3+} se studovaným ligandem izostrukturní, jsou hodnoty členů F_i a G_i nezávislé na iontu Ln^{3+} a závislost je lineární podle rovnic (24) a (25). V případě, že v průběhu lanthanoidové řady dojde např. ke změně koordinačního módu ligandu či změně hydratačního čísla, změní se hodnota F_i, což se ve vynesené závislosti projeví výrazným zlomem. Malé změny v hodnotě G_i reflektují malé změny v orientaci ligandů kolem centrálního iontu Ln^{3+}, způsobené zmenšováním iontového poloměru iontu Ln^{3+} směrem k těžším členům lanthanoidové řady. Znaménko směrnice přímky závisí na umístění jádra vzhledem k McConnellově kuželu vymezeného iontem Ln^{3+} (Obrázek 3-8).[33] Pro jádra umístěná v magnetické ose komplexu, tedy nad a pod iontem Ln^{3+}, je znaménko kladné, a pro jádra umístěná po stranách iontu Ln^{3+} je znaménko směrnice záporné.

Ze znalosti hodnoty konstanty F_i pro koordinovanou $H_2{}^{17}O$ lze podle vztahu (26) vypočítat konstantu hyperjemného štěpení $A/\hbar$, jejíž znalost je potřebná při výpočtu rychlostní konstanty výměny koordinované vody (viz kap. 3.5.3).[13]



Obrázek 3-8. Ilustrace indukovaného posunu pro různě umístěná jádra vzhledem k McConnellově kuželu (značený modrým kuželem). Protože voda je koordinovaná rovnoběžně s osou z (magnetická osa komplexu), je její LIS kladný, zatímco např. amidové protony umístěné po stranách mají LIS záporný. Obrázek byl převzat z lit.[33]

$$F_i = \frac{\mu_B}{3k_B T\gamma_i}\frac{A}{\hbar}10^6 \quad (26)$$

kde:

μ_B Bohrův magneton

k_B Boltzmannova konstanta

γ_i gyromagnetický poměr jádra ^{17}O

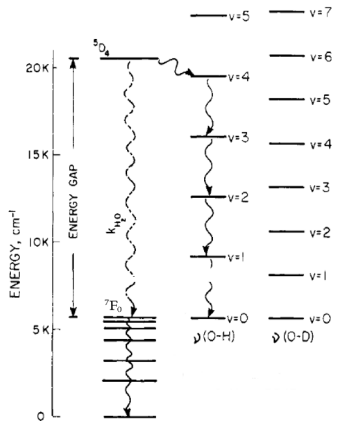
T termodynamická teplota

Ionty Dy^{3+} mají vysoký podíl kontaktního příspěvku k indukovanému posunu (> 85 %), proto lze pseudokontaktní příspěvek oddělit a tím eliminovat neznámé hydratační číslo v druhé koordinační sféře. Závislost posunů ^{17}O v komplexech Dy^{3+} na koncentraci komplexu je přímka se směrnicí úměrnou hydratačnímu číslu. Porovnáním hodnoty této směrnice se směrnicí získanou pro referenční sloučeninu se známým hydratačním číslem (nejčastěji $[Dy(H_2O)_8]^{3+}$) lze stanovit hydratační číslo pro studovaný komplex. Tato metoda vyžaduje vysoké koncentrace komplexu (> 10 mM).

Hydratační číslo může být také stanoveno luminiscencí. Měří se doba života luminiscence komplexu Eu^{3+} nebo Tb^{3+} v roztocích v H_2O a D_2O. Oba tyto lanthanoidy mají podobný iontový poloměr jako gadolinium, proto mají příslušné izostrukturní komplexy stejné hydratační číslo. Z jednoduchého empirického vztahu, rovnice (27), lze určit hydratační číslo.[34]

$$q = A(k_{H_2O} - k_{D_2O}) \quad (27)$$

Kde A je empiricky stanovená konstanta úměrnosti. Vyjadřuje citlivost obou iontů Ln^{3+} vůči zhášení luminiscence. Pro Tb komplexy je $A = 4{,}2\ ms^{-1}$ a pro Eu komplexy je $A = 1{,}05\ ms^{-1}$. Konstanta k_{H_2O} a k_{D_2O} popisuje rychlost vyhasínání luminiscence v H_2O a D_2O roztoku. Zhášení luminiscence z excitovaných stavů Tb^{3+} a Eu^{3+} v roztoku se děje přenosem na vibrační energii overtonů koordinovaných molekul H_2O a D_2O. Přenos energie skrze O–H valenční vibraci a jeho rychlost je úměrná počtu O–H oscilátorů, které jsou přítomny na iontu Tb^{3+}/Eu^{3+}. Z důvodů izotopového efektu je frekvence O–D oscilátoru menší než O–H oscilátoru, takže při přenosu energie z excitovaného stavu iontu Tb^{3+}/Eu^{3+} na vibrační energii je přenos u O–D oscilátoru uskutečněn na vibrační hladinu s vyšším vibračním číslem v než u O–H oscilátoru (Obrázek 3-9). Navíc pravděpodobnost overtonů ze základní vibrační hladiny do vyšší vibrační hladiny klesá s narůstající vibrační hladinou. Proto přenos energie O–D oscilátoru na komplexech Tb^{3+}/Eu^{3+} je 200-krát pomalejší než u O–H oscilátoru.[35]



Obrázek 3-9. Deexcitační schéma pro ion Tb^{3+}. Energetický rozdíl mezi excitovaným stavem $^5D_4$ a nejvyšším akceptorovým stavem $^7F_0$ odpovídá energiím vibračních overtonů O–H a O–D oscilátorů. Obrázek byl převzat z lit.[34]

Výše uvedenými metodami se určí průměrné hydratační číslo s chybou ±20 %, proto nemůžeme s určitostí říci, jestli v roztoku koexistuje více hydratačních stavů nebo má komplex jen jeden hydratační stav. Odpověď na tuto otázku přináší UV–Vis spektroskopie komplexů Eu^{3+}. Absorpční pás přechodu $^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ ve viditelné oblasti (578–582 nm) je hypersenzitivní ke změnám v koordinačním okolí. Ačkoli je tento přechod málo intenzivní, je extrémně ostrý, a proto lze podle jeho tvaru usuzovat na přítomnost různých koordinačních stavů kovu.[36]

Zech *et al.* použili pulzní ENDOR (Electron–Nuclear Double Resonance) spektroskopii k přímému stanovení *q*.[37] Při této technice se porovnává rozdíl v intenzitě ^1H ENDOR spektra změřeného v H_2O a D_2O, který je úměrný počtu vyměnitelných protonů. Výhodou této metody je možnost změřit hydratační číslo *q* přímo pro komplexy Gd^{3+}. Další výhodou je použití při stanovení *q* pro adukty komplexů s proteiny.

3.5.2. Rotační korelační čas

Rotace je asi nejdůležitější parametr ovlivňující relaxační vlastnosti kontrastní látky. Pro malé komplexy Gd^{3+} je při klinicky používaném magnetické poli (0,5–3 T) příspěvek rotačního korelačního času k celkovému korelačnímu času největší. Aby byl dipól–dipólový mechanismus relaxace efektivní, je třeba zpomalit reorientační pohyb komplexu (o strategii zpomalení rotačního korelačního času viz kap. 3.6.2). Vliv τ_R na tvar NMRD profilu ilustruje Obrázek 3-6.

Rotační korelační čas lze stanovit několika fyzikálními metodami. Clarkson *et al.* substituovali ion Gd^{3+} v různých komplexech iontem VO^{2+}.[38,39] Tvar EPR spektra komplexů s iontem VO^{2+} je citlivý na rotaci molekuly, takže simulací EPR spektra lze určit hodnotu τ_R. Problém této techniky je zřejmý – ion VO^{2+} není ion Gd^{3+}. Merbach *et al.* použili měření T_1 relaxačního času $H_2{}^{17}O$ k určení τ_R.[5] Relaxační měření lze také použít u jader ^{13}C nebo ^2H v diamagnetických analozích komplexů Gd^{3+} (Y^{3+}, La^{3+} nebo Lu^{3+}).[40,41] Hlavním omezením je malá citlivost těchto jader v NMR spektroskopii. Tento problém lze částečně vyřešit přípravou značených sloučenin (^{13}C resp. ^2H).

Hrubý odhad τ_R lze vypočítat z Debyeovy–Stokesovy rovnice (28).[23] Tato rovnice platí pro sférické částice. Často neznámé r je nutno odhadnout, a navíc na molekulární úrovni vystupuje v tomto vztahu mikroskopická viskozita, která je odlišná od změřené makroskopické viskozity roztoku.

$$\tau_R = \frac{4\pi r^3 \eta}{3 k_B T} \tag{28}$$

kde:

r poloměr částice

η viskozitní koeficient

k_B Boltzmannova konstanta

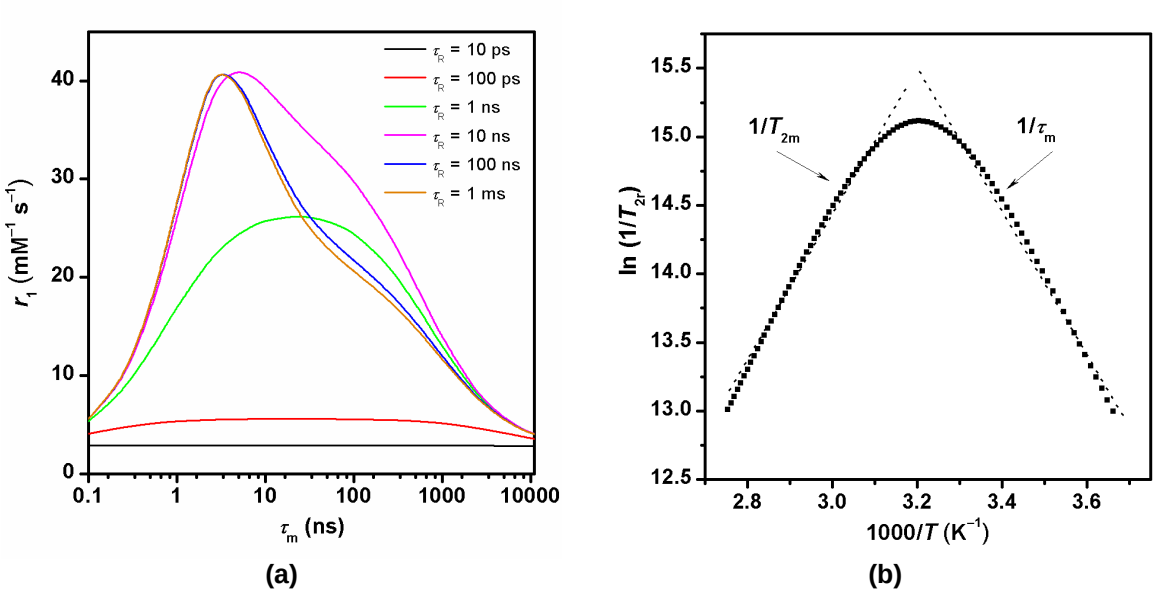
T termodynamická teplota

Pro malé molekuly je rotační pohyb isotropní. Tento přístup ale selhává pro makromolekuly. Lipari a Szabo navrhli komplexnější model, který popisuje korelační čas dvěma členy – globálním pohybem molekuly a vnitřním pohybem vektoru Gd–H_{voda}.[42]

3.5.3. Rychlost výměny vody

Rezidenční čas koordinované vody je také důležitým parametrem. Výměna koordinované vody s okolím musí být rychlá, aby byl přenesen relaxační efekt do celého okolí. Rezidenční čas τ_m vstupuje do rovnic pro relaxivitu přímo, rovnice (8), a nepřímo přes korelační čas, rovnice (15) a (16). Když je výměna vody rychlá, pak krátký τ_m určuje celkový korelační čas. Pokud bude výměna vody pomalá, bude i relaxační efekt do okolí rozšířen pomalu. Na druhou stranu příliš rychlá výměna vody způsobí také snížení relaxivity, protože voda nebude na iontu Gd^{3+} koordinována dostatečně dlouho na to, aby zrelaxovala. Tuto závislost relaxivity na τ_m ilustruje Obrázek 3-10 a. Z tohoto obrázku je zřejmé, že pro daný parametr (např. τ_R) je pro maximální hodnotu relaxivity nezbytná optimální hodnota rychlosti výměny vody. Např. pro τ_R = 100 ps je hodnota relaxivity nezávislá na τ_m v rozsahu 1–1000 ns a dosahuje 10 % maximální hodnoty relaxivity. Pokud prodloužíme τ_R na 1 ns, vzroste relaxivita na 60 % maxima pro hodnoty τ_m 3–100 ns. Maximální relaxivity dosáhneme pro τ_R > 10 ns a τ_m v rozsahu 1–10 ns.

Rychlostní konstantu výměny vody k_{ex} ($k_{ex} = 1/\tau_m$) ve vnitřní koordinační sféře lze stanovit měřením teplotní závislosti T_2 relaxačního času ^{17}O v $H_2{}^{17}O$ v roztoku komplexu Gd^{3+}. Pro



Obrázek 3-10. (a) Simulace vztahu mezi rotačním korelačním časem τ_R a rezidenčním časem koordinované vody τ_m komplexu $[Gd(dtpa)(H_2O)]^{2-}$ (B = 1,5 T, T_{1e} = 10 ns). (b) Simulace teplotní závislosti transverzální relaxační rychlosti ^{17}O při B = 9,4 T (400 MHz) komplexu $[Gd(dtpa)(H_2O)]^{2-}$ s $k_{ex}^{298} = 3{,}3 \cdot 10^6$ s^{-1}.

komplexy s $q \neq 0$ lze příspěvek vnější koordinační sféry k ^{17}O T_2 relaxačním časům zanedbat.[43] Vzhledem k malým hodnotám $\Delta\omega_m^2$ lze rovnici (9) přepsat do tvaru (29).

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_p = \frac{1}{T_2^{IS}} = qP_m\left[\frac{1}{\tau_m + T_{2m}}\right] \tag{29}$$

U přímo koordinovaných molekul vody převládá skalární mechanismus relaxace ^{17}O popsaný rovnicí (14), která se při vysokých polích zjednoduší do rovnice (30).

$$\frac{1}{T_{2m}} = \frac{1}{T_2^{SC}} = \frac{1}{3}S(S+1)\left(\frac{A}{\hbar}\right)^2\left(\frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{\tau_m}\right)^{-1} \tag{30}$$

Závislost rychlostní konstanty výměny vody na teplotě popisuje Eyringova rovnice (31).[43]

$$k_{ex} = \frac{k_B T}{h}\exp\left(\frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} - \frac{\Delta H^{\ddagger}}{RT}\right) = \frac{k_{ex}^{298} T}{298.15}\exp\left[\frac{\Delta H^{\ddagger}}{R}\left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T}\right)\right] \tag{31}$$

kde je:

k_B	Boltzmannova konstanta
h	Planckova konstanta
$\Delta S^{\ddagger}$	aktivační entropie výměny vody
$\Delta H^{\ddagger}$	aktivační enthalpie výměny vody
T	termodynamická teplota

Místo skutečné transverzální relaxační rychlosti $1/T_2$ se zavádí redukovaná relaxační rychlost $1/T_{2r}$, rovnice (32).

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m}\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2,dia}}\right) = \frac{1}{T_{2m} + \tau_m} \tag{32}$$

kde je:

T_2 transverzální relaxační čas paramagnetického komplexu

$T_{2,dia}$ transverzální relaxační čas referentního diamagnetického komplexu

Ze závislosti redukované relaxační rychlosti na reciproké teplotě (Obrázek 3-10 b) lze vypočítat τ_m. Při nízkých teplotách redukovaná relaxační rychlost roste s teplotou. V této oblasti tzv. pomalé kinetiky výměny vody je relaxační rychlost ^{17}O jader limitována rychlostí výměny vody, $1/\tau_m$. Při vyšší teplotě, v oblasti tzv. rychlé kinetiky výměny vody, redukovaná relaxační rychlost klesá s rostoucí teplotou. Rychlost relaxace určuje relaxační rychlost koordinované vody, $1/T_{2m}$. Jestliže je relaxační rychlost příliš vysoká i při nízké teplotě ($k_{ex} >> 1/T_{2m}$), nelze naměřit oblast pomalé kinetiky. V takovém případě je nutné pro přesný výpočet τ_m znát hodnotu elektronového relaxačního času, T_{2e}, získaného z EPR měření, a změřit relaxační rychlosti ^{17}O při různých intenzitách magnetického pole.

Výměna koordinované vody může probíhat buď asociativním, disociativním nebo výměnným mechanismem. Mechanismus lze určit podle hodnoty změny aktivačního objemu, $\Delta V^{\ddagger}$, který lze zjistit ze závislosti relaxační rychlosti ^{17}O na tlaku.[44] Změna aktivačního objemu je definována jako rozdíl parciálního molárního objemu reaktantů a transitního stavu a souvisí se závislostí rychlosti výměny vody na tlaku, rovnice (33).

$$k_{ex} = \left(k_{ex}\right)_0^T \exp\left(-\frac{\Delta V^{\ddagger}}{RT}p\right) \tag{33}$$

kde je:

$\left(k_{ex}\right)_0^T$ rychlost výměny při nulovém tlaku a teplotě T

p tlak

Zvyšování tlaku tedy zpomalí nebo zrychlí výměnu vody, když je hodnota $\Delta V^{\ddagger}$ kladná, resp. záporná. V případě disociativního mechanismu má $\Delta V^{\ddagger}$ vysokou kladnou hodnotu. Vysoká záporná hodnota $\Delta V^{\ddagger}$ naopak indikuje asociativní mechanismus.

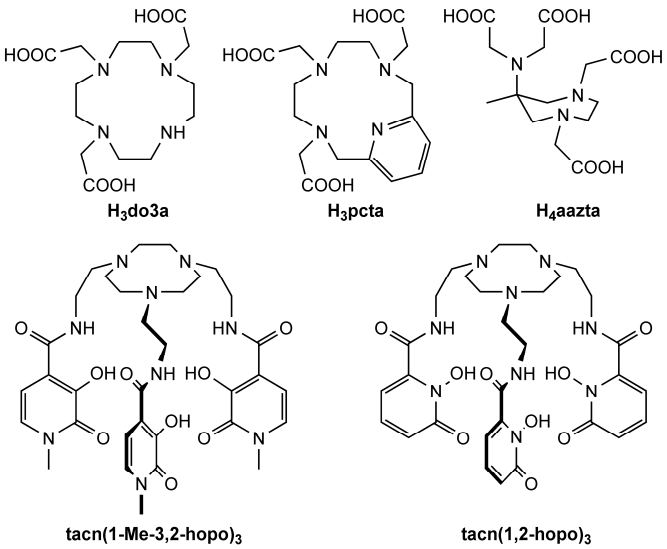
3.6. Design T_1 kontrastních látek

Podle SBM teorie lze dosáhnout hodnot relaxivity kolem 100 $mM^{-1} s^{-1}$ při magnetickém poli kolem 1 T (42 MHz) (pro $q = 1$) optimalizací klíčových parametrů (τ_m a τ_R). V této kapitole budou nastíněny některé přístupy, jak lze designem struktury T_1 kontrastní látky změnit výše uvedené parametry ve prospěch zvýšení relaxivity.

Z hlediska obecných fyzikálně-chemických vlastností kontrastních látek je důležitým parametrem osmolalita. Pro intravenózní podání je vhodné, aby podávaný roztok kontrastní látky měl podobnou osmolalitu jako krevní sérum. Zátěž pro vaskulární systém a ledviny je tak menší. Nižší osmolalitu mají neutrální komplexy. Pro nabité komplexy je důležité vytvoření stabilního iontového páru. S nízkou osmolalitou roztoku je také spojena nízká viskozita, která je výhodná pro aplikace, které vyžadují rychlé podání.

3.6.1. Zvýšení hydratačního čísla

Jak už bylo řečeno dříve, zvýšení hydratace paramagnetického iontu je spojeno se snížením termodynamické stability a kinetické inertnosti komplexů. Navíc možnost koordinace více molekul vody na paramagnetický ion může vést ke koordinaci endogenních bidentátních ligandů, např. fosfátu nebo hydrogenuhličitanu, což vede ke snížení relaxivity. První studovaný komplex se dvěma molekulami vody v první koordinační sféře byl [Gd(do3a)(H_2O)$_2$] (Obrázek 3-11).[45] Relaxivita byla malá v přítomnosti endogenních ligandů, protože docházelo ke tvorbě ternárních komplexů. Dalšími studovanými heptadentátními ligandy byly PCTA a jeho analoga (Obrázek 3-11).[46] Aime



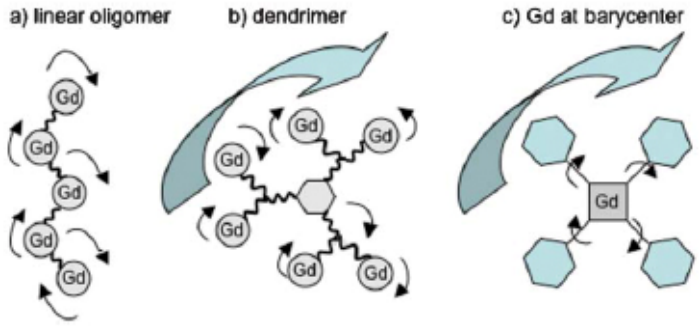
Obrázek 3-11. Struktury hexa- a heptadentátních ligandů zmíněných v textu.

et al. studovali další heptadentátní ligand AAZTA (Obrázek 3-11).[47] U komplexů Gd^{3+} s těmito ligandy nedochází ke tvorbě ternárních komplexů a relaxivita je dvojnásobná ve srovnání s komplexy s jednou molekulou vody (7–10 mM s^{-1} při 20 MHz a 25 °C). Tyto komplexy jsou dostatečně termodynamicky stabilní a relativně kineticky inertní. Poměrně velká skupina komplexů Gd^{3+} je odvozena od ligandu hydroxypyridinonu (HOPO).[48,49] Hexadentátní ligand je tvořen třemi bidentátními 3,2- nebo 1,2-hopo jednotkami spojenými např. 1,4,7-triazacyklononanem (TACN) (Obrázek 3-11). Relaxivita komplexů Gd^{3+} s těmito ligandy je 13,1 mM s^{-1} a 12,5 mM s^{-1} (při 20 MHz a 25 °C).[50]

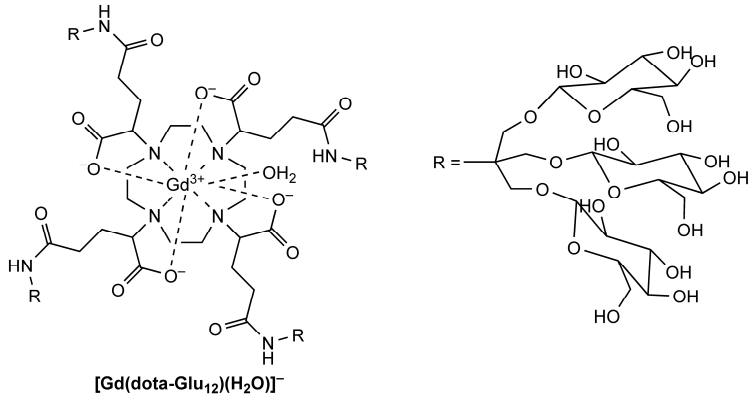
U více hydratovaných komplexů Gd^{3+} hraje důležitou roli koordinační geometrie. Pokud je voda koordinována v sousedních polohách, může být snadno substituována bidentátními ligandy. Oproti tomu koordinace vody v nesousedních polohách činí substituci obou molekul vody malými bidentátními ligandy nemožnou.

3.6.2. Optimalizace rotačního korelačního času

Prodloužit rotační korelační čas lze kovalentní nebo nekovalentní vazbou komplexu s makromolekulou nebo supramolekulárním nosičem. Spojení komplexů do lineárního řetězce vede k oligomeru s anizotropním pohybem a v důsledku velkého lokálního pohybu je relaxivita omezena. Oproti tomu sférické dendrimery s komplexy gadolinia vykazují isotropní pohyb s malým lokálním pohybem, speciálně v případech, kdy je komplex rigidně navázán na nosič. Různé typy pohybu ilustruje Obrázek 3-12. Například relaxivita (vztažená na jeden ion Gd^{3+}) komplexu Gd-DOTA navázaného přes amidickou vazbu na lineární dextran je o 40 % nižší (10,6



Obrázek 3-12. Různé strategie zvýšení relaxivity ovlivněním lokálního a globálního pohybu. (a) V lineárním polymeru je v molekule přítomno více jednotek Gd, ale relaxivita je nízká v důsledku velkého lokálního pohybu. (b) Dendrimery mají také více jednotek Gd v molekule, ale díky sférickému tvaru je globální pohyb pomalý; lokální pohyb je však stále přítomen. (c) Monomerní jednotka Gd je umístěna v těžišti molekuly, proto podléhá jen pomalému globálnímu pohybu celé molekuly, což vede k vysoké relaxivitě. Obrázek byl převzat z lit.[51]



Obrázek 3-13. Struktura komplexu $[Gd(dota\text{-}Glu_{12})(H_2O)]^-$.

versus 16,5 $mM^{-1}\ s^{-1}$), než pro stejný komplex navázaný na dendrimer, přestože druhý nosič má mnohem menší molekulovou hmotnost (15 versus 52 kDa).[52,53]

Jinou elegantní cestou pro zpomalení rotačního času je umístění vektoru $Gd–H_{voda}$ do těžiště molekuly (Obrázek 3-12 c). Dobrým příkladem může být komplex $[Gd(dota\text{-}Glu_{12})(H_2O)]^-$ (Obrázek 3-13). Nárůst relaxivity z 4 $mM^{-1}\ s^{-1}$ pro komplex $[Gd(dota)(H_2O]^-$ na 23,5 $mM^{-1}\ s^{-1}$ (při 20 MHz a 25 °C) je způsoben zvýšením τ_R.[54]

Další přístup pro optimalizaci rotačního pohybu popsali Jacques a Desreux, kteří připravili bis-chelát pro ion Gd^{3+}, ve kterém jsou dvě koordinační klece spojeny bipyridinovým můstkem.[55] V přítomnosti iontu Fe^{2+} se tři bipyridinové jednotky oktaedricky koordinují a vytvoří tak rigidní oktaedrickou strukturu se šesti ionty Gd^{3+}. Tento koncept byl později rozšířen použitím dihydratovaného komplexu Gd^{3+} v tris(aduktu) s iontem Fe^{2+} s výslednou relaxivitou 33,6 $mM^{-1}\ s^{-1}$ (při 40 MHz a 25 °C) (Obrázek 3-14).[56] Tyto multitopní komplexy mají vysokou relaxivitu vztaženou na jeden ion Gd^{3+} a také vysokou relaxivitu vztaženou na jednotku hmotnosti komplexu. Pro molekulární zobrazování pomocí MRI je nutné do zkoumané tkáně dopravit více paramagnetických center, proto je účinnost těchto „středně velkých" kontrastních látek s těsně uspořádanými paramagnetickými centry lepší než při použití velkých makromolekul s nízkou hustotou paramagnetických center. Tento předpoklad vede k definici tzv. efektivní relaxivity nebo také hustoty relaxivity, která je definována jako zrychlení relaxace vyvolané jednotkou hmotnosti kontrastní látky, rovnice (34).

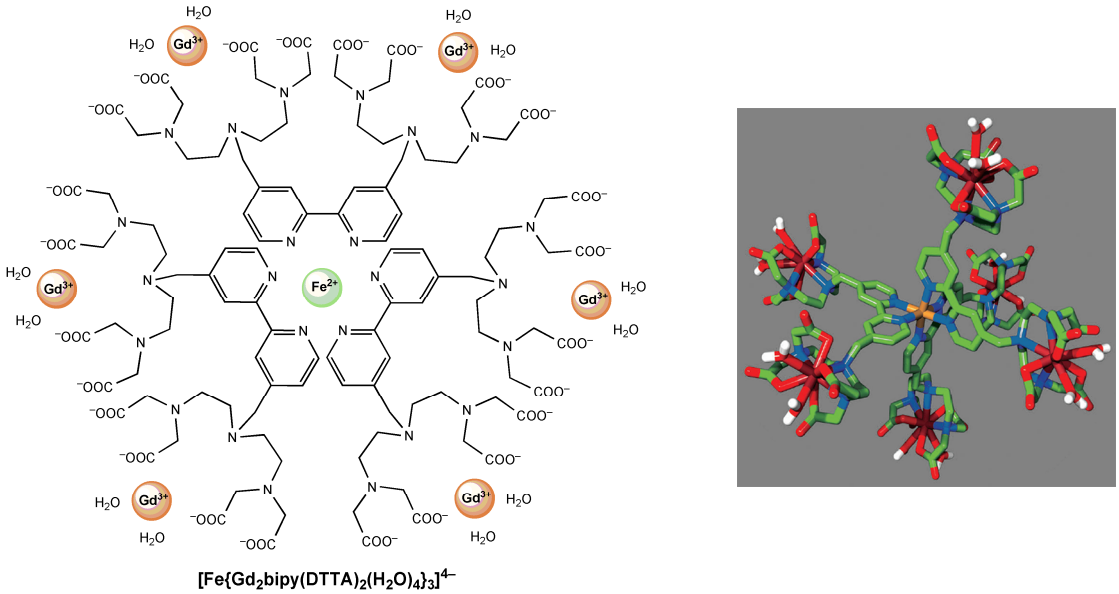
$$efektivní\ relaxivita = \frac{r_1 n_{Gd}}{M_r} 1000 \qquad (g/L)^{-1}\ s^{-1} \tag{34}$$

kde je:

r_1 molární relaxivita

n_{Gd} počet iontu Gd^{3+} v molekule

M_r relativní molekulová hmotnost



Obrázek 3-14. Příklad tzv. metallostar – tris(adukt) iontu Fe^{2+} s dihydratovaným komplexem Gd^{3+} tvoří kompaktní strukturu s vysokou relaxivitou. Obrázek byl převzat z lit.[56]

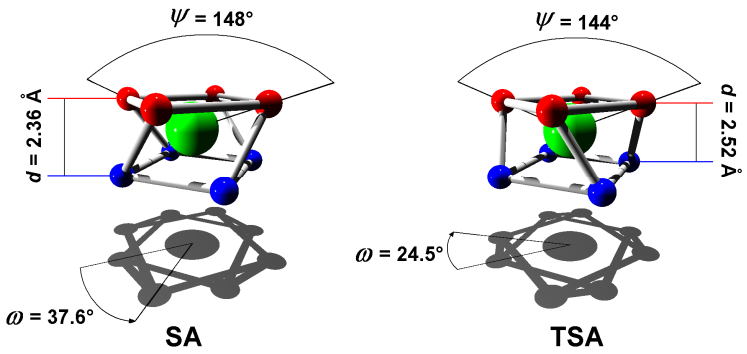
Příkladem nekovalentní interakce je tvorba aduktu komplexu Gd^{3+} se sérovým albuminem (HSA). V těchto případech mají ligandy lipofilní část – dlouhý alifatický nebo aromatický substituent, který zvyšuje afinitu k HSA. Nejznámější příklad je klinicky používaný MS-325 (Obrázek 3-3). Po zakotvení MS-325 do HSA přes lipofilní difenylcyklohexylovou skupinu vzroste relaxivita téměř 10-krát.[57] Tvorba aduktů HSA s komplexy Gd^{3+} může mít i negativní důsledky, např. zpomalení rychlosti výměny vody (viz kap. 3.6.3). Další negativum je spojeno s pozorováním, že u komplexů Gd^{3+} s $q > 1$ dochází k výraznému snížení relaxivity v důsledku substituce koordinované vody donorovými skupinami proteinu.[58] Na druhou stranu na povrchu makromolekuly mohou být přítomny labilní protony, které jsou v blízkosti komplexu odpovědny za příspěvek druhé koordinační sféry k celkové relaxivitě. Tento příspěvek je zvlášť markantní v případě komplexů Gd^{3+} bez koordinované vody v první koordinační sféře.[22]

3.6.3. Optimalizace rezidenčního času

Pro design ligandů je nutné porozumět vztahu mezi hodnotou rezidenčního času koordinované vody, τ_m, a strukturou komplexu. Hodnota τ_m závisí hlavně na náboji komplexu, stérickém pnutí

okolo vazebného místa vody, mechanismu výměny vody a u komplexů s deriváty ligandu DOTA na zastoupení izomerů TSA/SA. Ze srovnání komplexů Gd^{3+} s ligandem DOTA a jeho amidů je zřejmé, že negativně nabité komplexy mají kratší τ_m než elektroneutrální komplexy (např. ligand DOTA monoamid) nebo kladně nabité komplexy (např. ligand DOTA tetraamid) s τ_m v řádu milisekund.[23] Podobný trend vykazují acyklické ligandy odvozené od ligandu DTPA a jejich amidy. Stérické pnutí v místě koordinace vody urychluje výměnu vody a může být způsobeno např. substitucí acetátové skupiny objemnější fosfinátovou[59] nebo fosfonátovou skupinou.[60] Studiem komplexů lanthanoidů s deriváty ligandu DOTA s jednou koordinovanou vodou bylo zjištěno, že hodnota rezidenčního času je různá v závislosti na zastoupení izomerů SA a TSA v roztoku (Obrázek 3-15). Koordinovaná voda je v izomeru TSA vyměňována 10–100-krát rychleji, než v izomeru SA. Tento rozdíl je vysvětlován stérickým pnutím v místě koordinace vody, které usnadňuje disociativní mechanismus výměny vody.

Tvorba nekovalentních aduktů komplexů Gd^{3+} s makromolekulami, např. sérovým albuminem, může vést ke zpomalení rychlosti výměny vody a paradoxně tedy ke snížení relaxivity. Jedno z možných vysvětlení je tvorba vodíkových vazeb mezi vodou a polárními skupinami ve vazebném místě proteinu.[22,62]



Obrázek 3-15. Komplexy Ln^{3+} s ligandy typu DOTA existují v roztoku ve čtyřech stereoizomerech (dva enantiomerní páry diastereoizomerů $\Delta\delta\delta\delta\delta/\Lambda\lambda\lambda\lambda\lambda$ a $\Delta\lambda\lambda\lambda\lambda/\Lambda\delta\delta\delta\delta$). Příčinou izomerie jsou dvě možnosti natočení pendantních ramen (Δ, Λ) a dvě možnosti konformace aza-makrocyklu (δ, λ). Tyto izomery se mj. liší ve strukturních parametrech, např. v úhlu ω tvořeným vzájemným pootočením koplanárních rovin N_4 a O_4. Úhel otočení kolem 40° vede k izomeru SA (Square Antiprism) (enantiomerní pár $\Delta\lambda\lambda\lambda\lambda/\Lambda\delta\delta\delta\delta$), zatímco u izomeru TSA (Twisted Square Antiprism) (enantiomerní pár $\Delta\delta\delta\delta\delta/\Lambda\lambda\lambda\lambda\lambda$) je průměrná hodnota kolem 24°.[61] Poměr zastoupení těchto izomerů v roztoku se mění v závislosti na velikosti iontu Ln^{3+} a velikosti kavity. Izomer TSA preferuje ionty s větším poloměrem, tedy ze začátku lanthanoidové řady, zatímco izomer SA s preferencí menších iontů převažuje na jejím konci.

3.7. Regioselektivní N^1,N^4- a N^1,N^7-difunkcionalizace cyklenu

První syntéza cyklenu, 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu, byla publikována v roce 1961 Stetterem a Mayerem.[63] Po zjištění, že cyklen a jeho deriváty mohou komplexovat široké spektrum kovových kationtů, nastal opravdový rozmach v přípravě různých derivátů cyklenu, ve studiu jejich komplexů a jejich aplikací. V této kapitole budou ukázány některé syntetické strategie regioselektivní syntézy *N*-funkcionalizovaných derivátů cyklenu. Uvedeny jsou příklady jak jednoduchých derivátů, z nichž některé mohou být použity jako prekurzory pro další derivatizaci cyklenu, tak přímé syntetické cesty ke složitějším molekulám. Podrobnější přehled syntetických strategií je uveden v lit.[64]

Připravit N^1,N^4-derivát cyklenu lze přes cyklenoxamid.[65a] Cyklen **I** reaguje s ekvimolárním množstvím diethyl oxalátu v EtOH na cyklenoxamid **II**, který s benzylbromidem, 2-chlormethylpyridinem nebo *n*-propylbromidem poskytne příslušný disubstitovaný cyklenoxamid **IIIa–c**. Následná bazická[65a] nebo kyselá hydrolýza[65b] vede k N^1,N^4-disubstituovanému cyklenu **IVa–c** (Schéma 1).

Vysoce regioselektivní přímou alkylací cyklenu **I** *t*-butylbrom acetátem v nadbytku triethylaminu v $CHCl_3$ vzniká *cis*-DO2A **V** (Schéma 1).[66]

Syntetické cesty k N^1,N^7-disubstituovanému cyklenu mohou probíhat přímou substitucí cyklenu nebo přes tri- a tetracyklické intermediáty. Příkladem může být *N*-alkylace tricyklického meziproduktu, např. komplexu triamino trikarbonylchromu **VIa** nebo triamino trikarbonylmolybdenu

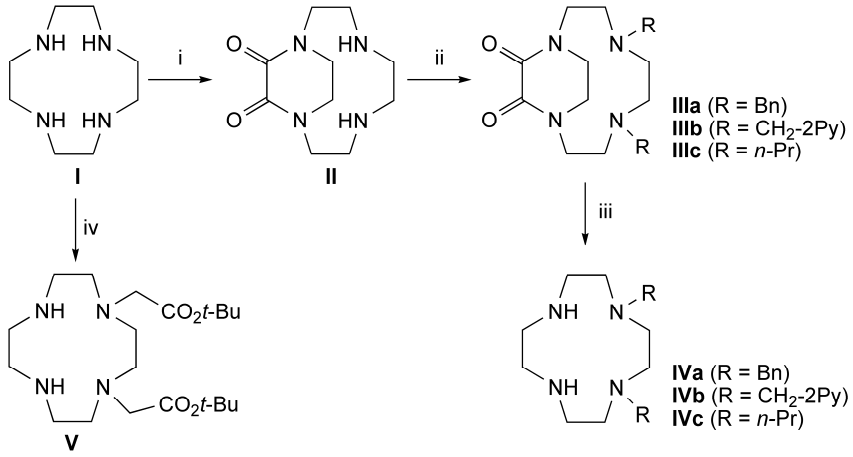


Schéma 1. Reakční podmínky pro přípravu N^1,N^4-disubstituovaných derivátu cyklenu: (*i*) $(COOEt)_2$, EtOH, reflux, 96 %, (*ii*) **IIIa**: BnBr, Na_2CO_3, DMF, 100 °C, 93 %, **IIIb**: 2-chlormethylpyridin, Na_2CO_3, DMF, 100 °C, 94 %, **IIIc**: *n*-PrBr, Na_2CO_3, DMF, 100 °C, 74 %, (*iii*) **IVa**: NaOH, H_2O, 90 °C, 81 %, **IVa**: HCl, H_2O, 90 °C, 81 %, **IVb**: NaOH, H_2O, 90 °C, 79 %, **IVc**: NaOH, H_2O, 90 °C, 71 %, (*iv*) $BrCH_2COOt$-Bu, TEA, $CHCl_3$, 84 %.

VIb, různými alkyl jodidy poskytující N^1,N^7-disubstituované deriváty cyklenu **VIIa–d** (Schéma 2).[67] Příslušné karbonylové komplexy se připravují reakcí cyklenu **I** s $Cr(CO)_6$ nebo $Mo(CO)_6$ v suchém *n*-dibutyl etheru v inertní atmosféře ve výtěžku kolem 90 %. Hlavní nevýhodou tohoto postupu je použití vysoce toxických karbonylů a práce v inertní atmosféře.

Alternativou může být jiný tricyklický meziprodukt. Reakcí cyklenu **I** s trichlormethylsilanem v přítomnosti *N*-ethyl-diisopropylaminu v suchém THF vzniká stabilní hygroskopický komplex **VIII**, který reakcí s *n*BuLi a následně s elektrofilem poskytuje v závislosti na stechiometrii příslušné

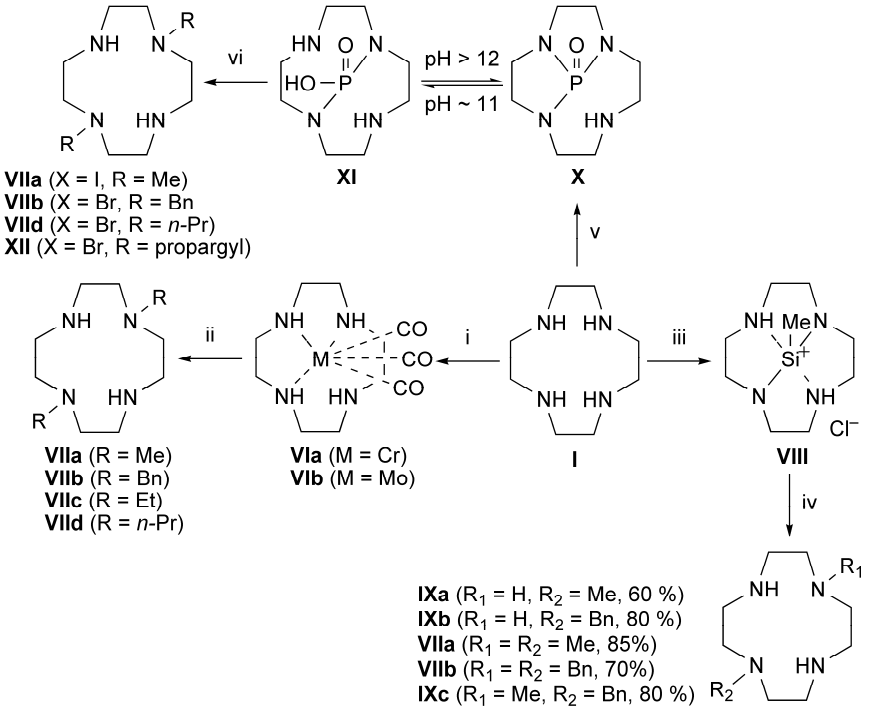


Schéma 2. Příprava N^1,N^7-disubstituovaných derivátů cyklenu přes tricyklické intermediáty: (*i*) $M(CO)_6$, nBu_2O, reflux, 90 %, (*ii*) RI, Na_2CO_3, DMF, RT (55–77 %), (*iii*) $MeSiCl_3$, DIPEA, THF, (*iv*) 1. *n*BuLi, THF, −30 °C; 2. MeI nebo BnBr, 1 nebo 2 ekv., (*v*) 1. $P(NMe_2)_3$, toluen, reflux; 2. CCl_4; 3. NaOH, H_2O, (*vi*) RX, 80–95 %.

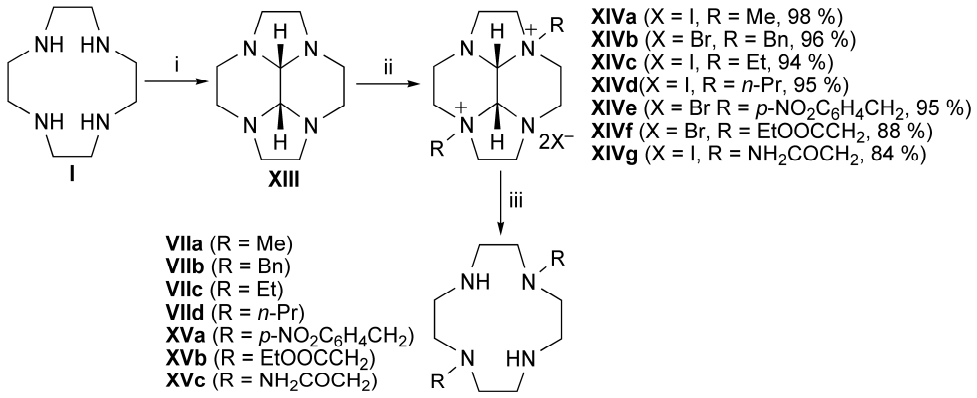


Schéma 3. Příprava N^1,N^7-disubstituovaných derivátů cyklenu přes tetracyklické intermediáty: (*i*) OHC–CHO, MeOH, −5 °C → RT, 100 %, (*ii*) RX, MeCN, RT, (*iii*) NaOH, H_2O, 80–100 %.

N-mono a N^1,N^7-disubstituované deriváty cyklenu **VIIa**,**b** a **IXa**–**c** (Schéma 2).[68] Použijeme-li 1 ekv. *n*BuLi a elektrofilu, připravíme *N*-monoalkylovaný cyklen. Použití 2 ekv. *n*BuLi a elektrofilu vede k N^1,N^7-disubstituovanému cyklenu.

Fosforyl derivát cyklenu **X** vzniká transaminací $P(NMe_2)_3$ cyklenem **I** v toluenu a následnou oxidativní bazickou hydrolýzou. Rovnováha mezi fosfinoxidem **X** a kyselinou diamidofosforečnou **XI** je posunuta doprava při pH ≈ 11. Dva nesubstituované dusíkové atomy mohou být alkylovány do N^1,N^7-polohy alkylhalogenidy ve vodném prostředí (Schéma 2).[69]

Reakcí cyklenu **I** s glyoxalem v MeOH vzniká tetracyklický amin **XIII** (Schéma 3),[70] který v MeCN s 2 ekv. alkylhalogenidu poskytuje příslušnou biskvartérní sůl **XIVa**–**g**.[71] Reakce typicky probíhá při laboratorní teplotě v závislosti na reaktivitě alkylhalogenidů v řádu několika hodin až dnů. Zahřátím reakční směsi nad 60 °C vznikají nežádoucí vedlejší produkty. Hydrolýzou těchto solí vodným roztokem hydroxidu sodného[72] nebo monohydrátem hydrazinu[73] lze připravit příslušné N^1,N^7-disubstituované deriváty cyklenu **VIIa**–**d** a **XVa**–**c**.

Nepřímou cestu k *N*-mono a N^1,N^4-derivátům cyklenu popsali Li a Undheim, kteří připravili reakcí suchého hydrochloridu cyklenu **I** s tetraethyl orthokarbonátem v refluxujícím EtOH příslušnou guanidiniovou sůl **XVI** ve vysokém výtěžku (96 %) (Schéma 4).[74] Bazickou hydrolýzou vzniká tetracyklický intermediát **XVII**, který s alkyl halogenidy v horkém toluenu poskytuje

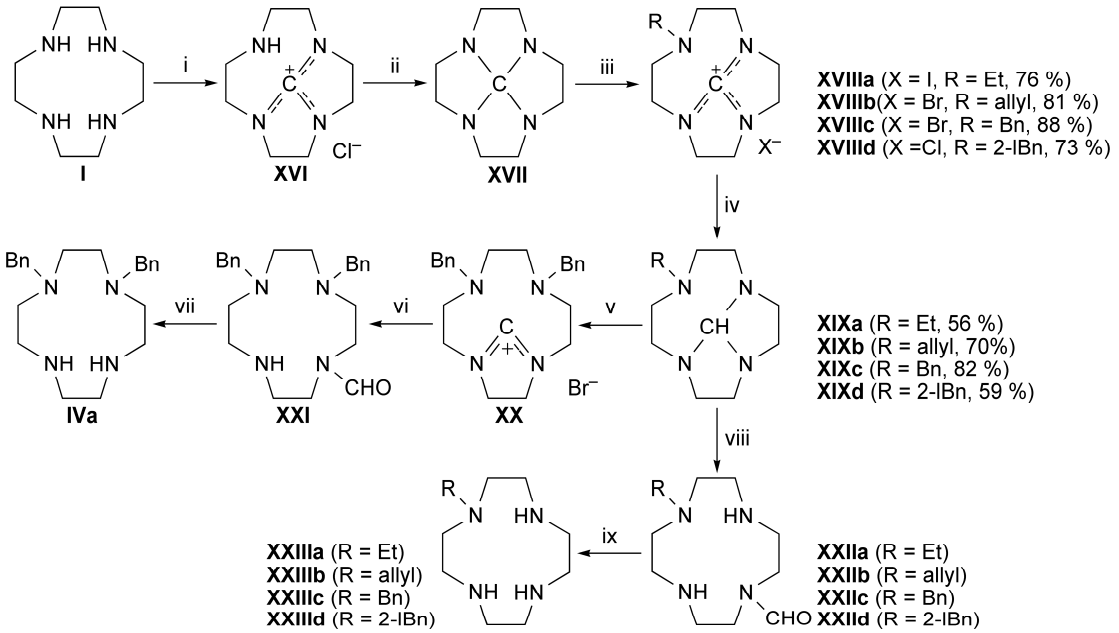


Schéma 4. Reakční podmínky *N*-derivatizace cyklenu přes guanidiniové soli: (*i*) 1. HCl (*g*), EtOH, RT; 2. $C(OEt)_4$, EtOH, reflux, 96 %, (*ii*) NaOH, H_2O, RT, 95 %, (*iii*) RX, toluen, 50 °C nebo reflux, (*iv*) Red-Al, Et_2O nebo toluen, (*v*) R = Bn, BnBr, toluen, reflux, 86 %, (*vi*) NaOH, H_2O, RT, 88 %, (*vii*) aq. HCl, reflux, (*viii*) EtOH, H_2O, RT, 95 %, (*ix*) aq. HCl, reflux, ~ 95 %.

v dobrém výtěžku *N*-monoalkylované guanidiniové soli **XVIIIa–d**. Jejich redukcí vznikají *N*-monoalkylované tricyklické prekurzory **XIXa–d**, které po hydrolýze poskytnou N^7-monoalkylované deriváty *N*-formylcyklenu **XXIIa–d**. Alkylací tricyklického meziproduktu **XIXc** dalším ekvivalentem BnBr v toluenu vzniká sůl **XX**, která podléhá bazické hydrolýze a vzniká N^1-formyl-N^4,N^7-dibenzylcyklen **XXI** v dobrém výtěžku (88 %). Formylovou skupinu z **XXI** a **XXIIa–d** lze odstranit varem v aq. HCl.

Je také popsáno několik přímých cest k N^1,N^7-disubstituovanému cyklenu. Jedna z nich využívá velkého rozdílu pK_a hodnot cyklenu. Cyklen má dvě vysoké (> 9) a dvě nízké (< 2) pK_a hodnoty a v širokém rozsahu kolem neutrálního pH je v roztoku přítomen N^1,N^7-diprotonovaný cyklen. Naprotonovaný sekundární amin není reaktivní vůči elektrofilnímu ataku, a proto pouze nenaprotonovaný *N*-atom může být funkcionalizován. Příkladem může být Mannichova reakce cyklenu **I** s bisulfitem formaldehydu při pH = 7–9, kdy vzniká ve vysokém výtěžku (95 %) N^1,N^7-disulfomethylovaný cyklen **XXIV** (Schéma 5).[75] V malé míře (5 %) vzniká také N^1,N^4-derivát, který lze oddělit krystalizací. Nukleofilní substitucí methylensulfonové skupiny kyanidem a následnou kyselou hydrolýzou lze připravit *trans*-DO2A **XXV** (Schéma 5).

Později Sherry *et al.* publikovali další možnost N^1,N^7-derivatizace cyklenu. Reakcí různých chloroformiátů s cyklenem **I** v kyselém pH (pH = 2–3) byly připraveny N^1,N^7-diacylované deriváty cyklenu **XXVIa–d** ve vysokých výtěžcích (Schéma 5).[76] Tyto bis(karbamáty) mohou být použity jako chránící skupiny při syntéze jiných derivátů cyklenu.

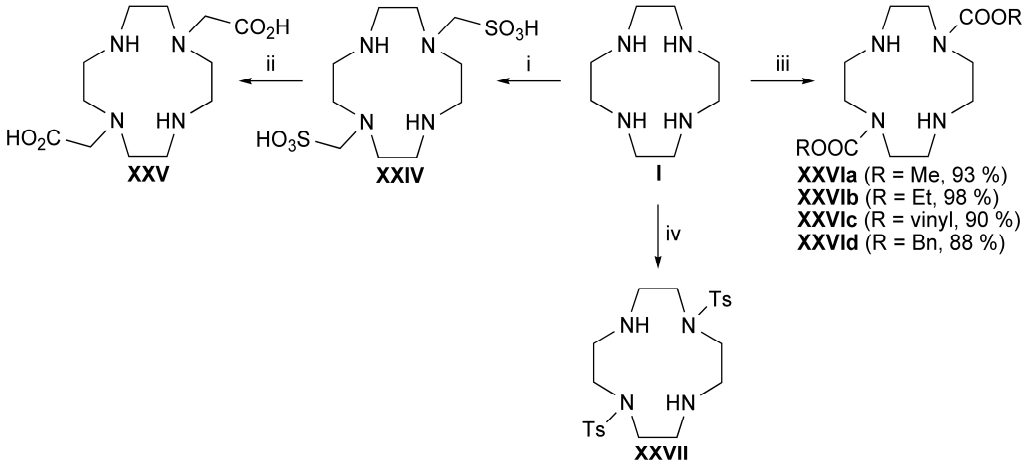


Schéma 5. Přímá syntéza N^1,N^7-disubstituovaných derivátů cyklenu: (*i*) $HOCH_2SO_3Na$, pH ≈ 7, H_2O, 40 °C, 95 %, (*ii*) 1. NaCN, H_2O, RT; 2. HCl, H_2O, reflux, 80 %, (*iii*) ClCOOR, pH ≈ 2–3, (*iv*) TsCl, py, 0 °C → RT, 82 %.

Selektivní ditosylace cyklenu do N^1,N^7-polohy lze dosáhnout reakcí cyklenu **I** s dvěma ekv. tosylchloridu v pyridinu (Schéma 5).[77] N^1,N^7-ditosylcyklen **XXVII** vzniká ve vysokém výtěžku (82 %). Pokud reakce probíhá v chloroformu, vzniká směs různě substituovaných izomerů cyklenu.

Guilard *et al.* publikovali regioselektivní syntézu N^1,N^7-derivátů cyklenu reakcí dvou ekvivalentů různých aromatických aldehydů s cyklenem za podmínek redukční aminace, tj. v přítomnosti nadbytku $NaBH(OAc)_3$ jako redukčního činidla v 1,2-dichlorethanu (Schéma 6).[78] Za těchto podmínek vznikaly preferenčně N^1,N^7-disubstituované deriváty cyklenu **VIIb**, **XVa**, **XXVIIIa–d** v dobrých výtěžcích. Reakcí dialdehydů s cyklenem byly přímou syntézou připraveny kryptandy **XXVIIIc**,**d** v dobrém výtěžku.

Jinou syntetickou strategii přípravy N^1,N^7-disubstituovaného cyklenu představuje cyklizační reakce disodné soli *N*′-methyl-*N*,*N*″-bis(*p*-toluensulfonyl)diethylentriaminu **XXIX** s bis(2-chlorethyl)methylaminem **XXX** (Schéma 7).[79] Makrocyklizace probíhá v DMF a poskytuje N^1,N^7-dimethyl-N^4,N^{10}-ditosylcyklen **XXXI** ve 40% výtěžku. Detosylací v H_2SO_4 lze připravit N^1,N^7-dimethylcyklen **VIIa** s 90% výtěžkem[79], který byl použit jako výchozí látka v syntéze makrobicyklických ligandů s různým můstkujícím motivem (Schéma 7).[80]

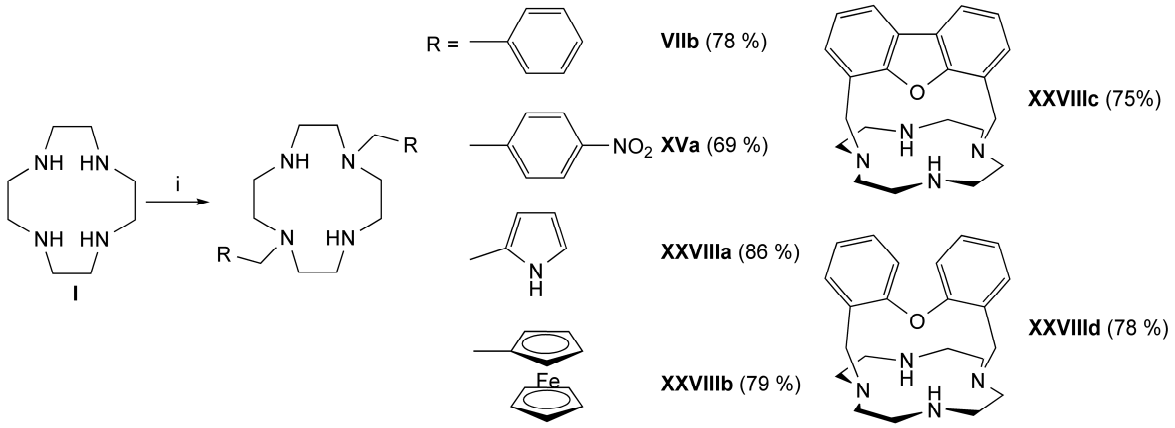


Schéma 6. Reakční podmínky reduktivní aminace: (*i*) $NaBH(OAc)_3$, 1,2-dichlorethan, RT.

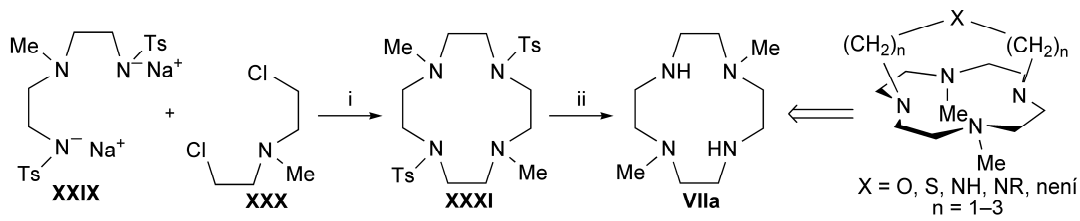
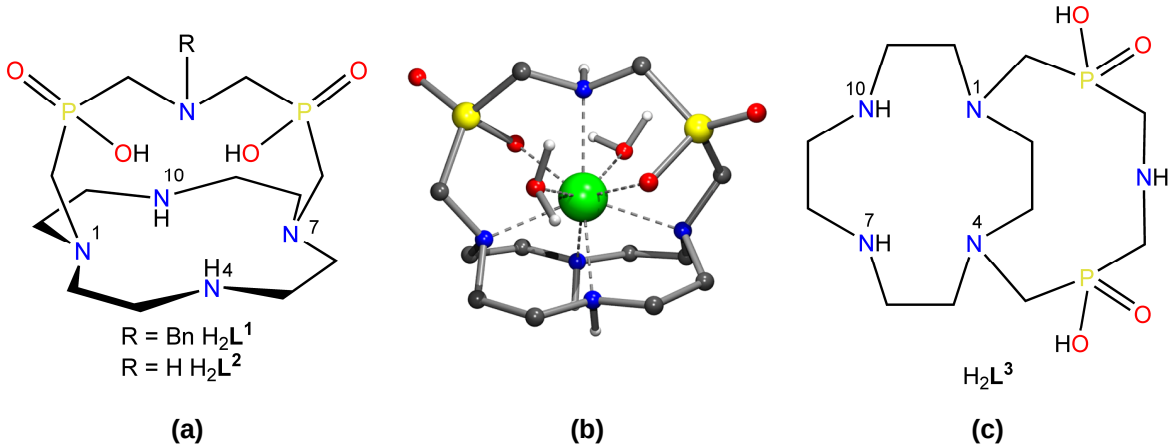


Schéma 7. Reakční podmínky pro cyklizační reakci: (*i*) DMF, 110 °C, 40 %, (*ii*) H_2SO_4, RT, 90 %.

4. Motivace a cíle práce

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu makrobicyklických ligandů a studium jejich acidobazických vlastností. Ligandy byly designovány pro komplexaci iontů Ln^{3+}, především tedy iontu Gd^{3+}, z hlediska jejich potenciální aplikace jako kontrastní látky pro MRI s vysokou relaxivitou. Na začátku tohoto projektu byl navržen makrobicyklický ligand s kryptandovým skeletem odvozeným od makrocyklického ligandu cyklenu přemostěný v N^1,N^7-poloze acyklickým můstkem (Obrázek 4-1 a). Podle modelu komplexu Gd^{3+} vypočítaného molekulovou mechanikou dovoluje navržený ligand koordinaci dvou molekul vody v nesousedních polohách (Obrázek 4-1 b) (důležitost koordinační geometrie byla diskutována dříve v kap. 3.6.1). Atraktivitu tohoto tématu dokládá také skutečnost, že v současné době byla publikována jediná práce týkající se studia trihydratovaných komplexů Gd^{3+} s ligandem typu HOPO, ve kterých jsou molekuly vody koordinovány v nesousedních polohách.[50] Během syntézy N^1,N^7-derivátu se naskytla možnost přípravy N^1,N^4-derivátu, polohového izomeru původně navrženého ligandu (Obrázek 4-1 c). Tímto zjištěním nabrala tato práce další směr a nabízela se možnost srovnávací studie dvou typů ligandů. Díky bicyklickému skeletu lze u N^1,N^7- a N^1,N^4-izomeru očekávat dostatečnou termodynamickou stabilitu a pravděpodobně také dostatečnou kinetickou inertnost komplexů s Ln^{3+}. Přítomnost oxofosforové skupiny v acyklickém můstku je navržena z důvodu zvýšení hydratace komplexu, tedy nárůstu příspěvku druhé koordinační sféry k celkové protonové relaxivitě, kompenzace kladného náboje a také oxofilicity iontů Ln^{3+}.



(a) **(b)** **(c)**

Obrázek 4-1. (a) N^1,N^7-izomery navržených kryptandových ligandů. (b) Model struktury komplexu iontu Ln^{3+} s ligandem $H_2\mathbf{L^1}$ navržený molekulovou mechanikou v programu HyperChem. (c) Navržený a studovaný N^1,N^4-izomer.

5. Experimentální část

Všechny komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla byly od dodavatelů Acros Organics, Fisher Scientific, Fluka, CheMatech, Lachema, Merck, Penta a Sigma-Aldrich. Chemikálie nebyly dále čištěny a některá rozpouštědla byla sušena standardními postupy: varem s P_4O_{10} a vakuovou destilací (DMF), varem s P_4O_{10} a destilací (MeCN, CH_2Cl_2). Pro měření NMR spekter byla použita deuterovaná rozpouštědla – D_2O (99,8 % D, Armar Chemicals), $CDCl_3$ (99,8 % D, Sigma-Aldrich), MeOH-*d*4 (99,8 % D, Armar Chemicals) a CD_3CN (99,5 % D, Chemotrade). Sloupcová a flash chromatografie byla prováděna na silikagelu 60 (0,063–0,100 mm) (Merck).

5.1. NMR spektroskopie

Měření 1D NMR spekter (^{1}H, ^{13}C a ^{31}P) a 2D NMR spekter (^{1}H-^{1}H COSY, HSQC, HMBC, NOESY, ^{31}P-^{31}P EXSY) bylo prováděno na spektrometru VNMRS300, spektrometru Varian^{UNITY} *INOVA* 400 a spektrometru Bruker Avance (III) 600. Pokud není uvedeno jinak, měření probíhalo při teplotě 25 °C. Všechny uváděné hodnoty chemických posunů δ jsou v jednotkách ppm a jsou zaokrouhlovány na dvě desetinná místa pro spektra ^{1}H a jedno desetinné místo pro spektra ^{13}C a ^{31}P. Interakční konstanty J jsou v jednotkách Hz, zaokrouhleny na jedno desetinné místo, v případě $^1J_{PH}$ a $^1J_{CP}$ jen na jednotky. Multiplicita signálů byla popsána následujícími zkratkami: s (singlet), d (dublet), t (triplet), m (multiplet), br (široký). Chemické posuny signálů byly referencovány na interní standardy *t*-BuOH (δ_H = 1,25 ppm; δ_C = 30,29 ppm a 70,36 ppm) a TMS (δ_H = 0,00 ppm; δ_C = 0,00 ppm), nebo na píky rozpouštědla $CHCl_3$ (δ_H = 7,26 ppm), $CDCl_3$ (δ_C = 77,16 ppm), HDO (δ_H = 4,79 ppm), CD_2HCN (δ_H = 1,94 ppm), CD_3CN (δ_C = 1,32 ppm), CD_2HOD (δ_H = 3,31 ppm) a CD_3OD (δ_C = 49,00 ppm). Pro referenci ^{31}P NMR byl použit externí standard 85% roztok H_3PO_4 v D_2O (δ_P = 0,00 ppm).

5.2. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla naměřena na hmotnostním spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 ES-iontrap s ionizací elektrosprejem (ESI) v pozitivním i negativním módu. Vzorky byly rozpuštěny buď v MeOH nebo v H_2O, naředěny MeOH nebo MeCN a injektovány 25μL mikrostříkačkou Hamilton rychlostí 250 μL min^{-1}. Uvedeny jsou jen signály, které se podařilo interpretovat.

5.3. Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na dvou typech TLC destiček: Silufol® (Kavalier) s širokoporézním silikagelem naneseným na hliníkové fólii a TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254} (Merck). Příslušné mobilní fáze a metody detekce jsou uvedeny vždy u jednotlivých látek. Hodnoty R_f jsou uváděny na dvě desetinná místa.

Detekční činidla:

2% aq. roztok $KMnO_4$ – 2,00 g $KMnO_4$ a 4,00 g $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody. Detekce probíhala ponořením TLC destičky do detekčního činidla a omytím pod tekoucí horkou vodou.

0,5% roztok ninhydrinu v EtOH – Detekce probíhala sprejováním TLC destičky a ohřevem nad horkovzdušnou pistolí.

5% aq. roztok $CuSO_4 \cdot H_2O$ – Detekce probíhala ponořením TLC destičky do detekčního činidla.

5.4. Rentgenostrukturní analýza

Struktury monokrystalů byly naměřeny na čtyřkruhovém difraktometru NONIUS KAPPA CCD při 150(1) K se zdrojem záření Mo-*K*α (λ = 0,71073 Å). Difrakční data byla analyzována programovým balíkem HKL.[81] Řešení struktur bylo provedeno přímými metodami pomocí programu SIR92[82], vypřesňování struktur metodou nejmenších čtverců na F^2 v programu SHELXL97[83] a vizualizace struktur v programu PLATON.[84]

5.5. Analytická HPLC a semipreparativní HPLC

Analytický HPLC systém se skládal z gradientní pumpy Beta 10 (ECOM), opatřené aktivním směšovačem Knauer A0285, a duálního UV detektoru (ECOM). Analýzy byly prováděny na koloně Luna RP8, 5 μm, 150×4,6 mm (Phenomenex). Před kolonou byl zařazen in-line filtr 0,5 μm, a patronový systém ochrany s patronou C8 (Phenomenex). Mobilní fáze byla kontinuálně vakuově odplyňována degaserem DG 3014 (ECOM) a míchána v gradientní pumpě ze tří zásobních roztoků: (A) H_2O, (B) 0,1% TFA v H_2O (*v*/*v*), (C) MeCN. Vlnové délky detektoru byly 210 a 254 nm. Injektovaný objem vzorku byl 20 μL o koncentraci ~1 mg mL^{-1}. Průtok mobilní fáze byl 1 mL min^{-1}. Data byla sbírána a zpracována programem Clarity (DataApex).

HPLC metoda 1: 0 min 20 % C, 0–15 min 60 % C, 15–20 min 60 % C, 20–20:30 min 20 % C, 20:30–30 min 20 % C, B = konst. = 20 %.

HPLC metoda 2: 0 min 5 % C, 0–20 min 55 % C, 20–25 min 55 % C, 25–25:30 min 5 % C, 25:30–35 min 5 % C, B = konst. = 20 %.

Semipreparativní HPLC systém se skládal z gradientní pumpy LCD 50K (ECOM) a UV–Vis detektoru LCD 2083 (ECOM). Separace probíhaly na semipreparativní koloně Luna RP8, 10 μm, 250×21,20 mm (Phenomenex). Před kolonou byl zařazen patronový systém ochrany s patronou C8 (Phenomenex). Mobilní fáze byly smíchány zvlášť a odplyněny pomocí ultrazvukové sondy (Cole-Parmer 750-Watt Ultrasonic Homogenizer). Detekce probíhala při vlnové délce 210 nm. Injektovaný objem byl 1 mL. Průtok mobilní fáze byl 15 mL min^{-1}. Separovaná směs byla vždy po naředění mobilní fází přefiltrována přes 0,2μm mikrofiltr (Whatman). Data byla sbírána a zpracována programem Clarity (DataApex).

HPLC metoda 3: Zásobní roztok A: 20 % MeCN, 20 % 0,1% TFA v H_2O (*v*/*v*), 60 % H_2O, roztok B: 32 % MeCN, 20 % 0,1% TFA v H_2O (*v*/*v*), 48 % H_2O, roztok C: 60 % MeCN, 20 % 0,1% TFA v H_2O (*v*/*v*), 20 % H_2O.0 min 100 % A, 0–12 min 100 % B, 12–14 min 100 % C, 14–26 min 100 % C, 26–27 min 100 % A, 27–45 min 100 % A.

5.6. Elementární analýza

Elementární analýza byla provedena na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze na automatickém analyzátoru Perkin Elmer 2400. Hmotnostní procenta jsou uváděna na dvě desetinná místa.

5.7. pH ^{31}P NMR titrace

Vzorek ligandu na o koncentraci 30 mM byl připraven rozpuštěním příslušného množství ligandu v deionizované vodě a pH bylo upraveno 5% aq. NaOH do bazické oblasti (pH ≈ 13). Vzorek byl titrován 5% aq. HCl do kyselé oblasti (pH ≈ 2). Po každém přídavku bylo změřeno pH na zkalibrované kombinované skleněné elektrodě (Mettler Toledo) s pH metrem (3505 pH Meter, JENWAY). ^{31}P NMR spektra byla měřena s externím standardem 85% roztokem H_3PO_4 v D_2O (δ_P = 0,00 ppm) při teplotě 25 °C bez kontroly iontové síly. Titrační data byla zpracována programovým balíkem OPIUM®,[85] používajícím zobecněné metody nejmenších čtverců.

5.8. Syntetická část

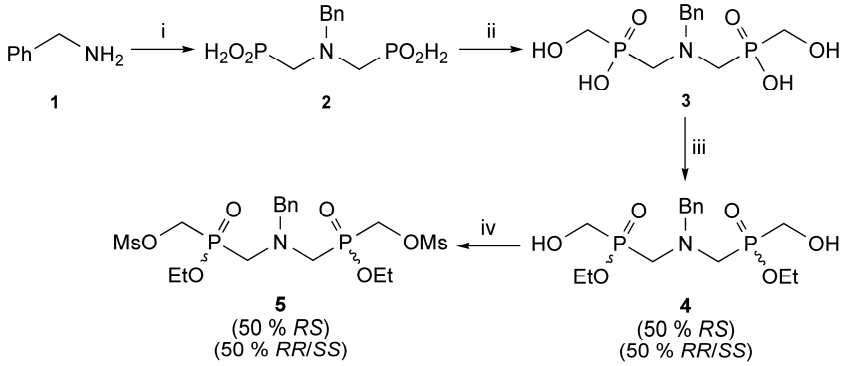


Schéma 8. Reakční podmínky syntézy prekurzoru **5**: (*i*) aq. CH_2O, H_3PO_2, RT, 12 h, (*ii*) aq. CH_2O, aq. HCl (1:1), 70 °C, 12 h, (*iii*) EtOH (suchý), DCC, DMAP, RT, 10 h, (*iv*) MsCl, DIPEA, CH_2Cl_2, −5 °C → RT, 12 h.

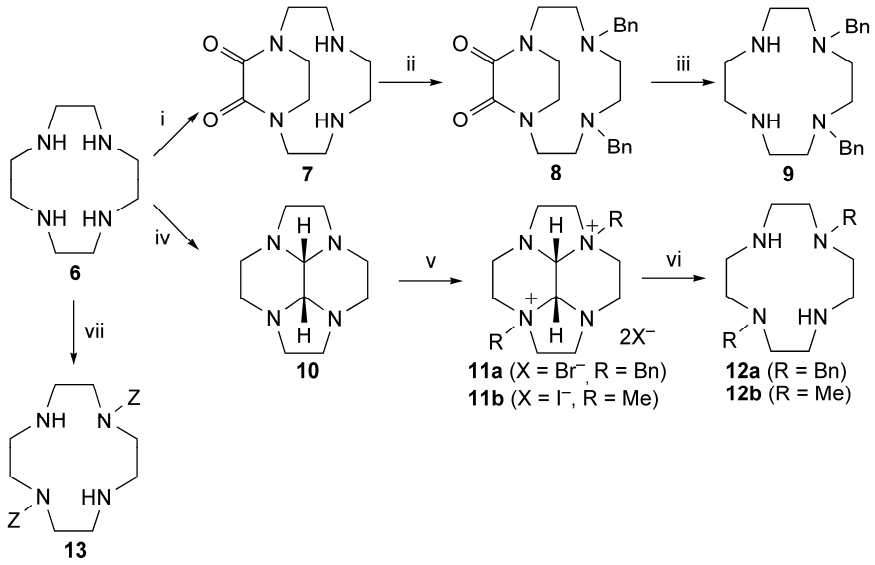


Schéma 9. Reakční podmínky syntézy prekurzorů – N^1,N^4- a N^1,N^7-chráněného cyklenu: (*i*) $(COOEt)_2$, EtOH (suchý), RT, 3 d, (*ii*) BnBr, K_2CO_3, DMF, 100 °C, 3 h, (*iii*) NaOH, EtOH–H_2O, 90 °C, 24 h, (*iv*) $(OHC–CHO)_3 \cdot 2H_2O$, MeOH, −5 °C → RT, 3 h, (*v*) **11a**: BnBr, MeCN (suchý), RT, 4 d, **11b**: MeI, MeCN (suchý), RT, 12 h, (*vi*) aq. NaOH, RT, 6 h, (*vii*) Z-Cl, K_2CO_3, $CHCl_3$, RT, 12 h; (Z = benzyloxykarbonyl).

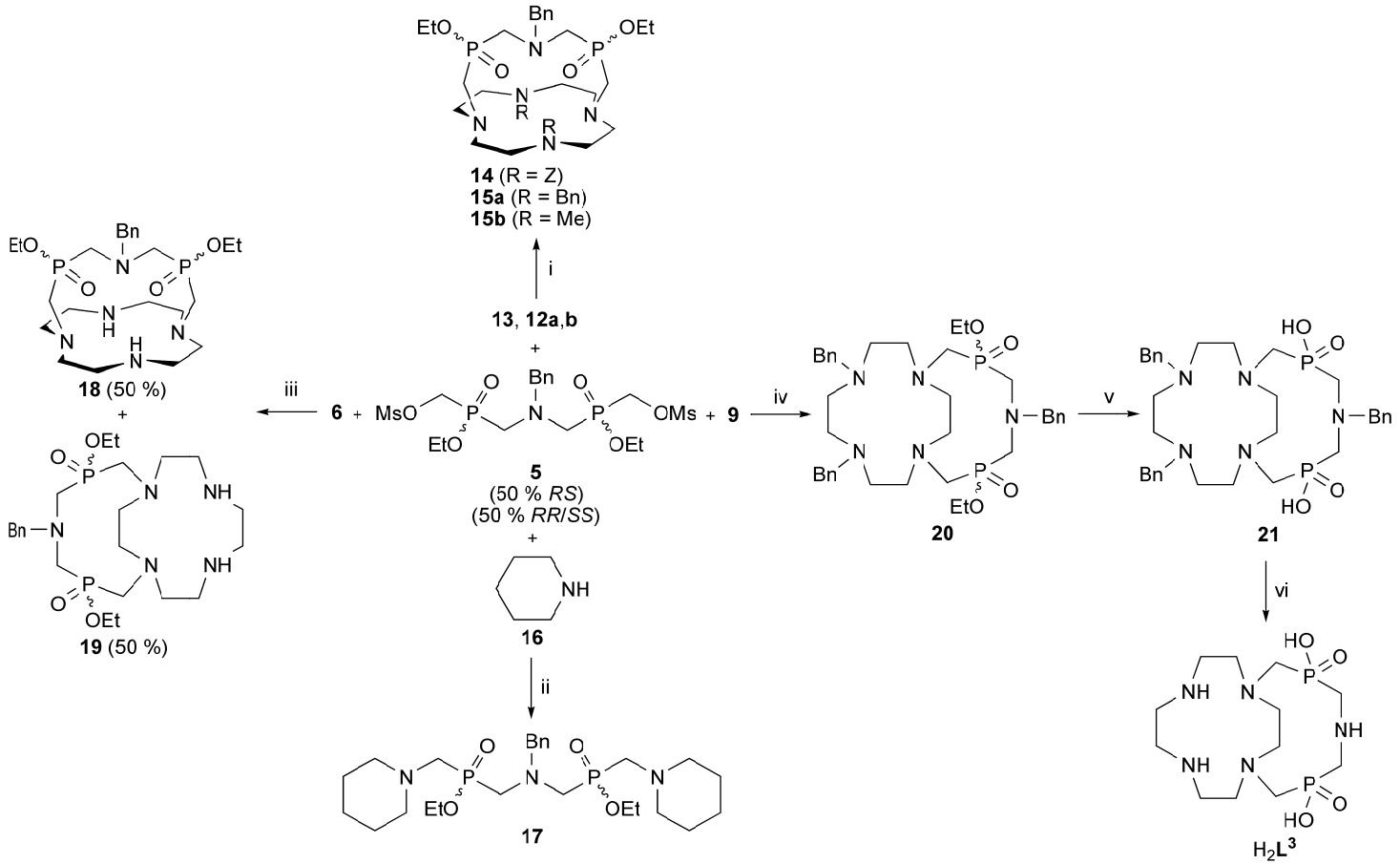
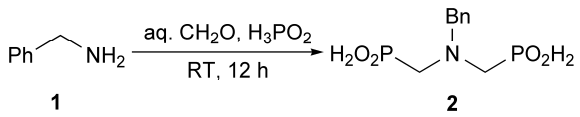


Schéma 10. Reakční podmínky: (*i*) **14**: viz Tabulka 5-1 str. 58, **15a**: K_2CO_3, MeCN (suchý), 60 °C, 3 d, **15b**: K_2CO_3, MeCN (suchý), 60 °C, 48 h, (*ii*) K_2CO_3, MeCN (suchý), 40 °C, 12 h, (*iii*) K_2CO_3, MeCN (suchý), 50 °C, 2 d, (*iv*) K_2CO_3, MeCN (suchý), 60 °C, 3 d, (*v*) TMSB, MeCN, RT, tma, 12 h, (*vi*) HCO_2NH_4, Pd/C, MeOH, reflux.

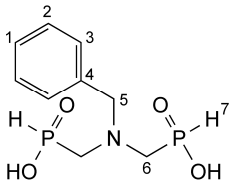
5.8.1. Benzylamin-bis(methylenfosfinová kyselina) (2)



1 **2**

Reakce byla provedena podle modifikovaného postupu publikovaného v lit.[86] Do 250mL baňky bylo naváženo 36,96 g (0,28 mol, 2 ekv.) 50% aq. roztoku H_3PO_2 a 24,02 g (0,28 mol, 2 ekv.) 36% aq. roztoku CH_2O. Tato směs byla ochlazena v lázni voda–led a k míchané směsi bylo přikapávačkou během 1 h přidáno 15,00 g (0,14 mol) **1**. Reakční směs se během přidávání benzylaminu zahřívala. Baňka byla uzavřena plastovou zátkou, zajištěna shora klemou a reakční směs byla míchána 12 h při laboratorní teplotě. Tvorba produktu byla sledována pomocí ^{31}P NMR. Reakční směs byla odpařena na rotační vakuové odparce na hustý čirý olej. (*Upozornění*: teplota lázně nesmí překročit 50 °C z důvodů možné oxidace P–H vazby.) Tento olej byl rozpuštěn ve 100 mL MeOH. Přes noc se z roztoku vyloučila jemná bílá sraženina produktu **2**, která byla odsáta na fritě S2. Surový produkt byl suspendován v 50 mL MeOH a tato suspenze byla míchána 2 h. Následně byla bílá sraženina odsáta na fritě S2 a promyta malým množstvím MeOH. Produkt **2** byl dosušen ve vakuovém exsikátoru nad P_4O_{10}. Bylo připraveno 17,58 g, tj. 45 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:



TLC: EtOH–aq. NH_3 8:2, R_f = 0,40, roztok $KMnO_4$, zhášení fluorescence (254 nm).

^{1}H NMR (299,941 MHz, D_2O): δ 3,46 (d, $^2J_{PH}$ = 10,5 Hz, 4H, 6), 4,69 (s, 2H, 5), 7,17 (d, $^1J_{PH}$ = 555 Hz, 2H, 7), 7,56 (m, 5H, 1, 2, 3).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, D_2O): δ55,1 (dd, $^1J_{CP}$ = 79,7 Hz, $^3J_{CP}$ = 3,6 Hz, 2C, 6), 62,9 (s, 1C, 5), 130,1 (s, 1C, arom.), 131,1 (s, 2C, arom.), 132,2 (s, 1C, arom.), 133,2 (s, 2C, arom.).

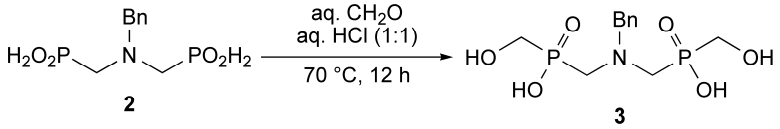
^{31}P{^{1}H} (121,422 MHz, D_2O): δ10,7 (s).

^{31}P (121,422 MHz, D_2O): δ10,3 (td, $^1J_{PH}$ = 555 Hz, $^2J_{PH}$ = 10,5 Hz).

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

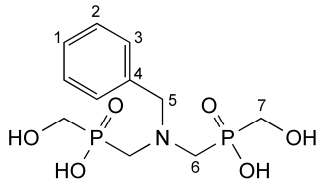
Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro $C_9H_{15}NO_4P_2 \cdot 0{,}75H_2O$, M_r = 276,68) C: 39,04 (39,07), H: 5,74 (6,01), N: 5,02 (5,06), P: 22,50 (22,39).

5.8.2. Benzylamin-bis[methylen(hydroxymethylfosfinová kyselina)] (3)



V 250mL baňce bylo ve 120 mL 1:1 aq. HCl rozpuštěno 17,55 g (63 mmol) **2** a k roztoku bylo přidáno 34,49 g (0,4 mol, 6 ekv.) 36% aq. roztoku CH_2O. Baňka byla uzavřena plastovou zátkou, zajištěna klemou a reakční směs byla míchána 12 h při teplotě 70 °C. Konverze byla sledována pomocí ^{31}P NMR. Následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce na hustý čirý olej. Ten byl rozpuštěn v deionizované vodě a roztok byl znovu odpařen. Odpařování s vodou bylo provedeno celkem 5-krát. Hustý čirý olej produktu **3** byl zbaven zbytků vody připojením na olejovou vývěvu po dobu 12 h. Stáním tento olej ztuhl na bílou krystalickou látku. Bylo připraveno 21,90 g, tj. 100 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:



TLC: EtOH–aq. NH_3 8:2, R_f = 0,30, roztok $KMnO_4$, zhášení fluorescence (254 nm).

^{1}H NMR (299,941 MHz, D_2O): δ 3,46 (d, $^2J_{PH}$ = 8,4 Hz, 4H, 6), 3,59 (d, $^2J_{PH}$ = 6,6 Hz, 4H, 7), 4,59 (s, 2H, 5), 7,41 (m, 5H, 1, 2, 3).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, D_2O): δ 65,6 (dd, $^1J_{CP}$ = 82,0 Hz, $^3J_{CP}$ = 3,3 Hz, 2C, 6), 73,9 (d, $^1J_{CP}$ = 118 Hz, 2C, 7), 75,2 (s, 1C, 5), 142,4 (s, 1C, arom.), 142,9 (s, 2C, arom.), 143,9 (s, 1C, arom.), 144,7 (s, 2C, arom.).

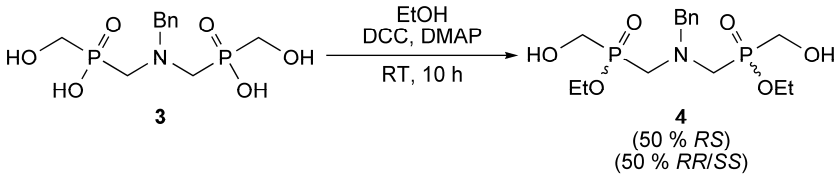
^{31}P{^{1}H} (121,422 MHz, D_2O): δ 27,2 (s).

^{31}P (121,422 MHz, D_2O): δ 27,3 (s).

MS (ESI): (–) 321,6 $(M–H)^-$, vypočteno 322,0.

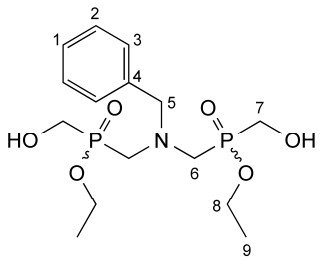
Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro $C_9H_{19}NO_6P_2$·0,6HCl, M_r = 345,10) C: 38,96 (38,28), H: 5,89 (5,72), N: 3,75 (4,06), P: 17,65 (17,95), Cl: 6,13 (6,16).

5.8.3. Diethyl benzylamin-bis[methylen(hydroxymethylfosfinát)] (4)



Navážka 9,49 g (27 mmol) **3** byla 3-krát odpařena ze suchého EtOH. Následně byla rozpuštěna za horka v 250 mL suchého EtOH. Po zchladnutí na laboratorní teplotu bylo přidáno 22,28 g (108 mol, 4 ekv.) DCC a 0,33 g (2,7 mmol, 0,1 ekv.) DMAP. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 10 h. Během reakce se vylučovala DCU. Průběh reakce byl sledován pomocí $^{31}P\{^{1}H\}$ NMR. Reakce byla ukončena přídavkem 100 mL vody a poté byla reakční směs míchána 2 h při RT. Vyloučená DCU byla odsáta na fritě S4 a promyta malým množstvím EtOH. Filtrát byl odpařen na vakuové odparce, odparek rozpuštěn ve směsi EtOH–H_2O 75:25 a zahuštěn na vakuové odparce. Vyloučená DCU byla opět odsáta. Tato procedura byla provedena 5-krát. Poté byl odparek znovu rozpuštěn ve směsi EtOH–H_2O 75:25 a stáním v lednici se vyloučila další DCU, která byla opět odsáta. Nažloutlý olej byl rozpuštěn v 200 mL CH_2Cl_2 a vysušen bezv. $MgSO_4$. Stáním v lednici se opět vyloučila DCU, která byla odfiltrována i se sušidlem na fritě S4. Filtrát byl odpařen na vakuové odparce a nažloutlý olej surového produktu **4** byl přečištěn sloupcovou chromatografií na SiO_2 (350 g SiO_2, CH_2Cl_2–MeOH 93:7, R_f (**4**) = 0,35). Celkem bylo připraveno 8,43 g produktu **4** (80% čistota podle ^{1}H NMR, nečistota je DCU), tj. 82 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:



TLC: CH_2Cl_2–MeOH 93:7, R_f = 0,35, roztok $KMnO_4$, zhášení fluorescence (254 nm).

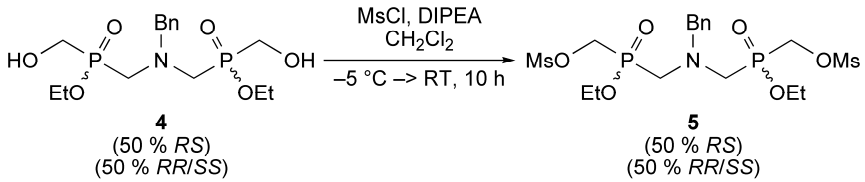
^{1}H NMR (399,951 MHz, $CDCl_3$): δ 1,15 (m, $^{3}J_{HH}$ = 7,4 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 7,1 Hz, 6H, 9 a 9′), 2,64 (dd, $^{2}J_{HH}$ = 16,0 Hz, $^{2}J_{PH}$ = 9,5 Hz, 1H, 6a), 2,88 (dd, $^{2}J_{HH}$ = 16,0 Hz, $^{2}J_{PH}$ = 11,7 Hz, 1H, 6a′), 3,09 (dd, $^{2}J_{HH}$ = 16,0 Hz, $^{2}J_{PH}$ = 4,4 Hz, 1H, 6b′), 3,24 (dd, $^{2}J_{HH}$ = 16,0 Hz, $^{2}J_{PH}$ = 13,2 Hz, 1H, 6b), 3,45 (d, $^{2}J_{HH}$ = 12,9 Hz, 0,5H, 5a), 3,75 (m, 2H, 7a a 7a′), 3,94 (m, 7H, 5a′, 5b′, 7b, 7b′, 8, 8′), 4,27 (d, $^{2}J_{HH}$ = 12,9 Hz, 0,5H, 5b), 7,29 (m, 5H, 1, 1′, 2, 2′, 3, 3′).

$^{13}C\{^1H\}$ (75,428 MHz, $CDCl_3$): δ16,7 (s, 1C, 9), 16,8 (s, 1C, 9′), 49,5 (dd, $^1J_{CP}$ = 115 Hz, $^3J_{CP}$ = 8,9 Hz, 1C, 6), 50,5 (dd, $^1J_{CP}$ = 109 Hz, $^3J_{CP}$ = 8,8 Hz, 1C, 6′), 55,9 (d, $^1J_{CP}$ = 105 Hz, 1C, 7), 57,2 (d, $^1J_{CP}$ = 106 Hz, 1C, 7′), 61,5 (m, $^2J_{CP}$ = 4,4 Hz, $^2J_{CP}$ = 3,8 Hz, 2C, 8 a 8′), 62,1 (m, $^3J_{CP}$ = 7,2 Hz, $^3J_{CP}$ = 6,6 Hz, 1C, 5 a 5′), 128,0–128,2 (m, 1C, 1 a 1′), 128,6–128,8 (m, 2C, 2 a 2′), 129,9–130,2 (m, 2C, 3 a 3′), 137,4–137,9 (m, 1C, 4 a 4′).

$^{31}P\{^1H\}$ (121,422 MHz, $CDCl_3$): δ48,4 (s, 1P), 49,2 (s, 1P).

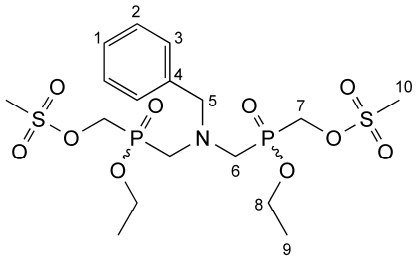
MS (ESI): (+) 401,9 $(M+Na)^+$, vypočteno 402,1.

5.8.4. Diethyl benzylamin-bis{methylen[*O*,*O*′-bis(methansulfonyl)hydroxymethylfosfinát]} (5)



Ve 100mL baňce bylo v 50 mL suchého CH_2Cl_2 rozpuštěno 3,60 g (9,5 mmol) **4**, přidáno 3,08 g (23,8 mmol, 2,5 ekv.) *N*-ethyl-diisopropylaminu (DIPEA) a reakční směs byla ochlazena v lázni voda–led na −5 °C. Přes septum opatřené jehlou se sušící rourkou byl do míchané reakční směsi během 1 h přidán injekční stříkačkou roztok 2,51 g (21,9 mmol, 2,3 ekv.) MsCl v 10 mL suchého CH_2Cl_2. Poté byla reakční směs pomalu ohřáta na laboratorní teplotu a míchána 10 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (CH_2Cl_2–MeOH 93:7, R_f (**5**) = 0,75). Reakční směs byla naředěna 50 mL CH_2Cl_2 a promyta nasyc. roztokem NaCl (3× 150 mL). Organická fáze byla vysušena bezv. $MgSO_4$ a po odfiltrování sušidla odpařena na vakuové odparce na světle hnědý olej produktu **5**, který byl zbaven zbytků rozpouštědel na olejové pumpě. Bylo získáno 4,50 g (80% čistota podle ^1H NMR, nečistota je DCU), tj. 88 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:



TLC: CH_2Cl_2–MeOH 93:7, R_f = 0,75, roztok $KMnO_4$, zhášení fluorescence (254 nm).

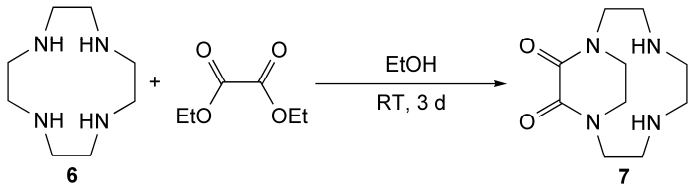
^{1}H NMR (399,951 MHz, $CDCl_3$): δ 1,29 (m, 6H, 9 a 9′), 2,79 (dd, $^{2}J_{HH}$ = 15,9 Hz, $^{2}J_{PH}$ = 9,7 Hz, 1H, 6a), 2,98 (s, 3H, 10), 2,99 (s, 3H, 10′), 3,08–3,21 (m, $^{2}J_{HH}$ = 15,9 Hz, $^{2}J_{PH}$ = 10,7 Hz, $^{2}J_{PH}$ = 7,8 Hz, 2H, 6a′ a 6b′), 3,33–3,40 (m, $^{2}J_{HH}$ = 15,9 Hz, $^{2}J_{PH}$ = 13,4 Hz, 1H, 6b), 3,48 (d, $^{2}J_{HH}$ = 12,9 Hz, 0,5H, 5a), 3,90 (s, 1H, 5′), 4,01–4,21 (m, 4H, 8 a 8′), 4,34–4,49 (m, 4,5H, 7 a 7′ a 5b), 7,22–7,30 (m, 5H, 1, 1′, 2, 2′, 3, 3′).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, $CDCl_3$): δ 16,7 (br s, 2C, 9 a 9′), 37,7 (s, 2C, 10 a 10′), 50,0–51,9 (m, 2C, 6 a 6′), 60,3 (d, $^{1}J_{CP}$ = 100 Hz, 1C, 7), 61,1 (d, $^{1}J_{CP}$ = 102 Hz, 1C, 7′), 62,0–62,4 (m, 3C, 5, 5′, 8 a 8′), 127,9–128,1 (m, 1C, 1 a 1′), 128,7–128,8 (m, 2C, 2 a 2′), 129,7–129,9 (m, 2C, 3 a 3′), 136,8–136,9 (m, 1C, 4 a 4′).

^{31}P{^{1}H} (121,422 MHz, $CDCl_3$): δ 40,0 (s, 1P), 40,1 (s, 1P).

MS (ESI): (+) 439,9 $(M–MsO^{\bullet})^{+}$, vypočteno 440,1; (+) 558,0 $(M+Na)^{+}$, vypočteno 558,2; (+) 574,0 $(M+K)^{+}$, vypočteno 574,3.

5.8.5. 1,4,7,10-Tetraazabicyklo[8.2.2]tetradekan-11,12-dion (7)



Syntéza byla provedena podle publikovaného postupu.[87] V 250mL baňce bylo ve 100 mL suchého EtOH rozpuštěno 4,00 g (23 mmol) **6** a poté přidáno 3,40 g (23 mmol) diethyl oxalátu. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 3 d. Konverze byla sledována pomocí TLC ($CHCl_3$–*i*$PrNH_2$ 5:1, R_f (**7**) = 0,40). Po odpaření reakční směsi na vakuové odparce byl nažloutlý olej přečištěn flash chromatografií na SiO_2 (160 g SiO_2, $CHCl_3$–*i*$PrNH_2$ 5:1, R_f (**7**) = 0,40). Produkt **7** byl zbaven zbytků *i*-propylaminu několikanásobným odpařením se suchým EtOH. Bylo získáno 5,25 g produktu **7** ve formě bílého prášku, tj. 98 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

Charakterizace odpovídá dříve publikovaným datům.[65a]

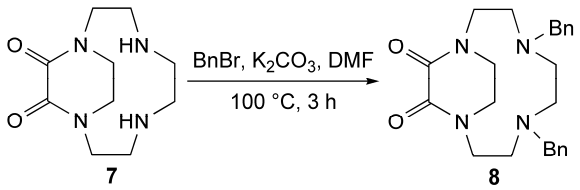
TLC: $CHCl_3$–*i*$PrNH_2$ 5:1, R_f = 0,40, roztok $KMnO_4$, ninhydrin.

^{1}H NMR (299,941 MHz, $CDCl_3$): δ 2,45–2,66 (m, 6H, CH_2NH), 2,82–2,97 (m, 4H, CH_2NH a CH_2NCO), 3,46 (m, 4H, CH_2NCO), 4,28–4,38 (m, 2H, CH_2NCO).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, $CDCl_3$): δ 44,3 (s, 2C, CH_2NCO), 46,2 (s, 2C, CH_2NH), 49,1 (s, 2C, CH_2NH), 49,2 (s, 2C, CH_2NCO), 161,3 (s, 2C, CH_2NCO).

MS (ESI): (+) 226,8 $(M+H)^+$, vypočteno 227,2; (+) 453,1 $(2M+H)^+$, vypočteno 453,3.

5.8.6. 4,7-Dibenzyl-1,4,7,10-tetraazabicyklo[8.2.2]tetradekan-11,12-dion (8)



7 **8**

Syntéza byla provedena podle publikovaného postupu.[87] V 250mL baňce bylo ve 100 mL suchého DMF rozpuštěno 4,69 g (20,7 mmol) **7** a přidáno 6,29 g (45,5 mmol, 2,2 ekv.) vyžíhaného K_2CO_3. Reakční směs byla pod zpětným chladičem se sušící rourkou zahřáta na 100 °C a v jedné dávce bylo přidáno 7,79 g (45,5 mmol, 2,2 ekv.) BnBr. Po 3 h míchání při této teplotě byla reakční směs odpařena na vakuové odparce, odparek byl rozpuštěn v CH_2Cl_2 a pevná fáze byla odsáta na fritě S4. Po odpaření filtrátu na vakuové odparce byl nažloutlý prášek produktu **8** rekrystalován z 30 mL horkého toluenu. Stáním přes noc se vyloučily bílé krystalky produktu **8**, které byly odsáty na fritě S2 a dosušeny *in vacuo*. V první frakci bylo získáno 4,24 g, tj. 50 % teoretického výtěžku. Po zahuštění matečného roztoku bylo získáno 2,38 g druhé frakce, tj. 28 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

Charakterizace odpovídá dříve publikovaným datům.[65a]

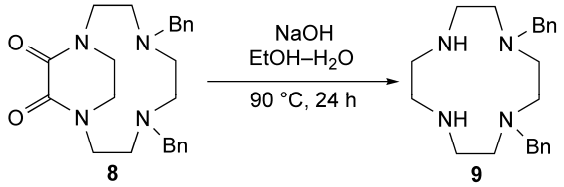
TLC: $CHCl_3$–*i*$PrNH_2$ 15:1, R_f = 0,60, roztok $KMnO_4$, zhášení fluorescence (254 nm).

^{1}H NMR (299,941 MHz, $CDCl_3$): δ 2,30 (m, 2H, C$\underline{H}_2$NH), 2,41–2,63 (m, 6H, C$\underline{H}_2$NH), 2,89 (m, 4H, CH_2NCO), 3,34–3,52 (m, 6H, CH_2NCO a NC$\underline{H}_2$Ph), 4,11–4,15 (m, 4H, CH_2NCO), 7,12 (m, 4H, arom.), 7,30 (m, 6H, arom.).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, $CDCl_3$): δ 47,3 (s, 2C, CH_2N), 49,8 (s, 2C, CH_2N), 52,6 (s, 2C, CH_2N), 55,7 (s, 2C, CH_2N), 58,9 (s, 2C, N$\underline{C}H_2$Ph), 127,4 (s, 2C, arom.), 128,4 (s, 4C, arom.), 129,9 (s, 4C, arom.), 138,5 (s, 2C, arom.), 159,9 (s, 2C, CH_2N$\underline{C}$O).

MS (ESI): (+) 407,0 $(M+H)^+$, vypočteno 407,2; (+) 429,0 $(M+Na)^+$, vypočteno 429,2; (+) 445,0 $(M+K)^+$, vypočteno 445,2.

5.8.7. 1,4-Dibenzyl-1,4,7,10-tetraazadodekan (9)



Syntéza byla provedena podle publikovaného postupu.[87] V 50mL baňce bylo v 15 mL EtOH rozpuštěno 4,00 g (9,8 mmol) **8** a dále přidáno 9,00 g NaOH v 15 mL H_2O. Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě 90 °C po dobu 24 h. Následně byla na vakuové odparce odpařena na hustý olej, který byl rozpuštěn ve 100 mL vody. Produkt **9** byl extrahován CH_2Cl_2 (3× 70 mL), organické fáze byly spojeny a vysušeny bezv. $MgSO_4$. Po odfiltrování sušidla a odpaření rozpouštědla na vakuové odparce byl získán bezbarvý olej produktu **9**, který stáním v lednici přes noc ztuhl. Po dosušení *in vacuo* bylo získáno 3,27 g, tj. 95 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

Charakterizace odpovídá dříve publikovaným datům.[65a]

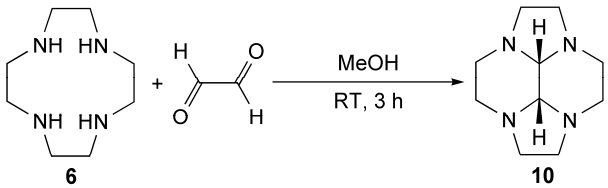
TLC: $CHCl_3$–*i*$PrNH_2$ 15:1, R_f = 0,30, roztok $KMnO_4$, zhášení fluorescence (254 nm).

^{1}H NMR (299,941 MHz, $CDCl_3$): δ 2,53 (m, 8H, CH_2N), 2,74 (m, 4H, CH_2N), 2,80 (s, 4H, CH_2N), 3,43 (s. 4H, NC$\underline{H}_2$Ph), 7,16–7,26 (m, 10H, arom.).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, $CDCl_3$): δ 45,1 (s, 2C, CH_2N), 46,9 (s, 2C, CH_2N), 50,6 (s, 2C, CH_2N), 52,2 (s, 2C, CH_2N), 58,4 (s, 2C, N$\underline{C}H_2$Ph), 127,1 (s, 2C, arom.), 128,3 (s, 4C, arom.), 129,3 (s, 4C, arom.), 138,8 (s, 2C, arom.).

MS (ESI): (+) 262,9 $(M–Bn+H)^+$, vypočteno 262,2; 353,0 $(M+H)^+$, vypočteno 353,3.

5.8.8. Perhydro-2a,4a,6a,8a-tetraazacyklopent[*f*,*g*]acenaftylen (10)



Syntéza byla provedena podle lehce modifikovaného postupu v lit.[70] Ve 100mL baňce bylo ve 30 mL MeOH rozpuštěno 1,54 g (8,9 mmol, 3 ekv.) **6**. Roztok byl ochlazen v lázni voda–led (–5 °C) a k němu byl přikapán vychlazený roztok 630 mg (3 mmol) glyoxalu (navážka $(OHC–CHO)_3 \cdot 2H_2O$ byla rozpuštěna v 10 mL horké vody a naředěna 10 mL MeOH). Reakční směs byla pomalu ohřáta na laboratorní teplotu a míchána 3 h. Poté byl roztok odpařen na vakuové

odparce a odparek byl 3-krát odpařen se suchým EtOH. Po rozpuštění odparku ve 30 mL Et_2O byly pevné nečistoty odsáty na fritě S3. Odpařením byl získán bílý prášek produktu **10**, který byl dosušen *in vacuo*. Bylo získáno 1,80 g, tj. 100 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

Charakterizace odpovídá dříve publikovaným datům.[88]

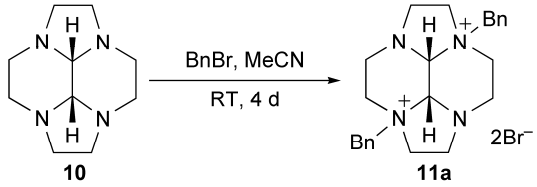
TLC: *i*PrOH–aq. NH_3–H_2O 7:3:3, R_f = 0,80, roztok $KMnO_4$.

^{1}H NMR (299,941 MHz, D_2O): δ 2,56 (br m, 4H, CH_2N), 2,72 (s, 4H, CH_2N), 2,88–2,99 (br m, 8H, CH_2N), 3,10 (m, 2H, CH_{aminal}).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, $CDCl_3$): δ 50,1 (s, 4C, CH_2N), 51,3 (s, 4C, CH_2N), 77,6 (s, 2C, C_{aminal}).

MS (ESI): (+) 194,8 $(M+H)^+$, vypočteno 195,2; (+) 584,8 $(3M+H)^+$, vypočteno 583,5.

5.8.9. *cis*-2a,6a-Dibenzyldekahydro-2a,4a,6a,8a-tetraazacyklopent[*f*,*g*]acenaftylenium dibromid (11a)



10 **11a**

Syntéza byla provedena podle modifikovaného postupu v lit.[71] V 25mL baňce bylo v 10 mL suchého MeCN rozpuštěno 0,75 g (3,9 mmol) **10** a za laboratorní teploty bylo k intenzivně míchanému roztoku přidáno 2,00 g (11,7 mmol, 3 ekv.) BnBr. Začala se tvořit sraženina monokvartérní soli. Po 4 d míchání při laboratorní teplotě byla sraženina bis(kvartérní) soli **11a** odsáta na fritě S4, promyta MeCN a následně Et_2O. Produkt **11a** byl dosušen *in vacuo*. Bylo získáno 1,86 g bílého prášku, tj. 90 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

Charakterizace odpovídá dříve publikovaným datům.[88]

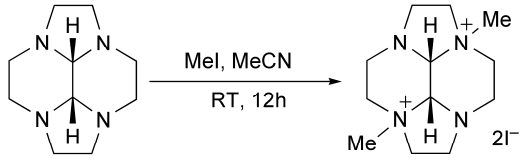
TLC: *i*PrOH–aq. NH_3–H_2O 7:3:3, R_f = 0,05, ninhydrin.

^{1}H NMR (299,941 MHz, D_2O): δ 3,10–3,23 (m, 2H, CH_2N), 3,40–3,55 (m, 4H, CH_2N), 3,55–3,80 (br m, 6H, CH_2N), 3,80–3,95 (m, 2H, CH_2N), 4,23–4,87 (m, 2H, CH_2N), 4,82 (s, 2H, CH_{aminal}), 4,81–4,96 (m, 2H, $NC\underline{H}_2Ph$), 7,48–7,78 (m, 10H, arom.).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, D_2O): δ 43,6 (s, 2C, CH_2N), 46,9 (s, 2C, CH_2N), 55,7 (s, 2C, CH_2N, 61,8 (s, 2C, CH_2N), 61,8 (s, 2C, C_{aminal}), 78,4 (s, 2C, $NC\underline{H}_2Ph$), 126,8, 130,6, 132,3, 133,0 (arom.).

MS (ESI): (+) 284,9 $(M-Bn)^+$, vypočteno 285,2; (+) 375,0 $(M+H)^+$, vypočteno 375,3; (+) 455,0 $(M+^{79}Br)^+$, vypočteno 455,2; (+) 457,0 $(M+^{81}Br)^+$, vypočteno 457,2.

5.8.10. *cis*-2a,6a-Dimethyldekahydro-2a,4a,6a,8a-tetraazacyklopent[*f*,*g*]acenaftylenium dijodid (11b)



10 **11b**

V 25mL baňce bylo ve 3 mL suchého MeCN rozpuštěno 1,00 g (5,1 mmol) **10** a za laboratorní teploty bylo k intenzivně míchanému roztoku přidáno 2,19 g (15,3 mmol, 3 ekv.) MeI. Během exotermní reakce se začala se tvořit sraženina monokvartérní soli. Po 12 h míchání při laboratorní teplotě byla sraženina bis(kvartérní) soli **11b** odsáta na fritě S4, promyta MeCN a následně Et_2O. Produkt **11b** byl dosušen *in vacuo*. Bylo získáno 2,24 g bílého prášku, tj. 91 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

Charakterizace odpovídá dříve publikovaným datům.[89]

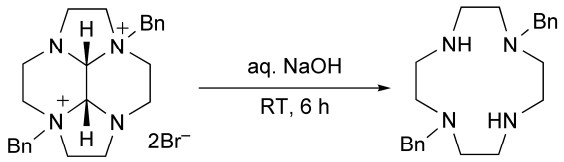
TLC: *i*PrOH–aq. NH_3–H_2O 7:3:3, R_f = 0,00, ninhydrin.

^{1}H NMR (299,941 MHz, D_2O): δ 3,11–3,21 (m, 4H, CH_2N), 3,42 (s, 6H, NCH_3), 3,59–3,70 (m, 4H, CH_2N), 3,86–3,98 (m, 2H, CH_2N), 4,20–4,13 (m, 4H, CH_2N), 4,52 (s, 2H, NCH).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, D_2O): δ 45,6 (s, 2C, CH_2N), 49,0 (s, 2C, CH_2N), 49,3 (s, 2C, N CH_3), 61,7 (s, 2C, CH_2N), 67,5 (s, 2C, CH_2N), 80,6 (s, 2C, NCH).

MS (ESI): (+) 222,8 $(M-H)^+$, vypočteno 223,2; 350,8 $(M+I)^+$, vypočteno 351,1.

5.8.11. 1,7-Dibenzyl-1,4,7,10-tetraazadodekan (12a)



11a **12a**

V 50mL baňce bylo v 10 mL H_2O rozpuštěno 1,80 g (3,4 mmol) **11a** a za laboratorní teploty bylo přidáno 6,00 g NaOH v 10 mL H_2O. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 6 h. Poté byla naředěna 30 mL H_2O a produkt **12a** byl extrahován CH_2Cl_2 (4× 30 mL). Organické fáze byly spojeny, vysušeny bezv. $MgSO_4$ a po odfiltrování sušidla bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové

odparce. Světle žlutý olej stáním v lednici přes noc ztuhl. Pevný produkt **12a** byl dosušen *in vacuo*. Bylo získáno 1,10 g světle žlutého prášku, tj. 90 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

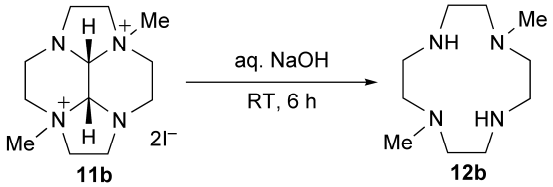
Charakterizace odpovídá dříve publikovaným datům.[68]

TLC: EtOH–aq. NH_3 15:1, R_f = 0,65, ninhydrin.

^{1}H NMR (299,941 MHz, $CDCl_3$): δ 2,58 (br s, 14H, CH_2N), 3,56 (s, 4H, $NC\underline{H}_2Ph$), 7,19–7,30 (m, 10H, arom.).

MS (ESI): (+) 262,9 $(M-Bn+H)^+$, vypočteno 262,2; 353,0 $(M+H)^+$, vypočteno 353,3.

5.8.12. 1,7-Dimethyl-1,4,7,10-tetraazadodekan (12b)



11b **12b**

V 25mL baňce bylo v 5 mL H_2O rozpuštěno 0,50 g (1,05 mmol) **11b** a za laboratorní teploty bylo přidáno 3,00 g NaOH v 5 mL H_2O. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 6 h. Poté byl produkt **12b** extrahován CH_2Cl_2 (4× 15 mL). Organické fáze byly spojeny, vysušeny bezv. $MgSO_4$ a po odfiltrování sušidla bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce. Bylo získáno 190 mg nažloutlého oleje, tj. 90 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

Charakterizace odpovídá dříve publikovaným datům.[90]

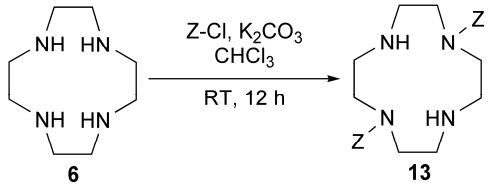
TLC: EtOH–aq. NH_3 7:3, R_f = 0,30, ninhydrin.

^{1}H NMR (299,941 MHz, $CDCl_3$): δ 2,22 (s, 6H, NCH_3), 2,40 (br s, 8H, CH_2N), 2,57 (t, $^3J_{HH}$ = 5,1 Hz, 8H, CH_2N).

$^{13}C\{^1H\}$ (75,428 MHz, $CDCl_3$): δ 42,8 (s, 2C, NCH_3), 44,5 (s, 4C, CH_2N), 53,9 (s, 4C, CH_2N).

MS (ESI): (+) 200,9 $(M+H)^+$, vypočteno 201,2.

5.8.13. 1,7-Bis(benzyloxykarbonyl)-1,4,7,10-tetraazadodekan (13)



6 13

Syntéza byla provedena podle modifikovaného postupu.[91] V 250mL baňce bylo ve 150 mL $CHCl_3$ rozpuštěno 1,00 g (5,8 mmol) **6**, přidáno 8,00 g (58 mmol, 10 ekv.) bezv. K_2CO_3 a reakční směs byla ochlazena v lázni voda–led. K míchané směsi bylo pomalu přikapáno 2,40 g (13,9 mmol, 2,4 ekv.) benzyl chloroformiátu (Z-Cl). Reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Poté byl pevný podíl odsát na fritě S4 a promyt $CHCl_3$. Filtrát byl odpařen na vakuové odparce a nažloutlý olej produktu **13** byl přečištěn sloupcovou chromatografií na SiO_2 (150 g SiO_2, EtOH–aq. NH_3 5:1, R_f (**13**) = 0,40). Bylo získáno 2,47 g nažloutlého oleje, tj. 95 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

Charakterizace odpovídá dříve publikovaným datům.[91]

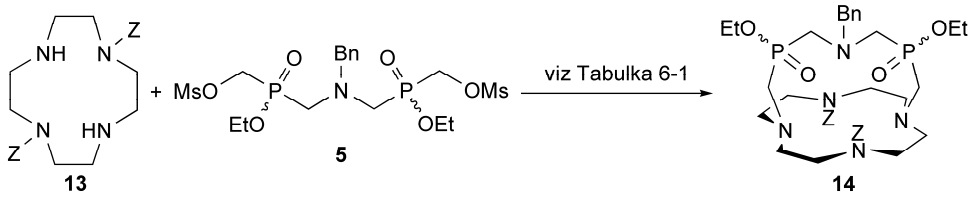
TLC: EtOH–aq. NH_3 5:1, R_f = 0,40, roztok $KMnO_4$.

^{1}H NMR (299,941 MHz, $CDCl_3$): δ 2,87 (m, 8H, C<u>H</u>$_2$NH), 3,52 (br m, 8H, CH_2N), 5,12 (s, 4H, OC<u>H</u>$_2$Ph), 7,30 (s, 10H, arom.).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, $CDCl_3$): δ 48,8–51,1 (m, 8C, CH_2NH a CH_2N), 67,5 (s, 2C, O<u>C</u>H$_2$Ph), 128,0 (s, 4C, arom.), 128,3 (s, 2C, arom.), 128,7 (s, 4C, arom.), 136,6 (s, 2C, arom.), 156,7 (s, 2C, CO).

MS (ESI): (+) 441,1 $(M+H)^+$, vypočteno 441,3.

5.8.14. 5-Benzyl-12,17-bis(benzyloxykarbonyl)-3,7-bis[(ethoxy)oxy]-1,5,9,12,17-pentaaza-3,7-difosfabicyklo[7.5.5]nonadekan (14)



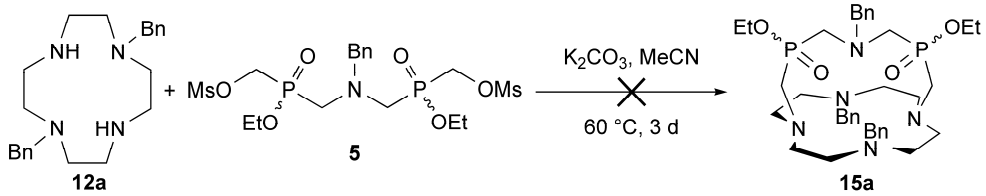
13 5 14

Tabulka 5-1. Reakční podmínky přípravy **14**.

báze	rozpouštědlo	teplota	reakční doba	konverze $^{31}P\{^1H\}$ NMR, HPLC, MS (ESI)
K_2CO_3 (5 ekv.)	MeCN	60 °C	3 d	0 %, částečný rozklad **5**
K_2CO_3 (10 ekv.)	MeCN	RT	3 d	0 %
K_2CO_3 (10 ekv.)	MeCN	40 °C	3 d	0 %
K_2CO_3 (10 ekv.)	MeCN	60 °C	3 d	0 %, částečný rozklad **5**
DIPEA (5 ekv.)	DMF	RT	3 d	0 %
DIPEA (5 ekv.)	DMF	60 °C	3 d	0 %, rozklad **5**
K_2CO_3 (10 ekv.)	DMF	RT	3 d	0 %
K_2CO_3 (10 ekv.)	DMF	60 °C	3 d	0 %, částečný rozklad **5**
K_2CO_3 (10 ekv.) + NaH (0,1 ekv.)	DMF	40 °C	3 d	0 %, rozklad **5**
Cs_2CO_3 (10 ekv.)	DMF	40 °C	3 d	0 %, rozklad **5**

Obecný postup: Ve 4mL vialce bylo rozpuštěno 14 mg (0,04 mmol) **13** v 0,5 mL rozpouštědla, poté byla přidána báze a 25 mg (0,04 mmol) 80% **5**. Reakční směs byla míchána při příslušné teplotě. Průběh reakce byl sledován každých 8 h pomocí $^{31}P\{^1H\}$ NMR, HPLC (metoda 1) a MS (ESI).

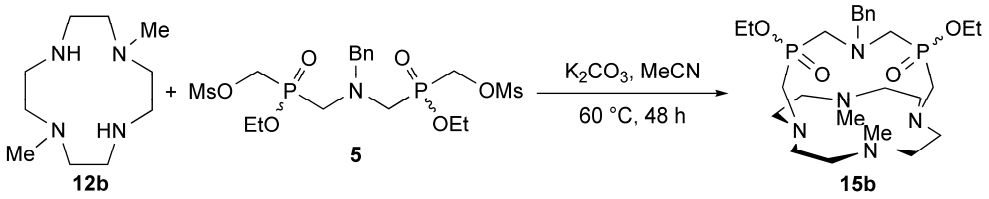
5.8.15. 5,12,17-Tribenzyl-3,7-bis[(ethoxy)oxy]-1,5,9,12,17-pentaaza-3,7-difosfabicyklo[7.5.5]nonadekan (15a)



12a 5 15a

Ve 4mL vialce bylo rozpuštěno 21 mg (0,06 mmol) **12a** v 0,75 mL suchého MeCN, dále bylo přidáno 83 mg (0,6 mmol, 10 ekv.) vyžíhaného a rozetřeného K_2CO_3 a 40 mg (0,06 mmol) 80% **5**. Reakční směs byla míchána při teplotě 60 °C po dobu 3 d. Podle $^{31}P\{^1H\}$ NMR byl pozorován rozklad prekurzoru **5** a v MS spektru nebyl pozorován signál s *m/z* odpovídající produktu cyklizace **15a**.

5.8.16. 5-Benzyl-12,17-dimethyl-3,7-bis[(ethoxy)oxy]-1,5,9,12,17-pentaaza-3,7-difosfabicyklo[7.5.5]nonadekan (15b)



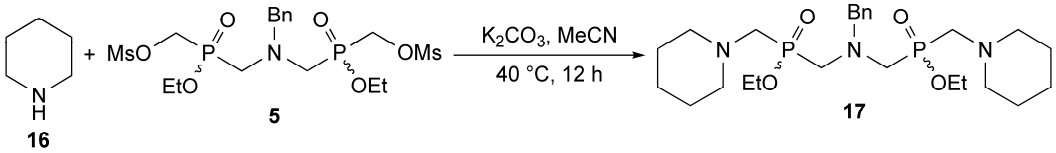
Ve 4mL vialce bylo rozpuštěno 12 mg (0,06 mmol) **12b** v 0,75 mL suchého MeCN, dále bylo přidáno 83 mg (0,6 mmol, 10 ekv.) vyžíhaného a rozetřeného K_2CO_3 a 40 mg (0,06 mmol) 80% **5**. Reakční směs byla míchána při teplotě 60 °C po dobu 48 h. Konverze reakce byla dle $^{31}P\{^1H\}$ NMR 30 %. Produkt **15b** nebyl z reakční směsi izolován.

Charakterizace:

$^{31}P\{^1H\}$ (121,422 MHz, MeCN): δ 52,3 (br s).

MS (ESI): (+) 544,2 $(M+H)^+$, vypočteno 544,3.

5.8.17. Diethyl benzylamin-bis[methylen(piperidylmethylfosfinát)] (17)



Ve 4mL vialce bylo v 0,5 mL suchého MeCN rozpuštěno 25 mg (0,04 mmol) 80% **5** a poté bylo přidáno 55 mg (0,4 mmol, 10 ekv.) vyžíhaného a rozetřeného K_2CO_3 a 8 µL (0,08 mmol, 2 ekv.) **16**. Reakční směs byla míchána při 40 °C po dobu 12 h. Konverze reakce byla dle $^{31}P\{^1H\}$ NMR 80 %. Produkt **17** nebyl z reakční směsi izolován.

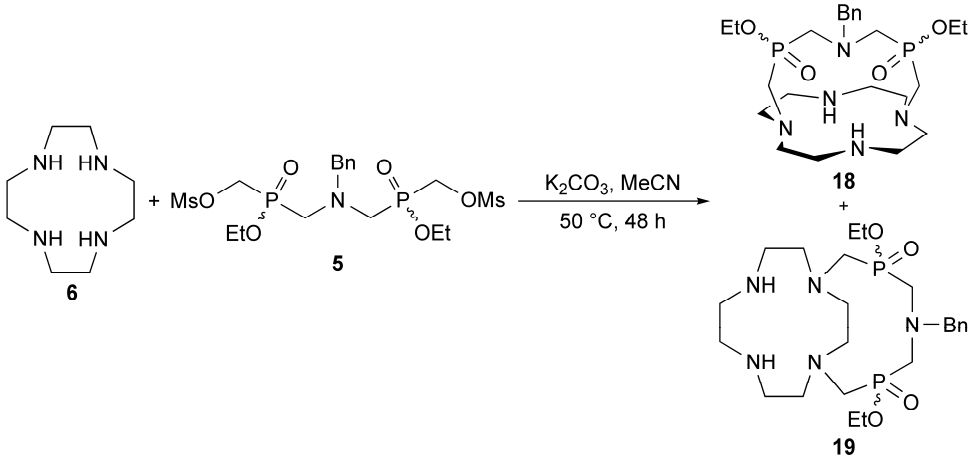
Charakterizace:

$^{31}P\{^1H\}$ (121,422 MHz, MeCN): δ 50,3 (s, 1P), 51,0 (s, 1P).

MS (ESI): (+) 514,1 $(M+H)^+$, vypočteno 514,3.

5.8.18. 5-Benzyl-3,7-bis[(ethoxy)oxy]-1,5,9,12,17-pentaaza-3,7-difosfabicyklo[7.5.5]nonadekan (18)

14-benzyl-12,16-bis[(ethoxy)oxy]-1,4,7,10,14-pentaaza-12,16-difosfabicyklo[8.7.2]nonadekan (19)



Ve 100mL baňce bylo ve 40 mL suchého MeCN rozpuštěno 200 mg (1,16 mmol) **6** a následně bylo přidáno 1,60 g (11,6 mmol, 10 ekv.) vyžíhaného a rozetřeného K_2CO_3. K míchané suspenzi byl za laboratorní teploty přidán roztok 777 mg (1,16 mmol) 80% **5** v 10 mL suchého MeCN. Reakční směs byla míchána pod zpětným chladičem se sušící rourkou. Průběh reakce byl sledován pomocí $^{31}P\{^1H\}$ NMR. Po 48 h byla po zchladnutí reakční směs odsáta na fritě S4 a promyta MeCN. Po odpaření bylo získáno 460 mg světle žlutého oleje, ze kterého byly produkty **18** a **19** izolovány semi-preparativní HPLC (metoda 3). Čistota frakcí byla ověřena také pomocí HPLC (metoda 1). Frakce s produktem **18** byly spojeny a lyofilizovány. Bylo získáno 14 mg, tj. 2,5 % teoretického výtěžku. Frakce s produktem **19** byly také spojeny a lyofilizovány. Bylo získáno 57,9 mg, tj. 10 % teoretického výtěžku.

Charakterizace 18:

^1H NMR (600,174 MHz, CD_3CN): δ 1,24 (t, $^3J_{HH}$ = 7,1 Hz, 3H), 1,27 (t, $^3J_{HH}$ = 7,1 Hz, 3H), 2,70 (m, 3H, 2,77 (m, 3H, 2,98 (m, 2H, 3,08 (m, 4H), 3,17 (m, 2H), 3,26 (m, 2H), 3,38 (m, 3H), 3,54 (m, 2H), 3,66 (m, 1H), 3,96 (m, 1H), 4,08 (m, 4H), 7,38 (m, 5H).

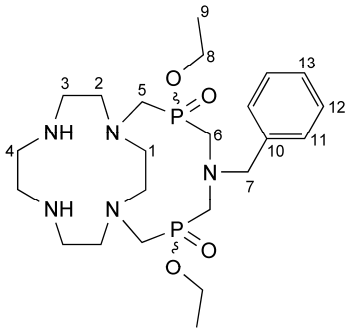
$^{13}C\{^1H\}$ (150,928 MHz, CD_3CN): δ 16,8 (d, 5,6 Hz), 17,1 (d, 4,9 Hz), 43,0 (s), 43,2 (s), 44,0 (s), 46,6 s), 49,6 (d, 102 Hz), 50,6 (d, 114 Hz), 52,0 (d, 11,2 Hz), 52,7 (s), 53,6 (dd, 111 Hz, 12,4 Hz), 53,9 (d, 11,3 Hz), 54,7 (d, 107 Hz), 55,1 (s), 61,5 (s), 62,3 (s), 63,3 (s), 129,0 (s), 129,6 (s), 131,8 (s), 135,2 (s).

$^{31}P\{^1H\}$ (121,422 MHz, $CDCl_3$): δ 50,0 (s, 1P), 44,8 (s, 1P).

MS (ESI): (+) 516,1 $(M+H)^+$, vypočteno 516,3.

HPLC (metoda 1): t_r = 3,15 min.

Charakterizace 19:



^{1}H NMR (600,174 MHz, CD_3CN): δ 1,28 (t, $^3J_{HH}$ = 7,0 Hz, 6H, 9), 2,78 (m, 2H, 2a), 2,82 (m, 2H, 5a), 2,84 (m, 2H, 6a), 3,00 (m, 2H, 2b), 3,02 (m, 2H, 1a), 3,06 (m, 2H, 1b), 3,17 (ddd, $^2J_{HH}$ = 14,0 Hz, $^3J_{HH}$ = 5,7 Hz, $^3J_{HH}$ = 3,7 Hz, 2H, 4a), 3,35 (m, 4H, 3a a 5b), 3,38 (m, 2H, 6b), 3,41 (m, 2H, 4b), 3,55 (m, 2H, 3b), 3,82 (s, 2H, 7), 4,10 (m, 4H, 8), 7,35 (m, 2H, 12), 7,37 (m, 1H, 13), 7,43 (m, 2H, 11).

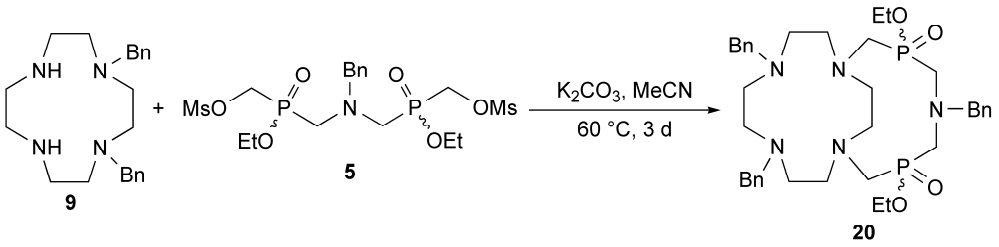
^{13}C{^{1}H} (150,928 MHz, CD_3CN): δ 17,29 (d, $^3J_{CP}$ = 5,5 Hz, 2C, 9), 44,2 (s, 2C, 3), 46,4 (s, 2C, 4), 52,0 (d, $^1J_{CP}$ = 112 Hz, 2C, 5), 52,5 (dd, $^1J_{CP}$ = 109 Hz, $^3J_{CP}$ = 9,1 Hz, 2C, 6), 53,3 (s, 2C, 1), 56,6 (d, $^3J_{CP}$ = 13,9 Hz, 2C, 2), 62,3 (t, $^3J_{CP}$ = 8,7 Hz, 1C, 7), 63,3 (d, $^2J_{CP}$ = 7,1 Hz, 2C, 8), 129,4 (s, 1C, 13), 130,3 (s, 2C, 12), 131,3 (s, 2C, 11), 137,7 (s, 1C, 10).

^{31}P{^{1}H} (121,422 MHz, $CDCl_3$): δ 53,5 (s).

MS (ESI): (+) 516,1 $(M+H)^+$, vypočteno 516,3.

HPLC (metoda 1): t_r = 5,33 min.

5.8.19. 4,7,14-Tribenzyl-12,16-bis[(ethoxy)oxy]-1,4,7,10,14-pentaaza-12,16-difosfabicyklo[8.7.2]nonadekan (20)



9 + **5** → **20**

Ve 100mL baňce bylo ve 30 mL suchého MeCN rozpuštěno 1,17 g (3,32 mmol) **9** a k roztoku bylo přidáno 4,60 g (33,2 mmol, 10 ekv.) vyžíhaného a rozetřeného K_2CO_3. K míchané suspenzi byl za laboratorní teploty v jedné dávce přidán roztok 2,22 g (3,32 mmol) 80% **5** v 10 mL suchého MeCN. Reakční směs byla míchána pod zpětným chladičem se sušící rourkou při teplotě 60 °C po

dobu 3 d. Průběh reakce byl sledován pomocí $^{31}P\{^{1}H\}$ NMR. Následně byla suspenze odsáta na fritě S3 a pevný podíl promyt MeCN. Filtrát byl odpařen na vakuové odparce a hnědý olej surového produktu **20** byl přečištěn flash chromatografií na SiO_2 (240 g SiO_2, CH_2Cl_2–*i*$PrNH_2$ 98:2, R_f (**20**) = 0,25). Po odpaření mobilní fáze bylo získáno 1,17 g nahnědlého oleje, ve kterém bylo dle HPLC (metoda 1) 60 % produktu **20**. Tato směs byla použita do další reakce.

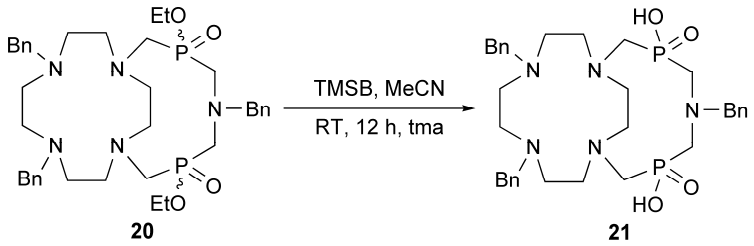
Charakterizace:

$^{31}P\{^{1}H\}$ (121,422 MHz, $CDCl_3$): δ 51,4 (br s).

MS (ESI): (+) 606,4 $(M-Bn+H)^+$, vypočteno 606,4; (+) 696,4 $(M+H)^+$, vypočteno 696,4.

HPLC (metoda 1): t_r = 10,63 min (izomer 1), t_r = 10,97 min (izomer 2).

5.8.20. 4,7,14-Tribenzyl-12,16-bis[(hydroxy)oxy]-1,4,7,10,14-pentaaza-12,16-difosfabicyklo[8.7.2]nonadekan (21)



20 **21**

Ve 100mL baňce bylo ve 30 mL suchého MeCN rozpuštěno 1,17 g **20** a baňka byla propláchnuta silnějším proudem Ar. V jedné dávce bylo k míchanému roztoku přidáno 1,5 ml (11,7 mmol, 10 ekv.) TMSB, baňka byla uzavřena skleněnou zátkou a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě ve tmě 12 h. Následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce a hnědý olej byl rozpuštěn ve 40 mL suchého EtOH. Reakční směs byla odpařena na odparce, znovu rozpuštěna v suchém EtOH a odpařena dosucha (celkem bylo odpařování s EtOH provedeno 3-krát). Surový produkt **21** byl přečištěn flash chromatografií na SiO_2 (130 g SiO_2 EtOH–aq. NH_3 100:1, R_f (**21**) = 0,25). Po odpaření rozpouštědla a dosušení produktu **21** *in vacuo* bylo získáno 380 mg světle žluté látky, tj. 18 % teoretického výtěžku (počítáno na výchozí látku **9**).

Charakterizace:

TLC: EtOH–aq. NH_3 100:1, R_f = 0,25, roztok $KMnO_4$.

^{1}H NMR (299,941 MHz, D_2O, 80 °C): δ 3,02–3,56 (br m, 22H, CH_2N), 3,77–3,86 (br m, 2H, CH_2N), 4,12–4,26 (m, 4H, $NC\underline{H}_2Ph$), 4,59 (s, 2H, $NC\underline{H}_2Ph$), 7,43–7,63 (br m, 15H, arom.).

$^{13}C\{^{1}H\}$ (150,928 MHz, D_2O, 70 °C): δ 47,1 (s, 2C, CH_2N), 51,7 (s, 2C, CH_2N), 52,7 (s, 2C, CH_2N), 53,0 (d, $^{1}J_{CP}$ = 88,5 Hz, 2C, PCH_2N), 54,5 (d, $^{1}J_{CP}$ = 107 Hz, 2C, PCH_2N), 59,3 (s, 2C, $N\underline{C}H_2Ph$), 63,6

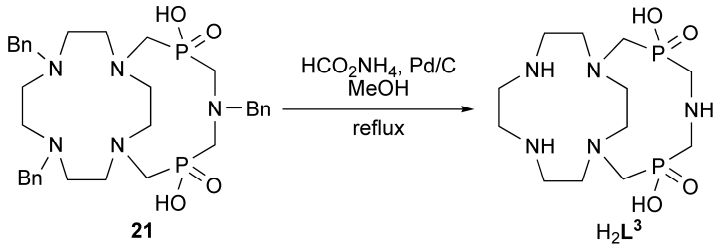
(s, 1C, N<u>C</u>H$_2$Ph), 129,8 (s, 4C, arom.), 130,0 (s, 2C, arom.), 130,2 (s, 1C, arom.), 130,4 (s, 2C, arom.), 130,9 (s, 2C, arom.), 131,1 (s, 1C, arom.), 131,7 (s, 4C, arom.), 131,7 (s, 2C, arom.).

^{31}P{^{1}H} (121,422 MHz, D$_2$O): δ 35,8 (br s).

MS (ESI): (+) 640,3 (M+H)$^+$, vypočteno 640,3; (−) 638,3 (M−H)$^-$, vypočteno 638,2.

HPLC (metoda 2): t_r = 12,08 min.

5.8.21. 12,16-Bis[(hydroxy)oxy]-1,4,7,10,14-pentaaza-12,16-difosfabicyklo[8.7.2]nonadekan (H_2L^3)



V 10mL baňce bylo v 5 mL MeOH rozpuštěno 460 mg (0,72 mmol) **21**, dále bylo přidáno 1,36 g (21,6 mmol, 30 ekv.) HCO_2NH_4 a baňka byla propláchnuta Ar. Následně bylo přidáno 140 mg (30 hm%) Pd/C. Reakční směs byla refluxována pod zpětným chladičem v Ar atmosféře. Po 4 h byly v reakční směsi podle MS (ESI) přítomny meziprodukty *N*-debenzylace a produkt. Katalyzátor byl odfiltrován, do reakční směsi bylo přidáno 0,68 g (10,8 mmol, 15 ekv.) HCO_2NH_4, 140 mg (30 hm%) Pd/C a reakční směs byla opět refluxována pod zpětným chladičem v Ar atmosféře. Po 3 h byla podle MS (ESI) reakce u konce. Katalyzátor byl odfiltrován a filtrát odpařen na vakuové odparce. Produkt byl dosušen *in vacuo* na olejové pumpě. Bylo získáno 236 mg bílého prášku, tj. 89 % teoretického výtěžku.

Charakterizace:

TLC: EtOH–aq. NH_3 7:3, R_f = 0,25, roztok $CuSO_4$.

^{1}H NMR (299,941 MHz, D$_2$O): δ 2,91–3,18 (br m, 22H, CH$_2$N), 3,32 (br m, 2H, CH$_2$N).

^{13}C{^{1}H} (75,428 MHz, D$_2$O): δ 43,0 (s, 2C, CH$_2$N), 43,8 (s, 2C, CH$_2$N), 50,6 (d, $^{3}J_{CP}$ = 10 Hz, 2C, CH$_2$N), 52,0 (d, $^{3}J_{CP}$ = 11,1 Hz, 2C, CH$_2$N), 53,1 (dd, $^{1}J_{CP}$ = 154 Hz, $^{3}J_{CP}$ = 6,6 Hz, 2C, PCH$_2$N), 55,2 (d, $^{1}J_{CP}$ = 99,5 Hz, 2C, PCH$_2$N).

^{31}P{^{1}H} (121,422 MHz, D$_2$O): δ 28,9 (s).

^{31}P (121,422 MHz, D$_2$O, 50 °C): δ 28,7 (t, $^{3}J_{PH}$ = 10,0 Hz,).

MS (ESI): (+) 369,9 (M+H)$^+$, vypočteno 370,2; (+) 391,9 (M+Na)$^+$, vypočteno 392,2; (−) 367,7 (M−H)$^-$, vypočteno 368,2; (−) 737,2(2M−H)$^-$, vypočteno, 737,3.

6. Výsledky a diskuze

6.1. Syntéza prekurzorů

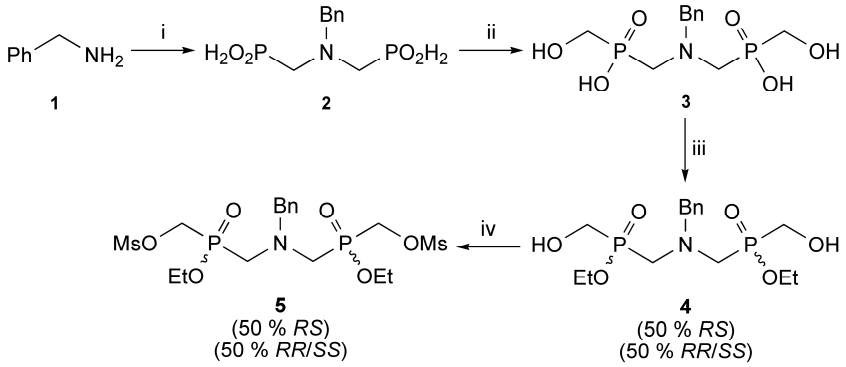
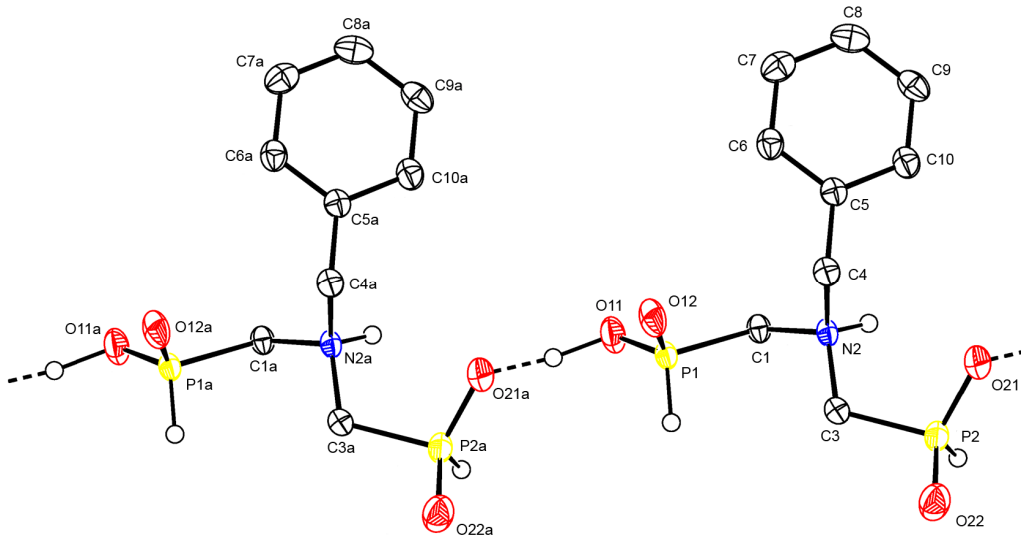
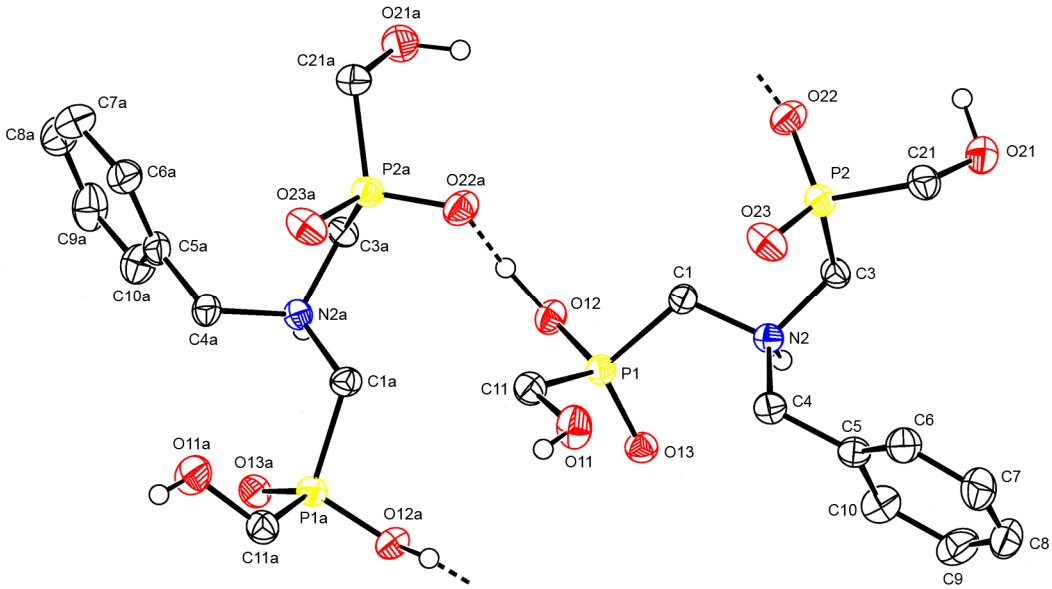


Schéma 11. Reakční podmínky syntézy prekurzoru **5**: (*i*) aq. CH_2O, H_3PO_2, RT, 12 h, (*ii*) aq. CH_2O, aq. HCl (1:1), 70 °C, 12 h, (*iii*) EtOH (suchý), DCC, DMAP, RT, 10 h, (*iv*) MsCl, DIPEA, CH_2Cl_2, −5 °C → RT, 12 h.

Prekurzor **5** byl připraven čtyřstupňovou syntézou z výchozího benzylaminu **1** (Schéma 11). Látka **2** byla připravena podle dříve publikovaného postupu,[86] který byl modifikován. Benzylamin **1** poskytuje modifikovanou Mannichovou reakcí s kyselinou fosfornou a roztokem formaldehydu benzylamin-bis(methylenfosfinovou kyselinu) **2**. V původní práci[86] nebyla reakční směs během přidávání benzylaminu chlazena a docházelo k vedlejší reakci (reduktivní methylaci), tj. tvorbě *N*-methylovaného vedlejšího produktu. Vznik tohoto vedlejšího produktu lze omezit chlazením reakční směsi v lázni voda–led během přidávání benzylaminu. Dalším vedlejším produktem této reakce je tvorba hydroxymethyl derivátu. Obě tyto nečistoty (celkem cca 10 %) lze odstranit triturací surového produktu v MeOH. Výtěžek reakce se poté pohybuje kolem 45 %. Struktura látky **2** byla prokázána rentgenostrukturní analýzou (Obrázek 6-1, krystalografické parametry viz Příloha 1). Vhodný monokrystal byl získán rozpuštěním látky **2** v malém množství směsi MeOH–H_2O 1:1 a pomalou difúzí acetonu přes plynnou fázi. V jedné nezávislé jednotce se nachází látka **2** a hydrátová voda. Zwitteriontový charakter je dán deprotonací jednoho z fosfinátu a protonizací N-atomu. Celá struktura je stabilizována velmi krátkými intermolekulárními vodíkovými vazbami nalezenými mezi dvěma oxofosforovými skupinami ($d_{O–O}$ = 2,41 Å, ∠OHO = 171,9°) a středně krátkými vazbami mezi oxofosforovou skupinou a protonizovaným N-atomem ($d_{N–O}$ = 2,70 Å, ∠NHO = 156,8°), oxofosforovou skupinou a hydrátovou vodou ($d_{O–O}$ = 2,77 Å, ∠OHO = 173,4°), a protonizovanou oxofosforovou skupinou a hydrátovou vodou



Obrázek 6-1. Výřez molekulární struktury ze struktury **2**·H_2O. Teplotní elipsoidy byly vykresleny s 50% pravděpodobností. Vodíkové atomy na uhlíkových atomech a hydrátová voda byly pro přehlednost vynechány.



Obrázek 6-2. Výřez molekulární struktury ze struktury **3**. Teplotní elipsoidy byly vykresleny s 50% pravděpodobností. Vodíkové atomy na uhlíkových atomech byly pro přehlednost vynechány.

($d_{O–O}$ = 2,83 Å, ∠OHO = 163,8°). Látka **3** byla připravena reakcí **2** s vodným roztokem formaldehydu v kyselém prostředí (1:1 aq. HCl). Při této reakci vznikají kromě látky **3** také různé polymerní částice*, které lze odstranit několikanásobným odpařením s vodou. Reakce probíhá kvantitativně. Monokrystal pro rentgenostrukturní analýzu byl připraven rozpuštěním **3** v malém množství vody a pomalou difúzí acetonu přes plynnou fázi. Molekulární strukturu látky **3** uvádí

* Polymerní částice vznikají reakcí polymeru formaldehydu s P–H vazbou.

Obrázek 6-2 (krystalografické parametry viz Příloha 1). V jedné nezávislé jednotce je přítomna pouze látka **3**. Jeden z fosfinátů je deprotonizován a proton se nachází na N-atomu. Struktura je opět stabilizována intermolekulárními vodíkovými vazbami nalezenými mezi dvěma oxofosforovými skupinami ($d_{O–O}$ = 2,42 Å, ∠OHO = 175,1°), oxofosforovou skupinou a protonizovaným N-atomem ($d_{N–O}$ = 2,61 Å, ∠NHO = 153,1°), a hydroxymethylovou skupinou a oxofosforovými skupinami ($d_{O–O}$ = 2,72 Å, ∠OHO = 163,4° a $d_{O–O}$ = 2,80 Å, ∠OHO = 157,3°). Dalším reakčním krokem byla esterifikace **3** v suchém EtOH, DCC a katalytickým množstvím DMAP. V reakční směsi vznikají dva diastereoizomery v poměru 1:1 – *meso* forma s konfigurací *RS* a enantiomerní pár *RR*/*SS*. V dalších reakcích byla používána tato směs diastereoizomerů. Konverze reakce byla dle $^{31}P\{^{1}H\}$ NMR 80 %. Surový produkt **4** byl čištěn sloupcovou chromatografií na SiO_2. I opakovanou chromatografií se nepodařilo produkt zcela vyčistit od DCU. Čistota se dle ^{1}H NMR pohybovala od 70–80 %. Alternativní postup pro odstranění DCU může být uložení reakční směsi do lednice na dobu šesti měsíců. Nicméně i v tomto případě byl po chromatografii obdržen produkt **4** o čistotě maximálně 85 %. Vzhledem k inertnímu chovaní DCU v dalších reakcích nebyl produkt **4** dále čištěn. Celkový výtěžek reakce byl 80 % (počítáno na surový produkt **4**). Mesylací **4** mesylchloridem byl připraven prekurzor **5** opět jako směs diastereoizomerů v 80% čistotě (nečistota je DCU) ve výtěžku 88 %. Připravený prekuzor **5** byl skladován v lednici a byl vždy spotřebován do dvou měsíců. Celá syntéza prekurzoru **5** je bez větších obtíží proveditelná v multigramové škále.

Syntéza N^1,N^4- a N^1,N^7-chráněného cyklenu vycházela z komerčního cyklenu **6** (Schéma 12). Příprava N^1,N^4-chráněného cyklenu přes cyklenoxamid **7** byla již dříve popsána[65a] a lehce modifikována v naší laboratoři.[87] Reakce cyklenu **6** s diethyloxalátem v bezvodém EtOH poskytla meziprodukt **7** v téměř kvantitativním výtěžku (98 %). Alkylací meziproduktu **7** benzylbromidem a následnou bazickou hydrolýzou meziproduktu **8** byl získán prekurzor **9** v celkovém výtěžku 74 % (počítáno na výchozí cyklen **6**). Reakcí cyklenu **6** s glyoxalem byl připraven bisaminal cyklenu **10** podle publikovaného postupu,[70] ze kterého byly reakcí s benzylbromidem a methyljodidem připraveny bis(kvartérní)amoniové soli **11a**,**b** ve vysokých výtěžcích (~90 %).[71] Jejich bazickou hydrolýzou byly připraveny prekurzory **12a**,**b** opět ve vysokých výtěžcích. Pro přípravu prekurzoru **13** byl použit modifikovaný postup (Schéma 12). V původní práci autoři acylovali cyklen **6** benzyl chloroformiátem v chloroformu a produkt **13** izolovali jako pevný podíl zfiltrováním reakční směsi.[91] Tento postup byl zopakován a po odfiltrování pevného podílu z reakční směsi byl získán téměř výhradně monoacylovaný cyklen. Naše modifikace tedy spočívala v přidání heterogenní báze

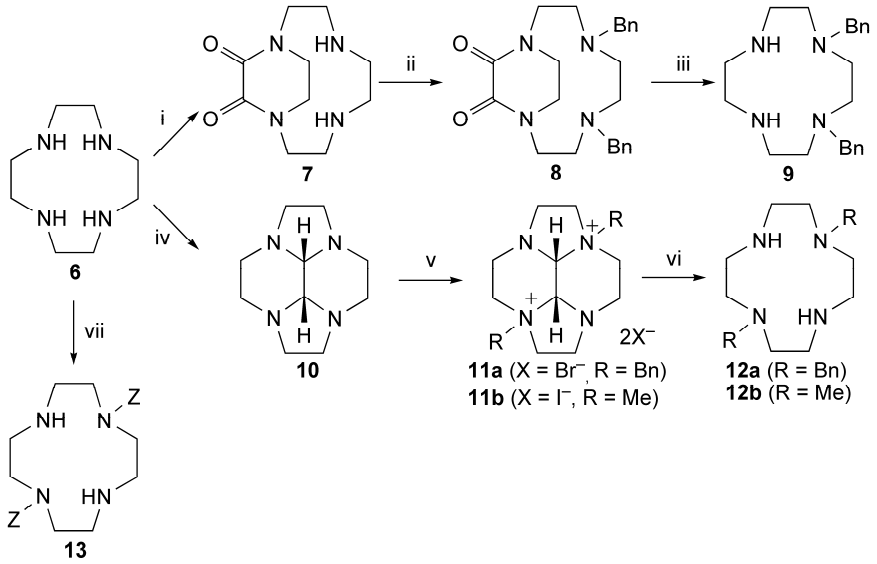


Schéma 12. Reakční podmínky syntézy prekurzorů – N^1,N^4- a N^1,N^7-chráněného cyklenu: (*i*) $(COOEt)_2$, EtOH (suchý), RT, 3 d, (*ii*) BnBr, K_2CO_3, DMF, 100 °C, 3 h, (*iii*) NaOH, EtOH–H_2O, 90 °C, 24 h, (*iv*) $(OHC–CHO)_3 \cdot 2H_2O$, MeOH, −5 °C → RT, 3 h, (*v*) **11a**: BnBr, MeCN (suchý), RT, 4 d, **11b**: MeI, MeCN (suchý), RT, 12 h, (*vi*) aq. NaOH, RT, 6 h, (*vii*) Z-Cl, K_2CO_3, $CHCl_3$, RT, 12 h; (Z = benzyloxykarbonyl).

K_2CO_3 do reakční směsi. Přítomná báze reaguje s uvolněným HCl, který v její nepřítomnosti tvoří hydrochlorid *N*-monoacylovaného cyklenu, který je v chloroformu málo rozpustný. Takto byl připraven prekurzor **13** v téměř kvantitativním výtěžku.

6.2. Syntéza N^1,N^4- a N^1,N^7-izomerů makrobicyklických ligandů

První pokusy o přípravu makrobicyklického skeletu byly reakce *trans*-chráněného cyklenu **13** s prekurzorem **5** za různých podmínek (Tabulka 6-1) (Schéma 13). Jako báze byly použity jak heterogenní báze (K_2CO_3 a Cs_2CO_3), tak homogenní báze (DIPEA). Jako rozpouštědlo byl použit

Tabulka 6-1. Reakční podmínky přípravy N^1,N^7-izomeru z prekurzorů **5** a **13**.

báze	rozpouštědlo	teplota	reakční doba	konverze $^{31}P\{^1H\}$ NMR, HPLC, MS (ESI)
K_2CO_3 (5 ekv.)	MeCN	60 °C	3 d	0 %, částečný rozklad **5**
K_2CO_3 (10 ekv.)	MeCN	RT	3 d	0 %
K_2CO_3 (10 ekv.)	MeCN	40 °C	3 d	0 %
K_2CO_3 (10 ekv.)	MeCN	60 °C	3 d	0 %, částečný rozklad **5**
DIPEA (5 ekv.)	DMF	RT	3 d	0 %
DIPEA (5 ekv.)	DMF	60 °C	3 d	0 %, rozklad **5**
K_2CO_3 (10 ekv.)	DMF	RT	3 d	0 %
K_2CO_3 (10 ekv.)	DMF	60 °C	3 d	0 %, částečný rozklad **5**
K_2CO_3 (10 ekv.) + NaH (0,1 ekv.)	DMF	40 °C	3 d	0 %, rozklad **5**
Cs_2CO_3 (10 ekv.)	DMF	40 °C	3 d	0 %, rozklad **5**

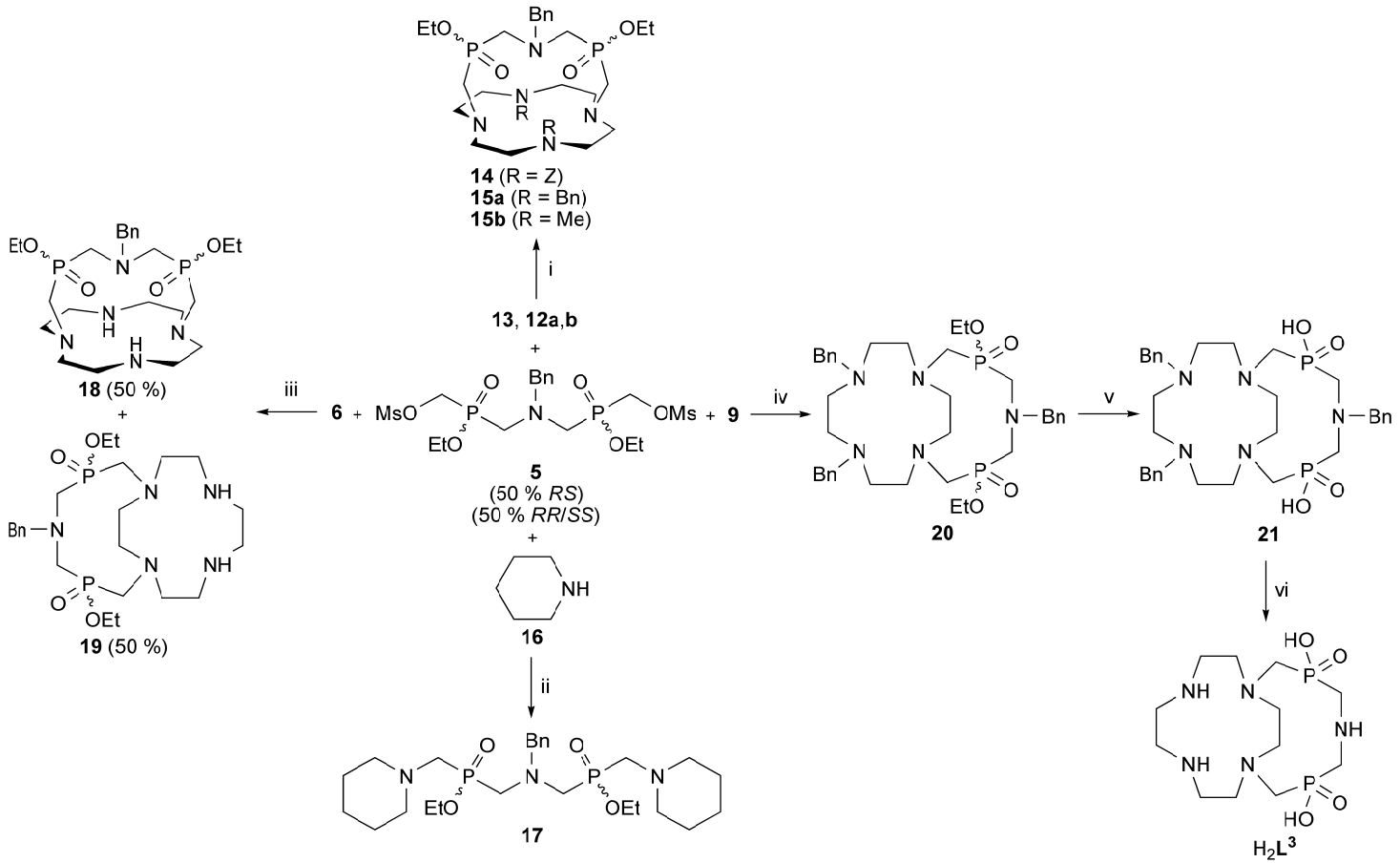


Schéma 13. Reakční podmínky: (*i*) **14**: viz Tabulka 6-1 str. 67, **15a**: K_2CO_3, MeCN (suchý), 60 °C, 3 d, **15b**: K_2CO_3, MeCN (suchý), 60 °C, 48 h, (*ii*) K_2CO_3, MeCN (suchý), 40 °C, 12 h, (*iii*) K_2CO_3, MeCN (suchý), 50 °C, 2 d, (*iv*) K_2CO_3, MeCN (suchý), 60 °C, 3 d, (*v*) TMSB, MeCN, RT, tma, 12 h, (*vi*) HCO_2NH_4, Pd/C, MeOH, reflux.

MeCN a DMF. Reakce byly prováděny za různých teplot. V žádném experimentu nebyl v reakční směsi pozorován vznik produktu **14**, navíc v některých případech docházelo k částečnému či úplnému rozkladu prekurzoru **5**. Pro studium stability prekurzoru **5** za podmínek alkylace, tj. přítomnost báze a MeCN nebo DMF za různých teplot, byla provedena jednoduchá kinetická studie. Prekurzor **5** je v DMF nebo MeCN s nadbytkem (10 ekv.) Cs_2CO_3 nebo *N*-ethyl-diisopropylaminu kompletně rozložen za tři dny při teplotě 60 °C. V případě MeCN a nadbytku (10 ekv.) K_2CO_3 je při teplotě 60 °C ještě po třech dnech přítomno cca 20 % prekurzoru **5**. Částečný rozklad prekurzoru **5** byl také pozorován v MeCN nebo DMF při 60 °C bez přítomnosti báze. Rozkladné produkty prekurzoru **5** se na základě LC-MS nepodařilo identifikovat, ale nejednalo se o hydrolýzu mesylátové skupiny.

Pro studium reaktivity prekurzoru **5** byla zvolena modelová reakce se sekundárním aminem piperidinem **16** (Schéma 13). Reakce probíhala v MeCN při 40 °C a po 12 h bylo podle $^{31}P\{^1H\}$ NMR 80 % látky **5** odreagováno. Zbylých 20 % byly rozkladné produkty prekurzoru **5**. Identita produktu **17** byla potvrzena pomocí MS (ESI), produkt však nebyl z reakční směsi izolován.

Aby byl eliminován vliv chránící skupiny na cyklenu, byla provedena reakce cyklenu **6** s prekurzorem **5** v MeCN za přítomnosti K_2CO_3 (Schéma 13). Cyklizační reakce neprobíhala ve vysokém zředění. Po 48 h nebyl v reakční směsi dle $^{31}P\{^1H\}$ NMR přítomen výchozí prekurzor **5** a konverze byla 50 %. Podle HPLC chromatogramu vznikly dva produkty **18** a **19** v poměru 1:1 a další nežádoucí vedlejší produkty, které se nepodařilo identifikovat. Na základě MS (ESI) se nejednalo o polymerní částice, které by mohly vznikat při malém zředění reakční směsi inter-molekulární cyklizací, např. [2+2]. Z reakční směsi byly oba produkty izolovány semipreparativní HPLC v malých výtěžcích (2,5 a 10 %). Menší výtěžek produktu **18** byl způsoben rozkladem během separace. Zatímco produkt **19** byl jednoznačně určen pomocí 2D NMR (HSQC, HMBC) jako N^1,N^4-izomer, tak u produktu **18** už to tak jednoznačné nebylo. Pomocí homonukleární a heteronukleární korelace (^1H-^1H COSY, HSQC, HMBC, NOESY) byla vyloučena struktura N^1,N^4-izomeru, zároveň však nebyla jednoznačně potvrzena struktura N^1,N^7-izomeru. Na základě stejného *m*/*z* v MS (ESI) a fragmentačního spektra se domníváme, že se jedná pravděpodobně o N^1,N^7-izomer. Tato reakce je obtížně proveditelná ve větších navážkách, protože výslednou směs nelze rozdělit sloupcovou chromatografií na SiO_2 a je nutno použít preparativní HPLC.

Na základě neúspěchu cyklizační reakce prekurzorů **5** a **13** byly učiněny další pokusy o přípravu N^1,N^7-izomerů makrobicyklických ligandů. Jejich syntéza vycházela z cyklizační reakce prekurzorů

12a,**b** a **5** (Schéma 13). Reakce prekurzoru **5** s N^1,N^7-dibenzylcyklenem **12a** probíhala v MeCN s K_2CO_3 při 60 °C. Podle $^{31}P\{^1H\}$ NMR cyklizační reakce vůbec neprobíhala a byl pozorován pouze částečný rozklad prekurzoru **5**. Reakce prekurzoru **5** se stéricky méně bráněným N^1,N^7-dimethyl-cyklenem **12b** v MeCN s K_2CO_3 při 60 °C poskytla dle MS (ESI) produkt **15b**. Rovněž nebyly podle MS (ESI) pozorovány produkty intermolekulární cyklizace. Podle $^{31}P\{^1H\}$ NMR byla konverze reakce po 48 h 30 % a zbylých 70 % odpovídalo rozkladným produktům prekurzoru **5**.

Z průběhu cyklizačních reakcí *trans*-chráněných derivátu cyklenu **13** a **12a**,**b** s prekurzorem **5** bylo tedy zjištěno, že na reaktivitu cyklenu má zásadní vliv stérická náročnost chránících skupin.

Cílená syntéza N^1,N^4-izomeru vycházela z chráněného cyklenu v *cis*-poloze, reakcí **9** s **5** v MeCN za přítomnosti K_2CO_3 při 60 °C (Schéma 13). Reakce také neprobíhala ve vysokém zředění a opět nebyla pozorována intermolekulární cyklizace. Konverze reakce byla po 3 d dle $^{31}P\{^1H\}$ NMR 40 % a v reakční směsi nebyl přítomen prekurzor **5**. Produkt **20** byl od vedlejších produktů izolován flash chromatografií na SiO_2. Vzhledem k podobné polaritě nečistot nebyl produkt podle HPLC po chromatografii čistý a čistota se pohybovala okolo 60 %. Z tohoto důvodu nebylo možné produkt **20** charakterizovat pomocí ^1H a ^{13}C NMR. Při alkylaci za jiných reakčních podmínek, tj. použití DMF místo MeCN a použití Cs_2CO_3 místo K_2CO_3, bylo zjištěno, že v případě použití DMF v přítomnosti K_2CO_3 nebo Cs_2CO_3 je konverze reakce nižší (~30 %). Konverze se nezvýšila ani po prodloužení reakční doby. Podle MS (ESI) byl v reakční směsi přítomen také meziprodukt alkylace, tj. nukleofilní substituce proběhla jen na jednom *N*-atomu. Pomalejší rychlost reakce je pravděpodobně způsobena vyšší rozpustností vznikajícího mesylátu draselného nebo cesného v DMF. Reakcí **20** s trimethylsilylbromidem v MeCN vzniká příslušný trimethylsilyl ester, který po hydrolýze suchým EtOH poskytuje produkt **21** (Schéma 13). Reakci je nutno provádět ve tmě, protože fotochemickou reakcí může vznikat v reakční směsi radikál $Br^{\bullet}$, který štěpí P–C vazbu. Flash chromatografií na SiO_2 byl produkt vyčištěn od nečistot z předešlé alkylační reakce a také od DCU. Celkový výtěžek byl nízký a pohyboval se okolo 18 % (vztaženo na výchozí prekurzor **9**). Čistota produktu **21** byla ověřena pomocí HPLC, protože v ^1H a ^{13}C NMR spektrech nelze jednoznačně přiřadit signály. Po rozpuštění je v roztoku složitá dynamická rovnováha mezi různými konformery aza-makrobicyklů a z důvodu přítomnosti stéricky objemných benzylových skupin je znesnadněn přechod mezi jednotlivými konformery v NMR škále. Při laboratorní teplotě v ^1H NMR spektru tvoří všechny H-atomy na makrobicyklu velmi široký multiplet. Benzylové H-atomy tvoří také široké signály. V ^{13}C NMR spektru nelze rozlišit jednotlivé C-atomy na

makrobicyklu. Situace se trochu zlepší při teplotě 80 °C. Nicméně se nepodařilo přiřadit jednotlivé signály pomocí 2D NMR spektroskopie. Posledním syntetickým krokem byla debenzylace. Klasická hydrogenolýza v EtOH nebo ve směsi EtOH–50% aq. AcOH katalyzovaná Pd/C zaváděním vodíku do reakční směsi selhala. Ani po dvou dnech při 50 °C nebyl podle MS (ESI) pozorován vznik di- a monobenzylovaných meziproduktů ani produktu. Byla proto vyzkoušena transfer hydrogenace s HCO_2NH_4 ve směsi MeOH–konc. HCO_2H s Pd/C při teplotě 70 °C. Podle MS (ESI) byly po 12 h pozorovány di- a monobenzylované meziprodukty, ale v reakční směsi nebyl přítomen produkt. Prodloužení reakční doby na dva dny vedlo ke vzniku nežádoucích vedlejších produktů. Na základě MS (ESI) docházelo pravděpodobně k rozpadu skeletu. Jako další rozpouštědlo pro transfer hydrogenace byla zvolena směs MeOH–H_2O 7:3 z důvodů eliminace možného negativního vlivu kyseliny mravenčí a také z důvodu vyšší rozpustnosti debenzylovaného produktu. Při této reakci bylo zjištěno, že je nutné použít větší množství Pd/C (30 hm%), než je obvyklé pro *N*-debenzylace, a navíc je nutné katalyzátor přidávat postupně během reakce. Pokud bylo v reakci použito 10 hm% Pd/C, byly po 3 h dle MS (ESI) v reakční směsi pozorovány meziprodukty debenzylace a produkt $H_2\mathbf{L}^3$. Prodloužením reakční doby na 24 h ani přidáním dalšího HCO_2NH_4 se konverze reakce nezvýšila. Pokud byl přidán nový katalyzátor, proběhla debenzylace za další 3 h. Dalším důležitým poznatkem bylo zjištění, že voda v reakční směsi hraje pravděpodobně negativní roli. Na základě $^{31}P\{^1H\}$ NMR při různém pH a ^{31}P-^{31}P EXSY bylo zjištěno, že kromě produktu (60 %) jsou ve směsi další tři látky v poměru 2:1:1, které se podle MS (ESI) nepodařilo interpretovat. Negativní vliv vody může být vysvětlen hydrolýzou HCO_2^- na kyselinu mravenčí, která je zodpovědná za degradaci produktu. Tato hypotéza byla později ověřena studiem stability připraveného ligandu $H_2\mathbf{L}^3$ v přítomnosti kyseliny mravenčí. Jako poslední možnost byla vyzkoušena transfer hydrogenace pouze v MeOH (Schéma 13). Opět bylo nutné při reakci používat větší množství Pd/C. V první dávce Pd/C (30 hm%) proběhla debenzylace majoritně na dibenzylovaný meziprodukt, minoritně na monobenzylovaný meziprodukt a produkt $H_2\mathbf{L}^3$. Po přidání další dávky Pd/C (30 hm%) proběhla debenzylace kompletně. Zatím se nepodařilo vysvětlit pravděpodobnou otravu katalyzátoru. Pokud se po odfiltrování katalyzátoru reakční směs odpaří na odparce, aniž by byla ve styku s vodou, lze odstranit všechen nezreagovaný HCO_2NH_4. Tímto postupem byl připraven ligand $H_2\mathbf{L}^3$ ve vysokém výtěžku (89 %). Pravděpodobně díky vodíkovým vazbám jsou signály H-atomů v ^1H NMR spektru špatně rozlišeny jak v kyselé (pH = 1), neutrální, tak i bazické (pH = 14) oblasti. Proto nelze provést jednoznačné přiřazení signálů v ^1H a ^{13}C NMR spektrech.

Byly učiněny pokusy o přípravu monokrystalu na rentgenostrukturní analýzu, ale krystal s vhodnou velikostí se nepodařilo připravit.

6.3. Protonizační konstanty ligandu

Závislost chemického posunu v NMR spektru na pH (pH NMR titrace) lze použít pro stanovení protonizačních konstant a charakterizace místa protonizace. Vazbou protonu na bazické místo dochází ke změnám hodnot stínících konstant, tedy změnám rezonančních frekvencí nelabilních protonů v ^{1}H NMR nebo fosforových jader v ^{31}P NMR. Obecně lze protonizaci ligandů popsat rovnicí (35).

$$H_{i-1}L + H^+ \rightleftharpoons H_iL^+ \qquad pK_{ai} \tag{35}$$

Konsekutivní protonizační konstanty pK_{ai}, kde $pK_{ai} = -\log K_{ai}$, charakterizují jednotlivé protonizační kroky. Rovnovážná konstanta K_{ai} je definována rovnicí (36).

$$K_{ai} = \frac{[H_iL^+]}{[H_{i-1}L][H^+]} \tag{36}$$

Protože signály H-atomů ligandu $H_2\mathbf{L}^3$ tvoří široký špatně rozlišený multiplet byly protonizační konstanty ligandu $H_2\mathbf{L}^3$ stanoveny pomocí ^{31}P NMR. Byly provedeny dvě titrace v rozsahu pH 2–13 z bazické do kyselé oblasti bez kontroly iontové síly. Data ze dvou titrací byla vyhodnocena pomocí programového balíku OPIUM® (Obrázek 6-3 a). Nejlepší model předpokládá v systému pět částic $H_4(\mathbf{L}^3)^{2+}$, $H_3(\mathbf{L}^3)^{+}$, $H_2\mathbf{L}^3$, $H(\mathbf{L}^3)^{-}$ a $(\mathbf{L}^3)^{2-}$, jejichž relativní zastoupení v závislosti na pH zobrazuje distribuční diagram (Obrázek 6-3 b). Acidobazickou rovnováhu v systému lze popsat pomocí čtyř protonizačních konstant (Tabulka 6-2).

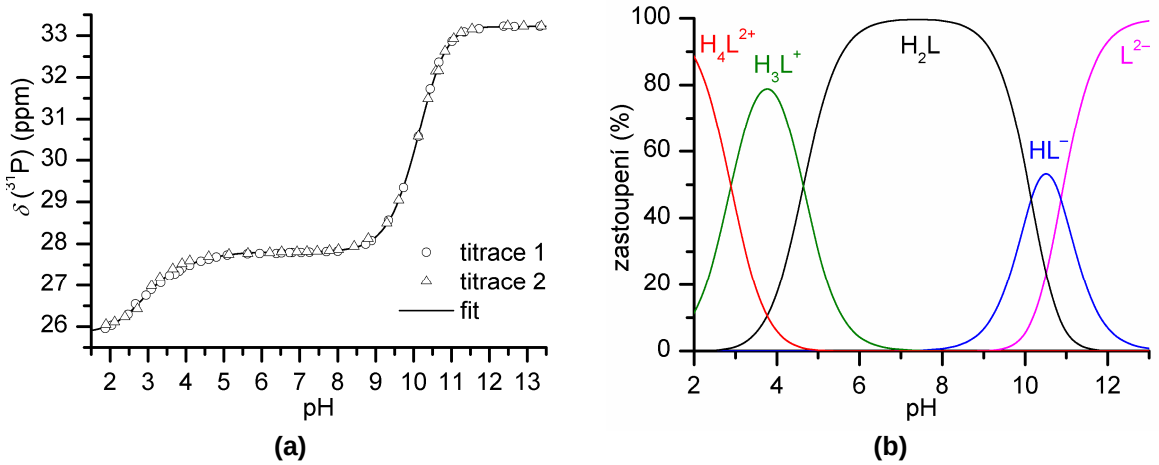
Bez pomoci dat z pH ^{1}H NMR titrace nelze jednoznačně určit protonizační schéma ligandu $H_2\mathbf{L}^3$, nicméně podle obecných trendů protonizace aza-makrocyklů s pendantními rameny lze usuzovat, že první protonizační konstanta $pK_{a1} = 10{,}9$ souvisí s protonizací makrocyklu. Druhý přistupující proton s protonizační konstantou $pK_{a2} = 10{,}15$ také odpovídá protonizaci makrocyklu. V oblasti pH = 9–11 lze pozorovat výraznou změnu v chemickém posunu fosforu v ^{31}P NMR,

Tabulka 6-2. Konsekutivní protonizační konstanty ligandu $H_2\mathbf{L}^3$ a strukturně podobných ligandů.[a]

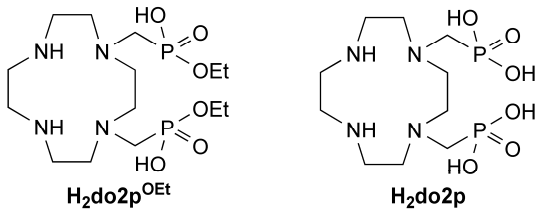
ligand	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}	pK_{a5}	ΣpK_a
$H_2\mathbf{L}^3$ [b]	10,9(1)	10,15(1)	4,6(2)	2,9(2)	–	28,6(1)
1,4-H_2do2p^{OEt} [c]	11,38(1)	8,55(1)	1,29(2)	–	–	21,24(2)
1,4-H_4do2p [c]	12,84(2)	11,20(2)	7,75(2)	4,94(2)	1,39(2)	38,12(2)

[a] Standardní odchylka je uvedena v závorce. [b] Bez kontroly iontové síly, 25 °C. [c] I = 0,1 M NH_4Cl, 25 °C, Obrázek 6-4, lit.[92]

kterou lze vysvětlit interakcí přes vodíkovou vazbu fosfinové skupiny s naprotonizovaným N-atomem makrocyklu. Třetí protonizační konstanta pK_{a3} = 4,6 pravděpodobně odpovídá protonizaci N-atomu mezi dvěma fosfinovými skupinami. Poslední stanovená protonizační konstanta pK_{a4} = 2,9 je pravděpodobně spojena s další protonizací makrocyklu. Kyselost připraveného ligandu H_2**L**^{3} lze porovnat se strukturně podobnými ligandy s monoethyl fosfonovými nebo fosfonovými pendanty (Obrázek 6-4) (Tabulka 6-2). Fosfinový analog ligandu 1,4-H_2do2p nebyl zatím v literatuře popsán. Podle prvních dvou protonizačních konstant pK_{a1} a pK_{a2} lze porovnat afinitu k protonu. Nejmenší afinitu k protonu má ligand 1,4-H_2do2p^{OEt}, následuje studovaný ligand H_2**L**^{3} a nejbazičtější je ligand 1,4-H_2do2p. Tento trend je v souladu s poznatkem, že fosfonová skupina s kladným indukčním efektem (+*I*) zvyšuje bazicitu N-atomu, narozdíl od fosfinové skupiny, která svým záporným indukčním efektem (−*I*) obvykle snižuje bazicitu N-atomu. V tomto směru se monoester fosfonové skupiny chovají podobně jako fosfinové skupiny.[93]



Obrázek 6-3. (a) Titrační data pH ^{31}P NMR titrace ligandu H_2**L**^{3} při 25 °C, bez kontroly iontové síly. (b) Distribuční diagram pro ligand H_2**L**^{3}.



Obrázek 6-4. Strukturně podobné ligandy, které byly zmíněny v textu

7. Závěr

Předkládaná diplomová práce měla několik cílů, které se z části podařilo splnit. Prvním cílem byla syntéza acyklického můstku, prekurzoru **5**, která byla optimalizována a všechny meziprodukty syntézy byly charakterizovány pomocí ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR , MS (ESI), popř. elementární analýzy. U látek **3** a **4** byla jejich struktura potvrzena také pomocí rentgenostrukturní analýzy. Dále byly připraveny *N*^{1},*N*^{4}- a *N*^{1},*N*^{7}-chráněné deriváty cyklenu jako prekurzory pro cyklizační reakci s prekurzorem **5**. Pokusy o přípravu *N*^{1},*N*^{7}-izomeru kryptandového ligandu reakcí prekurzoru **5** s *trans*-chráněným cyklenem **13** benzyloxykarbonylovou skupinou selhaly. Byla proto vyzkoušena alternativní cesta alkylace nechráněného cyklenu prekurzorem **5**. Tato reakce poskytovala *N*^{1},*N*^{4}-izomer v malém výtěžku a pravděpodobně také *N*^{1},*N*^{7}-izomer ve velmi malém výtěžku. Plně charakterizován byl pomocí ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR a MS (ESI) pouze *N*^{1},*N*^{4}-izomer **19**. Identita *N*^{1},*N*^{7}-izomeru **18** byla potvrzena pouze pomocí MS (ESI). Další pokusy o přípravu *N*^{1},*N*^{7}-izomeru vycházely z reakce prekurzoru **5** s *trans*-chráněným cyklenem **12a**,**b** benzylovou a methylovou skupinou. Cyklizační reakce probíhala pouze se stéricky málo bráněným *N*^{1},*N*^{7}-dimethylcyklenem. Kryptandový ligand **15b** byl charakterizován pouze pomocí MS (ESI) a ^{31}P NMR, protože nebyl připraven v dostatečném množství pro charakterizaci pomocí ^{1}H a ^{13}C, a pro další reakce. Bylo zjištěno, že na reaktivitu cyklenu při přípravě *N*^{1},*N*^{7}-izomeru má zásadní vliv stérická náročnost chránících skupin. Tento důležitý poznatek bude využit v dalších pokusech při přípravě derivátů *N*^{1},*N*^{7}-izomerů kryptandových ligandů. Další studovanou reakcí byla cyklizační reakce prekurzoru **5** s *cis*-chráněným cyklenem **9**. Připravený *N*^{1},*N*^{4}-izomer H_2**L**^{3} a meziprodukty syntézy, kromě látky **20**, byly charakterizovány pomocí ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR a MS (ESI). Nízké výtěžky cyklizací vedly k přípravě ligandu H_2**L**^{3} v množství, které stačilo pouze pro studium jeho acidobazických vlastností. Byly provedeny také první pokusy o přípravu komplexů s ionty Ln^{3+} a jejich studium. Komplexační studie nejsou zahrnuty v této diplomové práci, protože dosavadní výsledky nejsou kompletní a mohly by být zavádějící.

8. Přílohy

Příloha 1. Krystalografické parametry studovaných látek **2**, **3**

Látka	**2**·H_2O	**3**
Vzorec	$C_9H_{17}NO_5P_2$	$C_{11}H_{19}NO_6P_2$
M_r	281,18	323,21
Tvar, barva	destička, bezbarvá	jehličky, bezbarvá
Rozměry (mm)	0,50×0,20×0,05	0,42×0,18×0,10
Krystalová soustava	monoklinická	orthorombická
Prostorová grupa	$P2_1$ (# 4)	$P2ab$ (# 32)
a (Å)	7,0189(3)	8,8815(2)
b (Å)	5,7569(2)	10,2599(2)
c (Å)	15,9662(8)	30,9771(8)
α (°)	90,00	90,00
β (°)	98,694(2)	90,00
γ (°)	90,00	90,00
U (Å^3)	637,73(5)	2822,74(11)
Z	2	8
D_{calc} (g cm^{-3})	1,464	1,521
μ (mm^{-1})	0,350	0,332
T (K)	150(1)	150(1)
Rozsah θ (°)	1,29–27,51	1,31–27,48
Total refl.	2908	3287
Obsd. refl. ($I > 2\sigma(I)$)	2630	2185
GOF on F^2	1,052	1,052
R; wR ($I > 2\sigma(I)$)	0,0383; 0,0794	0,0409; 0,1038
R; wR (všechna data)	0,0316; 0,0766	0,0749; 0,1146
$\Delta\rho_{max/min}$ (e Å^{-3})	0,251/−0,292	0,324/−0,357

9. Poznámky

10. Literatura

[1] R. Weissleder, U. Mahmood, Radiology, **2001**, *219*, 316–333.

[2] P. C. Lauterbur, *Nature*, **1973**, *242*, 190–191.

[3] http://lekarske.slovniky.cz/pojem/infarzace, staženo 31. 1. 2011.

[4] D. I. Hoult, P. C. Lauterbur, *J. Magn. Reson.*, **1979**, *34*, 425–433.

[5] A. E. Merbach, É. Tóth, The Chemistry of Contrasts Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, John Wiley & Sons, Chichester **2001**.

[6] N. A. Bock, A. C. Silva, *Future Neurol.*, **2007**, *2*, 297–305.

[7] M. T. Vlaardingerbroek, J. A. den Boer, *Magnetic Resonance Imaging. Theory and Practice,* Springer, Verlag **1996**.

[8] D. D. Schwert, J. A. Davies, N. Richardson, *Topics Curr. Chem.*, **2002**, *221*, 165–199.

[9] (a)A. P. Koretsky, A. C. Silva, *NMR Biomed.*, **2004**, *17*, 527–531. (b) A. Van der Linden, V. Van Meir, I. Tindemans, M. Verhoye, J. Baltazart, *NMR Biomed.*, **2004**, *17*, 602–612. (c) Y. T. Kuo, A. H. Herlihy, P. W. So, J. Bell, *NMR Biomed.*, **2006**, *19*, 1028–1034.

[10] K. G. Toft, S. O. Hustvedt, D. Grant, I. Martinsen, P. B. Gordon, G. A. Friisk, A. J. Korsmo, T. Skotland, *Acta Radiol.*, **1997**, *38*, 677–689.

[11] H. B. Na, I. Ch. Song, T. Hyeon, *Adv. Mater.*, **2009**, *29*, 2133–2148.

[12] P. J. Mohr, B. N. Taylor, D. B. Newell, *Rev. Mod. Phys.*, **2008**, *80*, 635–724.

[13] J. A. Peters, J. Huskens, D. J. Raber, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1996**, *28*, 283–350.

[14] R. Ranganathan, N. Raju, H. Fan, X. Zhang, M. Tweedle, J. Desreux, V. Jacques, *Inorg. Chem.*, **2002**, *41*, 6856–6866.

[15] R. D. Shannon, *Acta Cryst.*, **1976**, *32*, 751–767.

[16] W. P. Cacheris, S. C. Quay, S. M. Rocklage, *Magn. Reson. Imaging*, **1990**, *8*, 467–481.

[17] E. Brücher, *Top. Curr. Chem.*, **2002**, *221*, 103–122.

[18] H. Gries, *Top. Curr. Chem.*, **2002**, *221*, 1–24.

[19] S. Aime, P. Caravan, *J. Magn. Reson. Imaging*, **2009**, *30*, 1259–1267.

[20] http://en.wikipedia.org/wiki/Nephrogenic_systemic_fibrosis, staženo 31. 1. 2011.

[21] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, **2008**, 3027–3047.

[22] P. Caravan, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 851–862.

[23] P. Caravan, J. Ellison, T. McMurry, R. Lauffer, *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2293–2352.

[24] R. B. Lauffer, D. J. Parmelee, S. U. Dunham, H. S. Ouellet, R. P. Dolan, S. Witte, T. J. McMurry, R. C. Walowith, *Radiology*, **1998**, *207*, 529–538.

[25] http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1952/, staženo 17. 1. 2011.

[26] P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry 8th edition*, Oxford University Press, Oxford **2006**.

[27] J. B. Lambert, E. P. Mazzola, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Prentice Hall, New Jersey **2003**.

[28] N. Bloembergen, L. Morgan, *J. Chem. Phys.*, **1961**, *34*, 842–850.

[29] I. Solomon, N. Bloembergen, *J. Chem. Phys.*, **1956**, *25*, 261–266.

[30] N. Bloembergen, *J. Chem. Phys.*, **1957**, 572–573.

[31] R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, **1987**, *87*, 901–927.

[32] J. Freed, *J. Chem. Phys.*, **1978**, *68*, 4034.

[33] S. Viswanathan, Z. Kovacs, K. N. Green, S. J. Ratnakar, A. D. Sherry, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2960–3018.

[34] W. D. Horrocks Jr., D. R. Sudnick, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, 334–340.

[35] Y. Hass, G. Stein, *J. Phys. Chem.*, **1972**, *76*, 1093–1102.

[36] M. Albin, G. K. Farber, W. D. Horrocks Jr., *Inorg. Chem.*, **1984**, *23*, 1648–1651.

[37] S. G. Zech, W. Ch. Sun, V. Jacques, P. Caravan, A. V. Astashkin, A. M. Raitsimring, *Chem. Phys. Chem.*, **2005**, *6*¸2570–2577.

[38] J. W. Chen, R. L. Belford, R. P. Clarkson, *J. Phys. Chem.*, **1998**, *102*, 2117–2130.

[39] J. W. Chen, F. P. Auteri, D. E. Budil, R. L. Belford, R. P. Clarkson, *J. Phys. Chem.*, **1994**, *98*, 3452–3459.

[40] S. Aime, R. Nano, *Invest. Radiol.*, **1988**, *23*, 264–266.

[41] L. Vander Elst, S. Laurent, *Invest. Radiol.*, **1998**, *33*, 828–834.

[42] G. Lipari, A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 4546–4559.

[43] K. Micskei, L. Helm, E. Brucher, A. E. Merbach, *Inorg. Chem.*, **1993**, *32*, 3844–3850.

[44] L. Helm, A. E. Merbach, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, *187*, 151–181.

[45] É. Tóth, O. M. Ni Dhubhghaill, G. Besson, L.Helm, A. E. Merbach, *Magn. Reson. Chem.*, **1999**, *37*, 701–708.

[46] S. Aime, M. Botta, S. Geninatti Crich, G. B. Giovenzana, G. Jommi, R Pagliarin, M. Sisti, *Inorg. Chem.*, **1997**, *36*, 2992–3000.

[47] S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, P. Losi, A. Maiocchi,G. Palmisano, M. Sisti, *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 7588–7590.

[48] J. Xu, S. J. Franklin, D. W. Whisenhunt, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 7245–7246.

[49] (a) E. J. Werner, A. Datta, Ch. J. Jocher, K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 8568–8580. (b) A. Datta, K. N. Raymond, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 938–947.

[50] E. J. Werner, S. Avedano, M. Botta, B. P. Hay, E. G. Moore, S. Aime, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 1870–1871.

[51] P. Caravan, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, *35*, 512–523.

[52] C. Casali, M. Janier, E. Canet, j. F. Obadia, S. Benderbous, C. Corot, D. Revel, *Acad. Radiol.*, **1998**, *5*, S214–S228.

[53] M. Rohrer, H. Bauer, J. Mintorovitch, M. Requardt, H. J. Weinmann, *Invest. Radiol.*, **2005**, *40*, 715–724.

[54] D. A. Fulton, M. O´Halloran, D. Parker, K. Senanayake, M. Botta, S. Aime, *Chem. Commun.*, **2005**, 474–476.

[55] V. Jacques, J. F. Desreux, *Top. Curr. Chem.*, **2002**, *221*, 123–164.

[56] J. B. Livramento, É. Tóth, A. Sour, A. Borel, A. E. Merbach, R. Ruloff, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 1480–1484.

[57] P. Carav, N. J. Cloutier, M. T. Greenfield, S. A. McDermid, S. U. Dunham, J. W. Bulte, J. C. Amedio Jr., R. J. Looby, R. M. Supkowski, W. D. Horrocks Jr., T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 3152–3162.

[58] S. Aime, E. Gianolio, E. Terreno, G. B. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Sisti, G. Palmisano, M. Botta, M. P. Lowe, D. Parker, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2000**, *5*, 488–497.

[59] J. Rudovský, M. Botta, P. Hermann, A. Koridze, S. Aime, *Dalton Trans.*, **2006**, 2323–2333.

[60] P. Lebdušková, P. Hermann, L. Helm, É. Tóth, J. Kotek, K. Binnemans, J. Rudovský, I. Lukeš, A. E. Merbach, *Dalton Trans.*, **2007**, 493–501.

[61] S. Aime, M. Botta, M. Fasano, M. P. M. Marques, C. F. G. C. Geraldes, D. Pubanz, A. E. Merbach, *Inorg. Chem.*, **1997**, *36*, 2059–2068.

[62] E. Terreno, D. D. Castelli, A. Viale. S. Aime, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 3019–3042.

[63] H. Stetter, K. H. Mayer, *Chem. Ber.*, **1961**, *64*, 1410–1416.

[64] M. Suchý, R. H. E. Hudson, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, *29*, 4847–4865.

[65] (a) F. Bellouard, F. Chuburu, N. Kervarec, L. Toupet, S. Triki,Y. Le Mest, H. Handel, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**, 3499–3505. (b) R. Trokowski, S. Zhang, A D. Sherry, *Bioconjugate. Chem.*, **2004**, *15*, 1431–1440.

[66] C. Li, W. T. Wong, *J. Org. Chem*, **2003**, *68*, 2956–2959.

[67] V. Patinec, J. J. Yaouanc, H. Handel, J. C. Clément, H. des. Abbayes, *Inorg. Chim. Acta*, **1994**, *220*, 347–348.

[68] A. Roignant, I. Gardinier, H. Bernard, J. J. Yaouanc, H. Handel, *J. Chem. Soc. Commun.*, **1995**, 1233–1234.

[69] I. Gardinier, H. Bernard, F. Chuburu, A. Roignant, J. J. Yaouanc, H. Handel, *Chem. Commun.*, **1996**, 2157–2158.

[70] M. Le Baccon, F. Chuburu, L. Toupet, H. Handel, M. Soibinet, I. D. Olivier, J. P. Barbier, M. Aplincourt, *New. J. Chem.*, **2001**, *25*, 1168–1174.

[71] J. Rohovec, R. Gyepes, I. Císařová, J. Rudovský, I. Lukeš, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 1249–1253.

[72] W. C. Baker, M. J. Choi, D. C. Hill, J. L. Thomson, P. A. Petillo, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 2683–2689.

[73] G. Herve, H. Bernard, N. LeBris, M. LeBaccon, J. J. Yaouanc, H. Handel, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 2517–2520.

[74] Z. Li, K. Undheim, *Acta Chim. Scand.*, **1998**, *52*, 1247–1253.

[75] J. van Westrenen, A. D. Sherry, *Bioconjugate Chem.*, **1994**, *3*, 524–532.

[76] (a) Z. Kovacs, A. D. Sherry, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 185–186; (b) Z. Kovacs, A. D. Sherry, *Synthesis,* **1997**, 759–763; (c) S. Zhang, X. Jiang, A. D. Sherry, *Helv. Chim. Acta*, **2005**, *88*, 923–935.

[77] A. Dumont, V. Jacques, P. Qixiu, J. F. Desreux, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *35*, 3707–3710.

[78] F. Chaux, F. Denat, E. Espinosa, R. Guilard, *Chem. Commun.*, **2006**, 5054–5056.

[79] M. Ciampolini, M. Micheloni, N. Nardi, P. Paoletti, P. Dapporto, F. Zanobini, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1984**, 1357–1362.

[80] T. J. Hubin, *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, *241*, 27–46.

[81] Z. Otwinowski, W. Minor, HKL Denzo and Scalepack Program Package by Nonius BV, Delft, **1997**; Z. Otwinowski, W. Minor, Methods Enzymol. **1997**, *276*, 307–326.

[82] SIR92 – A Program for Automatic Solution of Crystal Structures by Direct Methods. A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M. C. Burla, G. Polidori, M. Camalli, *J. Appl. Cryst.*, **1994**, *27*, 435.

[83] G.M. Hledrick, SHELXL-97, A computer program for refinement of crystal structures. University of Göttingen, Göttingen **1997**.

[84] A. L. Spek, PLATON – *A Multipurpose Crystallographic Tool*, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, **2005**.

[85] M. Kývala, I. Lukeš, International Conference Chemometrics 95, str. 63, Pardubice, Czech Republic, **1995**. Plná verze programu je dostupná na: http://web.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html.

[86] B. Dhawan, D. Redmore, *J. Chem. Research*, **1988**, 34–35.

[87] J. Bárta, *Diplomová práce*, PřF UK v Praze, Praha **2010**.

[88] W. Niu, E. H., Wong, G. R. Weisman, D. C. Hill, D. J. Tranchemontagne, K. Ch. Lam, R. D. Sommer, L. N. Zakharov, A. L. Rheingold, *Dalton Trans.*, **2004**, 3536–3547.

[89] S. Rojas- Kima, N. Farfán, R. Santillan, D. Castillo, M. E. Sosa-Torres, H. Höpfl, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 6427–6433.

[90] M. Ciampolini, M. Micheloni, N. Nardi, P. Paoletti, P. Dapporto, F. Zanobini, *Dalton Trans.*, **1984**, *7*, 1357–1362.

[91] L. M. De León-Rodríguez, Z. Kovacs, A. C. Esqueda-Oliva, A. D. Miranda-Olvera, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 6937–6940.

[92] J. Bárta, nepublikované výsledky.

[93] I. Lukeš, J. Kotek, P. Vojtíšek, P. Hermann, *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, *216–217*, 287–312.