

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie

Studijní obor: Anorganická chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Filip Koucký

Kontrastní látky pro zobrazování pomocí heteronukleární
magnetické resonance

Contrast agents for heteronuclear magnetic resonance imaging

Vedoucí práce:

Doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2018

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, dne. 15. 5. 2018

Filip Koucký

Abstrakt

Během práce byla studována pH závislost koordinačních módů lanthanoidových komplexů s makrocyclickými ligandy založenými na skeletu 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu se třemi acetátovými a jednou aminoethylovou skupinou s *N*-alkyl-*N*-methylfosfonátovým substituentem, DO3AN(R)P, kde R je alkylový substituent na atomu dusíku aminoethylového pendantního ramene (R = methyl, benzyl).

Komplexy lanthanoidů dříve studovaného prototypového ligandu DO3ANP se sekundární aminoskupinou (R = H) vykázaly díky různým koordinačním možnostem zajímavé vlastnosti z hlediska ^{31}P NMR zobrazování, umožňující *in situ* měření pH. Dané komplexy jsou použitelné i z hlediska sledování kinetiky chemické výměny protonu aminové skupiny v ^1H NMR zobrazování pomocí přenosu saturace při chemické výměně (chemical exchange saturation transfer, CEST NMR). V rámci této práce byly pro lepší porozumění změny koordinačních módů této třídy ligandů připraveny nové deriváty DO3ANMeP a DO3ANBnP a bylo studováno jejich koordinační chování vůči vybraným iontům lanthanoidů (Eu^{3+} , Gd^{3+} , Dy^{3+} , Yb^{3+}).

Na základě NMR a luminiscenčních experimentů bylo zjištěno, že v kyselém prostředí dochází u komplexů s DO3ANP ke koordinaci molekuly vody, která je v bazickém prostředí vytlačena změnou koordinace pendantního ramena, která je ve ^{31}P NMR spektru doprovázena významnou změnou chemického posunu. Pro deriváty s terciárním aminem na pendantním rameni nebyl tento jev pozorován nikde na škále pH mezi 2 a 10.

Druhotným úkolem této práce byla optimalizace obecné syntézy ligandů DO3AN(R)P zavedením vhodně substituované aminoethylové skupiny do skeletu 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny (DO3A). Zvláštní pozornost byla věnována derivátu nesoucímu 2,2,2-trifluorethylovou skupinu, který by byl potenciálně použitelný i pro zobrazování pomocí ^{19}F NMR. Byly testovány různé metody zavádění trifluorethylové skupiny. Zvolený syntetický prekurzor byl připraven redukcí příslušného trifluoroacetamidu – byly testovány různé podmínky redukce pomocí LiAlH_4 a BH_3 (včetně různých typů generování BH_3 *in situ*).

Klíčová slova:

tomografie magnetické rezonance, makrocyclické ligandy, lanthanoidy, ^1H MRI, ^{31}P MRI, ^{19}F MRI

Abstract

In this thesis the pH dependency of the coordination modes of lanthanide complexes with macrocyclic ligands based on 1,4,7,10-tetraazacyclododecane skeleton was studied. The cyclen-based ligand structures in this work contained three acetate and one aminoethyl group with a *N*-alkyl-*N*-methylphosphonate substituent, DO3AN(R)P, where R is an alkyl substituent on the nitrogen atom of the pendant arm (R = methyl, benzyl).

Lanthanide complexes of a previously studied prototype ligand DO3ANP with secondary amino group (R = H) have shown interesting properties in the field of ^{31}P NMR imaging because of their various coordination properties, which allow *in situ* pH measurement. These complexes can also be used for monitoring the kinetics of the chemical exchange of the amino group proton in ^1H NMR imaging using the chemical exchange saturation transfer (CEST NMR). In this thesis, two new derivatives DO3ANMeP and DO3ANBnP were prepared in order to better understand the coordination modes changes in this ligand series. Also, their coordination behaviour with selected lanthanide ions was studied (Eu^{3+} , Gd^{3+} , Dy^{3+} , Yb^{3+}).

Based on a series of NMR and luminescence measurements, it was found out, that in acidic conditions the complexes containing DO3ANP motif bind a water molecule in their coordination sphere. However, in basic conditions, the water molecule coordination site is occupied by the coordinated pendant arm instead. This causes a significant change in the ^{31}P NMR chemical shift. For the derivatives containing tertiary amine on the pendant arm this effect was not observed anywhere on the pH scale between 2 and 10.

The second aim of this thesis was optimization of the general synthetic pathway leading to DO3AN(R)P ligands. In general, these ligands were obtained by introducing a properly substituted aminoethyl group to the 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid (DO3A) skeleton. A special attention was paid to the derivative carrying a 2,2,2-trifluoroethyl group, which could potentially be used also for ^{19}F NMR imaging. Various methods for introducing the trifluoroethyl group were tested. The chosen synthetic precursor was prepared by a reduction of the corresponding trifluoroacetamide by several different routes using LiAlH_4 and BH_3 as reducing agents (including various reactions using *in situ* generated BH_3).

Key words:

magnetic resonance imaging, macrocyclic ligands, lanthanoides, ^1H MRI, ^{31}P MRI, ^{19}F MRI

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval všem lidem, kteří mi za poslední dva roky pomáhali. V první řadě bych rád poděkoval lidem, kteří přispěli svou trochou do mlýna. Mezi tyto lidi patří například. Petr Hermann, Vojtěch Kubiček, nebo Peter Urbanovský a zahraniční kolegové, které jsem mohl díky této práci poznat.

Dále bych chtěl poděkovat lidem, kteří svou „černou“ prací pomáhají laborce, aby zůstala v chodu... Ondro, Kubo, Díky.

Dalším člověkem, kterému bych rád poděkoval, je oponent mé práce, za to, že se svolil a bude věnovat svůj čas mému dílu.

Vedle odborné pomoci je tu i ta důležitější, podpora psychického zdraví a pohody. Za tím stojí všichni milí lidé, kteří se kolem mě kupí, a není jich zrovna málo. Milí rodiče, díky Vám za všechno, za psychickou podporu i za podporu celkovou, bez které by mé studium nebylo možné. Milá Nejko, děkuji za to, že jsi a máš se mnou svatou trpělivost. Milá Míšo, tvoje kafe je opravdu kafe opravdových znalců a bez tvé přítomnosti a tvého humoru by to v laborce snad ani nešlo přežít.

Chtěl bych poděkovat i zbylým členům laboratoře 313 a devatenáctky – nabijíte mě energii, děkuji Vám. Také bych rád poděkoval dvěma bývalým členům naší skupiny a to Terce Krchové a Honzovi Blahutovi, jelikož se jedná o lidi, kteří snad nikdy nemají špatnou náladu a tu dobrou se snaží šířit.

V neposlední řadě bych rád poděkoval mému školiteli Janu Kotkovi, který mě v posledních 5ti letech formoval na poli profesním, ale i na poli osobnostním. Musím u něj ocenit jeho až samurajskou oddanost práci a výdrž. Nedokážu si představit, že by jiný školitel byl takhle ochotný a v případě nouze i extrémně výkonný. Děkuju Ti, Honzo.

Omlouvám se lidem, které jsem nezmínil, ale sami víte, že jsem vám vděčný.

Obsah

Abstrakt	3
Abstract.....	4
Poděkování	5
Obsah	6
Úvod	8
Základní principy zobrazovacích metod	8
Porovnání zobrazovacích metod	14
Látky pro heteronukleární MRI	16
Fyzikální metody používané pro studium a charakterizaci kontrastních látek pro MRI ..	19
Jednodimenzionální NMR spektroskopie	19
NMR pH titrace	20
Evansova metoda stanovení koncentrace – Bulk Magnetic Susceptibility[32]	20
Dysprosiem indukovaný chemický posun (DIS)	21
Relaxační disperse (^1H NMRD) Gd^{3+} komplexů	22
Longitudinální relaxace NMR signálů Ln^{3+} komplexů	22
Luminiscenční spektroskopie Ln^{3+} komplexů	23
Cíle práce	25
Experimentální část	26
Zavádění alkylových substituentů na jednoduché aminy	26
Příprava <i>N</i> -benzylaminoethanolu	26
Příprava <i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -methylaminoethanolu	27
Příprava <i>N</i> -trifluoracetylaminomethanolu	27
Příprava <i>N</i> -(2,2,2-trifluorethyl)aminoethanolu	28
Příprava <i>N</i> -trifluoracetylbenzylaminu	30
Příprava <i>N</i> -(2,2,2-trifluorethyl)benzylaminu	30
Zavádění fosforových skupin na aminoethanolové deriváty	31
Příprava diethyl <i>N</i> -(2-hydroxy)ethyl- <i>N</i> -methyl-aminomethylfosfonátu	31
Příprava diethyl <i>N</i> -(2-hydroxy)ethyl- <i>N</i> -benzyl-aminomethylfosfonátu	32
Příprava acylovými skupinami chráněných aminoethanolů	33
Příprava <i>N</i> -ethoxykarbonyl- <i>N</i> -methylaminoethanolu	33
Příprava <i>N</i> -benzyloxykarbonyl- <i>N</i> -methylaminoethanolu	33
Příprava <i>N</i> - <i>t</i> butyloxykarbonyl- <i>N</i> -methylaminoethanolu	34
Příprava alkylačních činidel ze substituovaných aminoethanolů	34
Příprava <i>N</i> - <i>t</i> butyloxykarbonyl- <i>N</i> -methylaminoethyl mesylátu	34

Příprava diethyl <i>N</i> -(2-methylsulfonyloxy)ethyl- <i>N</i> -methyl-aminomethylfosfonátu	34
Příprava diethyl <i>N</i> -(2- <i>p</i> -toluensulfonyloxy)ethyl- <i>N</i> -methyl-aminomethylfosfonátu...	35
Příprava <i>N</i> -ethyloxykarbonyl- <i>N</i> -methylaminoethyl mesylátu	36
Příprava 2-[<i>N</i> -(Ethyloxykarbonyl)- <i>N</i> -methylamino]bromethanu	36
Příprava makrocyclických ligandů	37
Příprava DO3ANN	37
Příprava DO3ANMeP	37
Příprava DO3ANP	40
Příprava komplexů	40
Seznam použitých přístrojů	42
Měření NMR experimentů	43
Relaxivní měření ¹ H NMRD	43
¹⁷ O NMR DIS	43
Další ¹⁷ O experimenty	44
<i>T</i> ₁ ¹⁷ O NMR experimenty	44
¹ H relaxivní pH NMR titrace	44
NMR pH titrace	45
Luminiscenční měření	45
Výsledky a diskuse	47
NMR studium	51
Relaxivita GdDO3ANP	51
¹⁷ O DIS DyDO3ANP	53
Teplotní závislost ¹⁷ O NMR GdDO3ANP	54
pH NMR titrace ligandů DO3ANBnP a DO3ANMeP	56
³¹ P NMR YbDO3ANP	58
³¹ P NMR <i>T</i> ₁ relaxace EuDO3ANP	58
Luminiscenční měření EuDO3AN(R)P	59
Závěr	63
Použité zkratky	65
Zdroje	66
Apendixy	71

Úvod

Lidské zdraví bylo odpradáвна významnou oblastí zájmu lidského snažení. K medicíně neodmyslitelně patří i chemie, která poskytuje řešení mnoha problémů. První věc, která člověka napadne při spojení „chemie a medicína“, je zajisté produkce léků, které se používají při terapii. Další nedílnou součástí medicíny je však diagnostika, objevení problému, který je nutné řešit. Přístup lékaře k diagnostice může být různý. Jednou možností je použít informace viditelné pouhým okem na zevnějšku pacienta. Pokud se však nějaký problém vyskytuje uvnitř těla pacienta, přichází na řadu například operace, nebo využití neinvazivních zobrazovacích metod.

Zobrazovací metody se používají proto, aby zátěž byla pro pacienta co možná nejnížší. Zobrazovacích metod existuje celá řada a jsou založené na různých fyzikálně-chemických principech.

Základní principy zobrazovacích metod

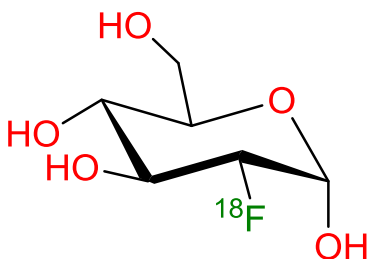
Z pohledu chemie se jeví jako nejzajímavější metody založené na ionizujícím záření, mezi které patří například CT (Computed Tomography, počítačová tomografie), SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography, gama-jednofotonová emisní tomografie) a PET (Positron Emission Tomography, pozitronová emisní tomografie), a metody založené na principu NMR (Nuclear Magnetic Resonance, jaderná magnetická resonance), mezi něž patří různé modifikace MRI (Magnetic Resonance Imaging, zobrazování magnetickou resonancí). Dalšími možnostmi jsou například OI (Optical Imaging) nebo ultrazvuková detekce, které však mají obvykle pouze specifická využití a neumožňují celotělové zobrazování.

Při transmisní metodě CT se získává pomocí Röntgenova záření (RTG) 3D obraz, který poskytuje dobrou představu o stavu skeletu, jelikož RTG záření je velice dobře pohlcováno kostmi. Pro zobrazování měkkých tkání však není vhodnou volbou, neboť RTG záření je natolik energetické, že měkkou tkání projde bez významné absorpce. Výsledný kontrast je proto velice slabý.

Metoda SPECT je založena na prostorové detekci vyzářených γ fotonů ze zdroje, který je distribuován v pacientovi. Tento zdroj bývá často radiofarmakum založené na ^{99m}Tc . [1] Dalšími významnými používanými radioizotopy jsou např. ^{64}Cu , ^{67}Ga a ^{82}Rb . [2][3] Výsledný 3D obraz a lokalizace radiofarmaka jsou získány pomocí výpočetní techniky. Vstupními daty jsou poloha a úhel příslušných detektorů γ fotonů. Vzhledem k tomu, že

v ideálním případě je získáván pouze signál z místa cílené distribuce radioaktivní kontrastní látky, bývá často metoda SPECT kombinována s CT, aby byl lépe lokalizován zdroj záření v kontextu anatomie celého organismu.

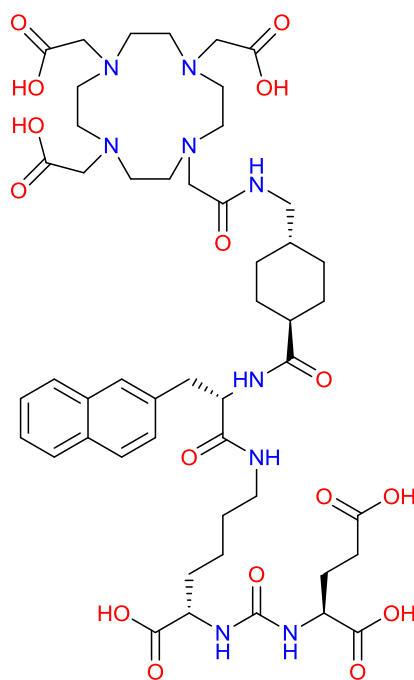
V případě metody **PET** dochází k detekci dvou kolineárních fotonů o energii 511 keV, které vznikly anihilací emitovaného pozitronu s elektronem tkáně. Detekce dvou fotonů, jejichž trajektorie je na stejné přímce a čas dopadu na detektor je shodný, umožňuje přesnější zjištění polohy zdroje záření v prostoru. Značnou nevýhodou této metody jsou radiofarmaka, která musí být emitory pozitronů, a dané nuklidy se často připravují pomocí netriviálně dostupného cyklotronu. V dnešní době je k 90 % vyšetření používána 2-deoxy-2(¹⁸F)fluor-D-glukóza (FDG), viz *Obrázek 1*. FDG je distribuována v těle stejně jako glukóza a je přednostně vychytávána buňkami s vysokou spotřebou glukózy, jako jsou například nádorové buňky. Molekula FDG však nelze metabolizovat, a proto se v dané tkáni hromadí. Syntéza této látky je poměrně jednoduchá, avšak poločas rozpadu radionuklidu ¹⁸F je pouze cca 110 minut.[4] Kvůli krátkému poločasu rozpadu je nutné zajistit produkci PET radiofarmaka v relativní blízkosti od zdravotnického centra provozujícího PET zobrazování. V rámci ČR zajišťuje 90 % dodávek FDG Ústav jaderného výzkumu Řež.[5]



Obrázek 1 Strukturní vzorec 2-deoxy-2(¹⁸F)fluor-D-glukózy (FDG).

FDG je v rámci PET zobrazování velice populární a levná kontrastní látka, avšak jedná se o značně nespecifickou látku (kromě nádorových buněk je vychytávána ve všech metabolicky aktivních buňkách). V současné době proto probíhá ve vyspělých zemích v řadě výzkumných týmů intenzivní výzkum se zaměřením na biologickou specifitu. Jako jeden vybraný příklad z poslední doby lze pro ilustraci uvést například velmi úspěšný ligand PSMA-617¹ (*Obrázek 2*), který je používán pro komplexaci radioizotopů ⁶⁸Ga a ¹⁷⁷Lu. V případě gallitého komplexu byla pozorována vysoká specifita k rakovinové tkáni prostaty.[6]

¹ Prostate-specific membrane antigen



Obrázek 2 Strukturní vzorec látky PSMA-617[6]

V rámci výzkumu v oblasti PET/SPECT kontrastních látek je v současné době trendem využívání komplexace kovů, které jsou zdrojem záření, podobně jako je výše zmíněno pro použití gallitého komplexu látky PSMA-617. Velkou výhodou koordinační chemie je umožnění navázání radioaktivního nuklidu až v posledním kroku syntézy, tj. těsně před aplikací. Komplexační reakce jsou totiž poměrně obecné a probíhají relativně rychle. Oproti tomu syntéza většiny organických molekul a kovalentní zabudovávání nekovových nuklidů do skeletu léčiva je časově náročnější, než komplexace kovových zářičů, což v případě nekovových PET/SPECT zářičů snižuje potenciální radiochemický výtěžek.

Zobrazování pomocí magnetické resonance **MRI** vychází z principu nukleární magnetické resonance (NMR), jež je hojně používána jako analytická metoda pro studium látek obsahující NMR aktivní jádra. Přehled vybraných izotopů měřitelných pomocí NMR spektroskopie je uveden v *Tabulka 1*. [7] Bohužel, běžné nuklidy uhlíku a kyslíku (^{12}C a ^{16}O) vyskytující se v organických sloučeninách mají nulový jaderný spin a nejsou tudíž měřitelné pomocí NMR spektroskopie. V případě uhlíku lze použít nuklid ^{13}C , který je v přírodním uhlíku zastoupen z cca 1 %, v případě kyslíku lze měřit spektra nuklidu ^{17}O .

Tabulka 1 Přehled NMR aktivních jader [7]

Izotop	Spin jádra	Přírodní zastoupení / %	Gyromagnetický poměr γ / $10^6 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$	NMR frekvence při 11,74 T ($\omega_0/2\pi$) / MHz
^1H	$\frac{1}{2}$	~ 100	267,522	-500,000
^2H	1	0,015	41,066	-76,753
^3H	$\frac{1}{2}$	~ 0	285,349	-533,320
^{13}C	$\frac{1}{2}$	1,1	67,283	-125,725
^{14}N	1	99,6	19,338	-36,132
^{15}N	$\frac{1}{2}$	0,37	-27,126	+50,684
^{17}O	$5/2$	0.04	-36.281	+67.782
^{19}F	$\frac{1}{2}$	~ 100	251,815	-470,470
^{31}P	$\frac{1}{2}$	~ 100	108,394	-202,606

Mezi nejběžněji měřená jádra patří ^1H , ^{13}C , ^{19}F a ^{31}P . Všechna tato jádra mají jaderný spin $\frac{1}{2}$. Pokud se NMR aktivní jádra nenachází ve vnějším magnetickém poli, jejich různé jaderně-spinové stavy jsou degenerovány (tj. mají stejnou energii). Pokud však vložíme NMR aktivní vzorek do vnějšího magnetického pole, dochází k Zeemanovu rozštěpení energetických hladin. V případě jader se spinem $\frac{1}{2}$ získáváme dvě různé energetické hladiny. Jedna hladina odpovídá paralelnímu směřování spinu a magnetického pole, druhá, energeticky vyšší hladina, odpovídá antiparalelnímu uspořádání.

Při ozáření vzorku radiofrekvenčním pulsem o vhodné vlnové délce dochází ke splnění rezonanční podmínky a excitaci jaderného spinu do vyšší energetické hladiny. Tato vlnová délka/frekvence je označována za Larmorovu frekvenci. Excitované jaderné spiny vytváří makroskopickou magnetizaci, jejíž vývoj v čase jsme schopni sledovat pomocí kvadraturní detekce. Vektor magnetizace procházející skrze cívky indukuje elektrický proud a tím je získána závislost indukovaného proudu na čase, tzv. FID (Free Induction Decay). Tento záznam je následně matematicky zpracován a převeden z časové domény do frekvenční škály, kde každá frekvence odpovídá (chemicky) jinému jádru daného nuklidu. Výsledná hodnota frekvence odpovídá elektronovému stínění daného jádra, které je dáno jeho

chemickým okolím. Pro lepší práci s těmito údaji je frekvence přepočítávána na tzv. chemický posun δ (udávaný obvykle v jednotkách ppm):

$$\delta = \frac{\nu_v}{\nu_0} \cdot 10^6, \quad (1)$$

kde ν_v je Larmorova frekvence konkrétního jádra v Hz, ν_0 je Larmorova frekvence standardu (např. pro ^1H tetramethylsilan, pro ^{31}P H_3PO_4 atd.), která se taktéž udává v Hz. Larmorova frekvence je závislá na síle magnetického pole B a gyromagnetickém poměru γ podle rovnice:

$$\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B, \quad (2)$$

V případě MRI se používají gradienty magnetického pole, které zapříčiní, že sledovaná látka (jádro) má v různých místech v prostoru (voxelech, voxel = 3D pixel) různou frekvenci, což umožňuje následnou rekonstrukci obrazu a určení pozice signálu v prostoru. U protonového MRI je nejčastěji sledován ^1H NMR signál vody, který je díky vysoké koncentraci vody v lidském těle (zhruba 70 %) dominantní a značně intenzivní.

Při zobrazování vody v lidském těle je primárně zjišťována rozdílná koncentrace vody v měkkých tkáních. K zobrazování lze využít i různých relaxačních rychlostí (tj. rychlostí, se kterými se excitovaná jádra relaxují do základního stavu). Tyto rychlosti jsou charakterizovány tzv. relaxačními časy T_1 a T_2 . V případě času T_1 se jedná o relaxaci magnetizace ve směru vnějšího magnetického pole, u T_2 je to pak relaxace v rovině kolmé na magnetické pole. Rozdílná koncentrace a rozdílné relaxační časy poskytují kontrast, který např. umožňuje znázornit rozdíl mezi zdravou a patologickou částí tkáně stejného typu.

Pro lepší kontrast se může využít kombinace kontrastních látek a/nebo speciálních pulsních sekvencí. Jednou z často používaných metod je Fat-Supression MRI, která zapadá do skupiny pulsních sekvencí typu „chemical shift selective saturation“ (CHESS).[8] Tato metoda je kombinovaná s klasickým zobrazováním signálu vody. Na základě selektivního ozařování signálu CH_2 skupin mastných kyselin tuků dochází k potlačení signálu tukové tkáně, tzv. presaturaci. Tento selektivní puls je použit těsně před začátkem pulsní sekvence pro samotné MRI.

Pro zvýšení kontrastu bývá často podávána do těla pacienta tzv. kontrastní látka. Většina ^1H kontrastních látek má za úkol zrychlit relaxační časy protonů vody v okolních tkáních. Kontrastní látky zkracují oba relaxační časy T_1 i T_2 . Pakliže kontrastní látka zkracuje významněji T_1 relaxační čas, tak dochází při volbě vhodné pulsní sekvence k pozitivnímu kontrastu (tkáň s kontrastní látkou je světlejší, neboť dochází k nasčítání signálu při rychlých opakováních excitačních pulsů pouze v místech, kde měřený signál stíhá dostatečně

relaxovat). Oproti tomu, v případě zkrácení T_2 (a s použitím vhodné pulsní sekvence) je kontrast negativní (patřičná tkáň je v MRI obraze tmavší).

Již v roce 1948 skupina Felixe Blocha publikovala pozorování, že přítomnost paramagnetického $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ve vzorku významně zvyšuje relaxivitu vody (relaxivita je převrácená hodnota T_1 roztoku kontrastní látky o koncentraci 1 mM).[9] Zhruba o 30 let později byla použita manganatá sůl pro první rozlišení tkáně na základě rozdílných T_1 relaxačních časů.[10] V současné době se ke zvýšení ^1H relaxivity vody v klinické praxi používají takřka výhradně látky založené na komplexech paramagnetického iontu Gd^{3+} , které mají ve své koordinační sféře jednu molekulu vody. Díky chemické výměně této koordinované molekuly vody s molekulami vody v okolí je dosaženo rychlejší relaxace signálu ^1H a umožněno rychlejší opakování pulsů, vedoucí k pozitivnímu kontrastu.

V případě T_2 kontrastních látek jsou používány látky typu Super Paramagnetic Iron Oxides (SPIO). Tyto nanočástice oxidů železa o velikosti 30–200 nm byly dříve produkovány pod komerčními názvy Feridex, Endorem, Resovist atd. Tyto látky byly vyvinuty např. pro zobrazování jater. SPIO látky však dnes nejsou vyvíjeny a vyráběny a jsou povoleny k použití pouze ve speciálních případech u dospělých pacientů.[11]

Další metodou pro získání negativního kontrastu je metoda využívající Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST), popřípadě ParaCEST (pokud je škála chemických posunů rozšířena díky přítomnosti paramagnetického iontu). CEST efekt (neboli přenos saturace chemickou výměnou) je metoda, pomocí které může být potlačen signál vody (negativní kontrast). Pokud selektivním pulsem ozařujeme funkční skupinu kontrastní látky, která je v chemické výměně s vodou (rozpouštědlem), dochází k její presaturaci (potlačení signálu).[12] Tento efekt je možné uplatnit pouze za předpokladu, že signál této funkční skupiny je dostatečně daleko od frekvence vody, a zároveň jsou protony z molekuly kontrastní látky vyměňovány s optimální rychlostí (pomaleji, než odpovídá rozdílu Larmorových frekvencí daných signálů a signálu vody, a zároveň rychleji, než dochází k relaxaci jejich signálů). Typickou funkční skupinou jsou například amidové, hydroxylové nebo aminové skupiny. V případě ParaCEST dochází k posunu ozařovaného signálu způsobenému přítomností paramagnetického iontu a k lepší separaci od signálu vody. V případě komplexů s ionty lanthanoidů může být signál vyměňovaného protonu posunut řádově o desítky ppm [13] (obvyklá škála chemických posunů je v ^1H NMR spektrech cca 10 ppm).

Porovnání zobrazovacích metod

U různých typů zobrazovacích metod můžeme porovnávat mnoho faktorů a jedním z těchto faktorů je například pořizovací cena měřicích zařízení.

I přes příchod dalších firem na pole producentů MRI scannerů je pořizovací cena MRI scanneru cca o 100 až 200 % vyšší, než je tomu v případě PET/CT scanneru, a v případě samotného CT je rozdíl i 300 až 400 %. Tyto rozdíly se týkají těch nejlevnějších variant a u výkonnějších zařízení se tento rozdíl ještě zvětšuje, což představuje pro MRI scannery značnou nevýhodu. Množství pracovišť využívající MRI však celosvětově roste a ceny těchto zařízení mírně klesají.[14]

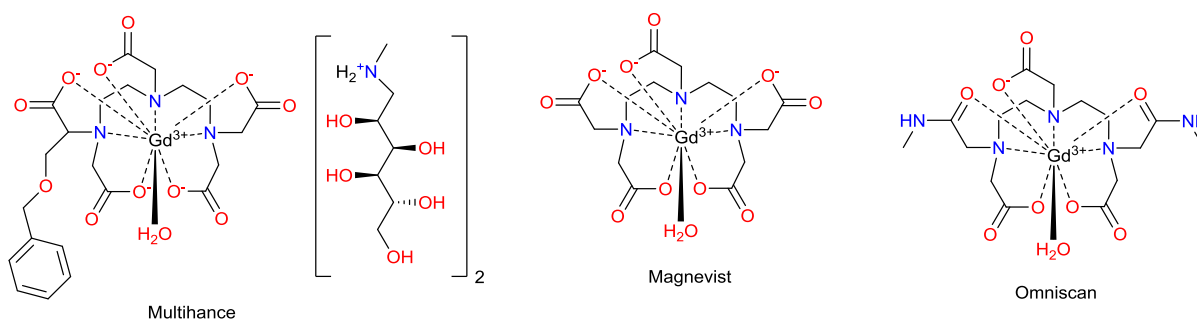
Pokud se podíváme na současné statistiky, tak je MRI již vcelku rozšířená metoda a počet scannerů MRI je již téměř poloviční ve srovnání s přístroji CT. Množství zařízení pro zobrazování může být jedním z faktorů vyspělosti a kvality života v jednotlivých státech. Špičkou v tomto ohledu je Japonsko, kde je hustota MRI scannerů zhruba 52 na 1 mil obyvatel (u CT pak 107 na 1 mil obyvatel. V porovnání s Japonskem je na tom ČR cirká 6,5krát hůře, jelikož na území ČR je pouze 8,3 MRI, respektive 16 CT, scannerů na 1 mil obyvatel.[15]

Dalším faktorem, který je nutné porovnat, je rozlišení dané metody. V případě CT není rozlišení měkkých tkání nikterak vysoké, jelikož RTG záření není měkkými tkáněmi prakticky pohlcováno. V případě zobrazování pomocí SPECT je rozlišení mezi 0,5–1,5 cm³, u metody PET se rozlišení dostává na úroveň 1–5 mm³. Rozlišení MRI záleží na mnoha faktorech, jako je například síla magnetického pole nebo typ použitého experimentu. Pro ilustraci – MRI tomograf pracující při intenzitě magnetického pole 3 T poskytuje v běžném experimentu při zobrazení krkavice výsledné rozlišení 0,1–0,25 mm³. [16]

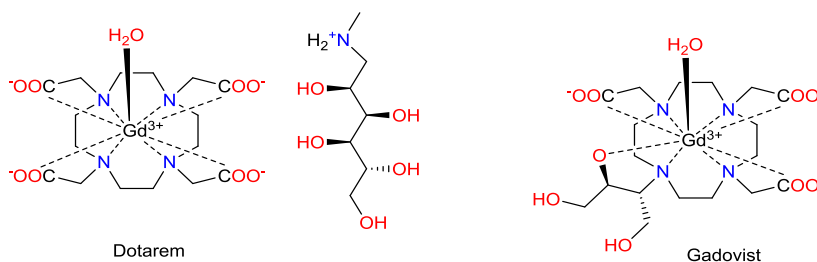
Velice významným bodem při výběru zobrazovací metody je také zátěž pro pacienta. U metod SPECT a PET se používají tak nízké koncentrace kontrastních látek, že se chemická toxicita prakticky neřeší, avšak velice sledovaná je hodnota radiace, která je do pacienta vpravena. V tomto ohledu je obecně největší a nejčastěji zmiňovanou výhodou MRI fakt, že se nejedná o zobrazovací metodu založenou na ionizujícím záření. V případě MRI lze provést vyšetření i bez použití kontrastní látky (tzv. nativní MRI). V případě nativního MRI je radiační i chemická toxicita principiálně nulová, avšak v dnešní době procento vyšetření s kontrastní látkou významně stoupá. Zdroje se značně rozcházejí v absolutní hodnotě, avšak v současné době se provádí až 40 až 70 % vyšetření s kontrastní látkou a je odhadováno, že už celosvětově proběhlo přes 400 mil. vyšetření s MRI kontrastní látkou. Vzhledem k nízké citlivosti NMR/MRI jsou ale koncentrace kontrastních látek pro MRI řádově vyšší, než je

tomu v případě metod založených na ionizujícím záření, což s sebou přináší problém případné chemické toxicity, která musí být pečlivě studována.

V roce 2017 vydal Státní ústav pro kontrolu léčiv informaci o omezení používání některých ^1H kontrastních látek obsahujících gadolinium. Tato zpráva vychází z přezkumu Evropské lékové agentury (EMA) a omezuje, nebo dokonce zakazuje, používání a registraci některých komplexních látek s lineárními polydentátními ligandy, jako jsou kupříkladu Multihance, Magnevist nebo Omniscan (Obrázek 3). V případě Multihance se jedná o výjimky, kdy tato kontrastní látka může být nadále používána pouze na zobrazování jater. Tato zpráva ponechává bez omezení kontrastní látky odvozené od makrocyclů, jako je například Dotarem či Gadovist (Obrázek 4). Obě tyto látky jsou odvozené od makrocyclu 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu, zvaného cyklen.[17]



Obrázek 3 Gd^{3+} komplexy s lineárními polydentátními ligandy



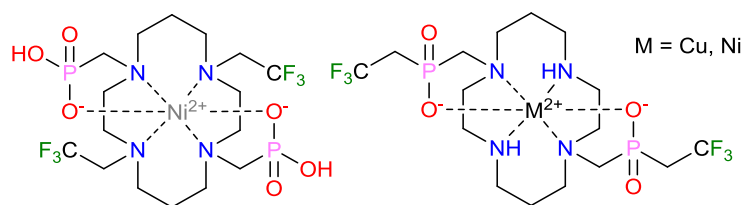
Obrázek 4 Gd^{3+} komplexy s makrocyclickými ligandy

Makrocyclický efekt zvyšuje kinetickou inertnost komplexů, proto jsou makrocyclické ligandy vhodnější pro komplexaci vysoce toxických iontů kovů, mezi které patří používaný ion Gd^{3+} (a ionty Ln^{3+} obecně).

Látky pro heteronukleární MRI

V rámci MRI lze využít i jiná NMR aktivní jádra, než je jenom ^1H . I přes nižší citlivost jsou velice zajímavá jádra ^{19}F a ^{31}P . U obou těchto prvků je zásadní výhodou jejich monoizotopičnost. V případě ^{19}F MRI se využívá označení „Hot Spot Imaging“ a nebo „Second Colour Imaging“, jelikož ^{19}F se v lidském organismu v měkkých tkáních nevyskytuje, a případný změřený signál tak pochází výhradně z molekuly kontrastní látky.[18] ^{19}F MRI je vhodnou metodou např. pro buněčné značení (tzv. „Cell Tracking“), kdy lze dlouhodobě sledovat například migraci transplantovaných buněk po těle. Příkladem oblastí, kde má Cell Tracking značné potenciální využití, je transplantace Langerhansových ostrůvků, které mohou být transplantovány i v rámci jednoho pacienta ze slinivky břišní, která se následně odstraní, do dobře vyživovaných částí těla – typicky do jaterního řečiště, kde i nadále produkují inzulin.[19]

Pro účely Cell Trackingu byly také studovány látky založené na paramagnetických iontech kovů. Bylo prokázáno, že i paramagnetické ionty *d*-kovů mohou výrazně snížit relaxační časy atomů ^{19}F . Jednou z publikovaných látek je komplex Ni^{2+} s trifluorethylovaným makrocyclickým ligandem – $\text{H}_4\text{te2p-tfe}_2$ (Obrázek 5 vlevo).[20] Ovlivnění relaxačních časů ^{19}F pomocí paramagnetických látek bylo pozorováno dříve i u látek založených na lanthanoidech.[21] Vliv paramagnetika na relaxaci fluorového signálu závisí na vzdálenosti fluorových atomů od centrálního atomu kovu, proto byla připravena i látka TfeP2CAM (Obrázek 5 vpravo), jenž má trifluorethylovou skupinu dále od paramagnetického iontu kovu. I v případě tohoto ligandu vykazovaly komplexy s Cu^{2+} a Ni^{2+} výrazné snížení relaxačních časů na úroveň jednotek ms (oproti volnému ligandu a běžným diamagnetickým molekulám obsahujícím atomy fluoru tak došlo ke snížení T_1 o 2–3 řády).[22]



Obrázek 5 Makrocyclické komplexy d kovů pro ^{19}F MRI [20][22]

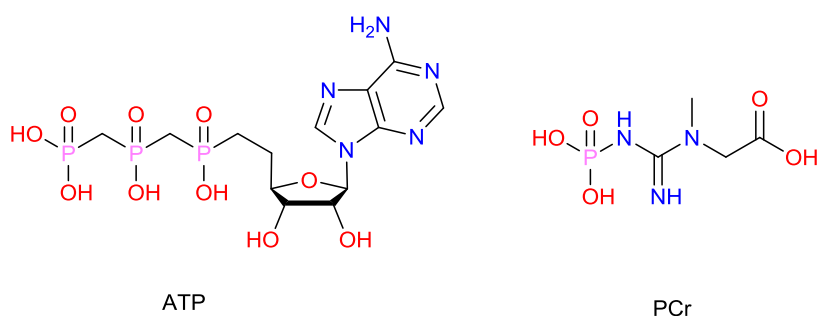
Při zobrazování pomocí ^{19}F MRI je ovšem nezbytné měření i ^1H pozadí a následný překryv obou obrazů, aby byl naměřený signál ^{19}F anatomicky lokalizován. Díky blízké hodnotě gyromagnetického poměru (Tabulka 1) je možné přeladit přístroje měřící signál ^1H i na

frekvenci nuklidu ^{19}F , a většina komerčních ^1H MRI tomografií díky tomu umožňuje po několika drobných úpravách i měření ^{19}F jader. Překryv $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ tomogramů tak nečiní žádný zásadní technický problém. Příklad takového překryvu je zobrazen na *Obrázek 6*. [23]



Obrázek 6 Překryv $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ tomogramů

Další MRI metodou bez aplikace kontrastní látky je vedle nativního ^1H MRI také zobrazování chemického posunu jader ^{31}P (Magnetic Resonance Spectroscopy Imaging, MRSI) které se řadí mezi tzv. CSI metody (Chemical Shift Imaging). Obdobně jako u vody v případě ^1H MRI lze selektivním pulsem zobrazit konkrétní látku. Pomocí MRSI lze zobrazit rozložení a koncentraci různých metabolitů v lidském těle, jako je například citrát. [24] V případě ^{31}P MRSI lze zobrazit různé látky obsahující ^{31}P , typicky adenosintrifosfát (ATP), anorganický (volný) fosfát (Pi), nebo fosfokreatin (PCr), viz *Obrázek 7*.



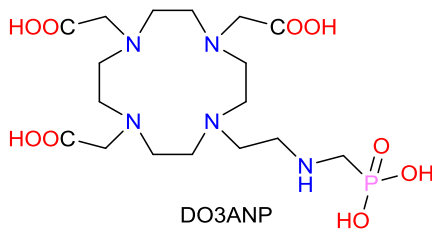
Obrázek 7 Příklady látek zobrazovaných pomocí ^{31}P MRSI

Metoda ^{31}P MRSI je využívána při výzkumu metabolických drah, kdy vedle koncentrace Pi , ATP a PCr je nepřímě sledováno i pH. [25] Jedním z výzkumů, při kterém bylo použito ^{31}P MRSI, bylo například mapování mitochondriální kapacity v lidském svalu během fyzické zátěže. [26] ^{31}P MRSI je také hojně využíváno v onkologii, jelikož nádorová tkáň

může být detekována na základě koncentrací výše zmíněných látek, nebo na základě hodnoty pH. Zde bývá používán chemický posun ρ_i k neinvazivnímu určení intracelulárního pH. U rakovinových buněk totiž bývá díky zvýšené metabolické aktivitě vedoucí v některých případech k anaerobnímu metabolismu hodnota intracelulárního pH vyšší, než je tomu v případě extracelulárního pH.[27]

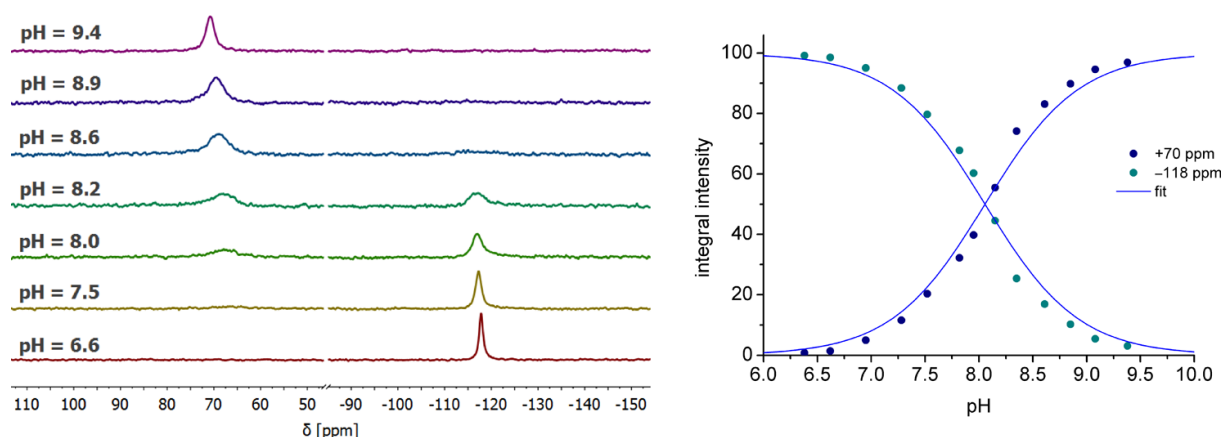
Z hlediska kontrastních látek je nejzajímavější značný rozdíl chemického posunu v závislosti na pH a potenciální využití těchto látek v ^{31}P CSI. Pro studium intra/extracelulárního pH červených krvinek byl použit methylfosfonát (MeP) jako kontrastní látka. MeP má pro tuto studii ideální vlastnosti, jelikož rozdíl chemických posunů u protonizované a deprotonizované formy je 4 ppm s $\text{p}K_{\text{A}} = 7,4$. [28]

Současným trendem na poli kontrastních látek je příprava tzv. „Smart Contrast Agents“, chytrých kontrastních látek, které mění své vlastnosti podle okolních podmínek (pH, koncentrace iontů kovů nebo různých metabolitů, teploty atd.) a mají potenciál být využity ve více zobrazovacích technikách najednou. V duchu Smart Contrast Agents byl navržen i ligand DO3ANP pro komplexaci Ln^{3+} iontů (Obrázek 8). Tato látka byla připravena pro studium efektu PARACEST a také jako ^{31}P CSI pH responsivní kontrastní látka.[29]



Obrázek 8 Ligand DO3ANP

U komplexu EuDO3ANP byl pozorován efekt, kdy dochází k přelévání integrální intenzity mezi dvěma ^{31}P NMR signály v závislosti na pH (a tedy na protonizačním stavu). Oba signály jsou od sebe značně separovány. Plně deprotonizovaný komplex (většinově zastoupený při $\text{pH} > 8$) má chemický posun ca +70 ppm, zatímco jednou protonizovaný komplex objevující se při nižším pH má chemický posun -118 ppm (Obrázek 9).



Obrázek 9 Znáznornění závislosti ^{31}P chemického posunu na pH pro látku EuDO3ANP [29]

Toto chování bylo vysvětleno odlišným typem koordinace v závislosti na pH. V kyselé oblasti je na Eu^{3+} patrně koordinována jedna molekula vody ve vnitřní sféře a aminoskupina není kvůli své protonizaci koordinována. Z celé pendantní skupiny je tak koordinován pouze kyslíkový atom fosfonátu, jak lze odvodit z extrémní hodnoty chemického posunu ve ^{31}P NMR spektru. V bazickém prostředí dochází k deprotonizaci aminoskupiny, k její koordinaci a tudíž k zaplnění koordinační sféry, kde při koordinačním čísle 9 obsazeném ligandem DO3ANP nezbyvá místo na koordinaci molekuly vody. Zároveň dochází k významné změně polohy atomu fosforu v rámci tenzoru magnetické anizotropie centrálního iontu europia, což má za následek extrémní změnu chemického posunu ve škále ^{31}P NMR.

Fyzikální metody používané pro studium a charakterizaci kontrastních látek pro MRI

V rámci studia strukturních a koordinačních vlastností je velice užitečnou metodou charakterizace RTG difrakce na monokrystalu. RTG difrakce však není schopna podat informaci o látce v roztoku a získání monokrystalu v případě látky, jejíž symetrie je nízká, může být značně komplikované. Pro studium struktur kontrastních látek (komplexů lanthanoidů) v roztoku je proto nutné použít několik metod, které samy o sobě neposkytují 100% důkaz potvrzující, jak se komplex v roztoku chová, avšak při kombinaci těchto nepřímých metod lze získat soubor poznatků, na jejichž základě lze určit strukturu molekul kontrastních látek (koordinační módy atd.).

Jednodimenzionální NMR spektroskopie

NMR spektroskopie je bezesporu nejdůležitější metodou studia kontrastních látek v roztoku. Oproti standardnímu použití k charakterizaci organických molekul má však v tomto případě

svá specifika. Díky přítomnosti paramagnetického iontu v molekule kontrastní látky jsou chemické posuny jader příslušejících koordinovanému ligandu obvykle značně posunuty. Relaxační časy T_1 a T_2 bývají typicky kratší, což v případě T_2 relaxačního času představuje významné rozšíření signálu, a může vést až k nemožnosti daný signál naměřit.

NMR pH titrace

V protických rozpouštědlech, jako je např. voda, se mohou některé funkční skupiny (de)protonizovat v závislosti na pH roztoku. Jelikož v případě protonizace funkčních skupin dochází ke změně elektronové hustoty v dané části molekuly, jsou chemické posuny blízkých NMR aktivních jader protonizací silně ovlivněny. Ze závislosti chemického posunu na pH můžeme určit atomy, na kterých dochází k protonizaci, a pK_A dané funkční skupiny. [30][31]

Kromě titrace sledující změnu chemického posunu vybraného signálu lze sledovat i změnu jeho relaxační rychlosti. Relaxivní pH NMR titrace pak nabízí další informace o možnostech koordinace v daném komplexu. Např. změna počtu koordinovaných molekul vody může být závislá na protonizačním stavu komplexní částice, a projeví se jako změna relaxační rychlosti (relaxivity) v závislosti na pH. Podobně jako v předchozím případě je výsledkem tohoto měření zjištění pK_A protonizovatelné funkční skupiny.

Evansova metoda stanovení koncentrace – Bulk Magnetic Susceptibility[32]

Pomocí tzv. metody BMS lze určit koncentraci komplexů paramagnetických iontů lanthanoidů. Jedním ze způsobů provedení měření BMS je porovnání chemických posunů inertní molekuly, která s molekulami kontrastní látky neinteraguje (nejčastěji tetramethylsilan, nebo *t*-butanol), v přítomnosti komplexu daného paramagnetického iontu lanthanoidu a v roztoku čistého rozpouštědla bez paramagnetické složky.

V praxi je tento experiment proveden pomocí NMR kyvety s paramagnetickým vzorkem, do níž je vložena koaxiální kyveta s menším průměrem (tzv. insert), ve které je umístěn „diamagnetický“ referenční vzorek (*t*-butanol). Po změření jednodimenzionálního ^1H NMR spektra je na základě rozdílů chemických posunů *t*-butanolu zjištěna koncentrace lanthanoidu ve vzorku. K výpočtu koncentrace paramagnetických iontů c se využívá následující aproximativní rovnice:

$$\Delta_X = \frac{4\pi CS}{T} \left(\frac{\mu_{eff}}{2,84} \right)^2 \times 10^3, \quad (3)$$

kde T je termodynamická teplota, Δ_x je rozdíl chemických posunů t -butanolu, S je konstanta závislá na tvaru vzorku, která v případě výše popsaného experimentu nabývá hodnoty $1/3$, a μ_{eff} je efektivní magnetický moment příslušného lanthanoidu. Díky minimálnímu vlivu ligandového pole na chování vnitřních f elektronů jsou hodnoty μ_{eff} pro daný ion lanthanoidu prakticky nezávislé na koordinačním okolí, velmi dobře odpovídají teoretické předpovědi pomocí hodnoty g_J -faktoru a v prvním přiblížení se tedy dají považovat za konstantní. Hodnoty μ_{eff} v Bohrových magnetonech pro jednotlivé ionty lanthanoidů jsou uvedeny v *Tabulka 2*.

Tabulka 2 Přehled teoretických a experimentálních hodnot efektivních magnetických momentů La^{3+} a Ln^{3+} [33][34]

M^{3+}	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd
$\mu_{\text{eff}}(\text{teor.})/\text{BM}$	0	2,54	3,58	3,68	2,83	0,85	0	7,94
$\mu_{\text{eff}}(\text{prakt.})/\text{BM}$	0	2,3–2,5	3,4–3,6	3,5–3,6	2,7	1,5–1,6	3,4–3,6	7,8–8,0
M^{3+}	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	
$\mu_{\text{eff}}(\text{teor.})/\text{BM}$	9,72	10,63	10,60	9,59	7,57	4,53	0	
$\mu_{\text{eff}}(\text{prakt.})/\text{BM}$	9,4–9,6	10,4–10,5	10,3–10,5	9,4–9,6	7,1–7,4	4,4–4,9	0	

Dysprosiem indukovaný chemický posun (DIS)

Pomocí metody DIS (Dysprosium Induced Shift) [35] lze získat informace o počtu koordinovaných vod q v komplexech Dy^{3+} . Tato komparativní metoda vyžaduje měření ^{17}O NMR spekter za účelem zjištění chemických posunů ^{17}O signálu vody. Díky rychlé chemické výměně koordinované molekuly vody s molekulami v okolí je ^{17}O NMR signál zprůměrovaný, a díky velkému kontaktnímu příspěvku k chemickému posunu je silně závislý na počtu koordinovaných molekul vody. Jak je uvedeno v *Tabulka 1*, přírodní zastoupení ^{17}O je pouhých 0,04 %, což vyžaduje vysoký počet naměřených scanů nebo přidavek izotopově obohaceného rozpouštědla. Pro výpočet počtu koordinovaných vod q je nutné znát směrnici k závislosti DIS na koncentraci Dy^{3+} :

$$\text{DIS} = \delta_{\text{DyL } 17\text{O}} - \delta_{\text{Aq } 17\text{O}} - \delta_{\text{BMS } 1\text{H}} \quad (4)$$

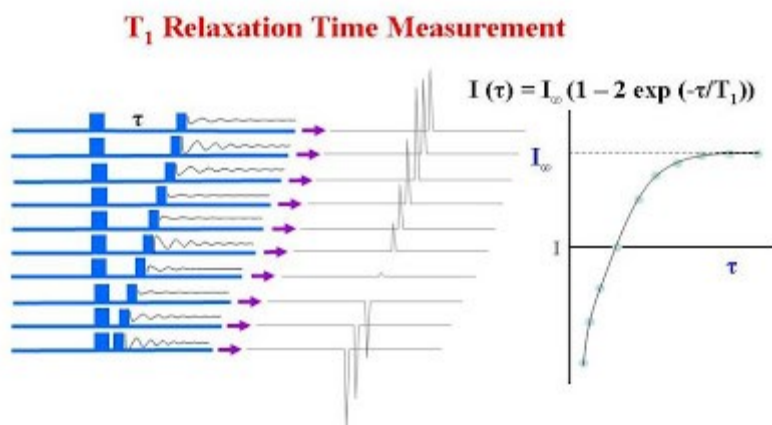
Výsledný počet koordinovaných vod se následně získá ze vztahu:

$$q_{\text{DyL}} = \frac{q_{\text{DyAq}} \cdot k_{\text{DyL}}}{k_{\text{DyAq}}}, \quad (5)$$

kde hodnoty k jsou směrnice závislosti DIS na koncentraci a q_{DyAq} je počet vod v aqua komplexu Dy^{3+} . Literatura se neshoduje v počtu hydrátových vod v aqua komplexu, proto se výpočty provádí pro hodnoty $q_{\text{DyAq}} = 8$ a 9 . [36][37]

Relaxační disperse (^1H NMRD) Gd^{3+} komplexů

Při měření záznamu ^1H NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) je zjišťována závislost relaxivity signálu ^1H molekul vody (r_1 , což je převrácená hodnota relaxačního času T_1 v roztoku kontrastní látky o koncentraci 1 mM) na hodnotě intenzity magnetického pole. Relaxační časy T_1 se získávají pomocí standardní pulsní sekvence Inversion Recovery, ve které je měněna prodleva mezi 180° pulsem a následným 90° pulsem, po kterém následuje akvizice (Obrázek 10). Pro tato měření se používají speciální relaxometry, které mají laditelnou hodnotu magnetického pole. Takzvané NMRD profily mohou při fitování pomocí setu rovnic ze Solomonovy-Blombergenovy-Morganovy teorie poskytnout řadu fyzikálně-chemických charakteristik (parametrů). Mezi nejvýznamnější veličiny patří např. počet koordinovaných vod q , rychlost jejich výměny s okolními molekulami k_{ex} (resp. průměrný rezidenční čas molekuly vody v koordinační sféře, τ_M), rychlost rotace molekuly (rotační korelační čas, τ_R), elektronová relaxace centrálního iontu Gd^{3+} a řada dalších.[38][39][37][40]



Obrázek 10 Schéma pulsní sekvence Inversion Recovery[41]

Longitudinální relaxace NMR signálů Ln^{3+} komplexů

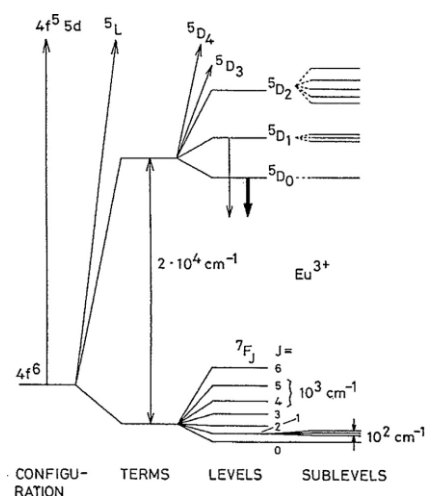
Přítomnost Ln^{3+} v komplexu neovlivňuje pouze chemický posun signálů NMR aktivních jader, ale ovlivňuje také jejich relaxační časy. Na základě relaxačních časů můžeme díky experimentálním rovnicím dopočítat vzdálenost mezi centrálním atomem a atomem v ligandu. Pro tato měření je používán například neodym, nebo gadolinium.[42][43] V případě ligandu obsahujícího pendantní rameno s fosfonátovou skupinou je výhodné sledovat relaxační čas signálu ^{31}P , jelikož oproti ^1H NMR bývá fosforových signálů ve

spektru zpravidla podstatně méně a případně jsou lépe rozlišené (mají významně jiný chemický posun).

Luminiscenční spektroskopie Ln^{3+} komplexů

Téměř všechny ionty Ln^{3+} vykazují luminiscenci. Z praktického hlediska se nejčastěji studuje luminiscence komplexů Eu^{3+} a Tb^{3+} – jednak oba tyto ionty vykazují silnou luminiscenci ve viditelné oblasti, a navíc se jedná o nejbližší sousedy gadolinia. Zjištěné vlastnosti tak lze aproximovat i pro ion Gd^{3+} , který je z hlediska MRI kontrastních látek zcela zásadní.

Samotné studium tvaru luminiscenčních spekter (excitačních i emisních) přináší možnost odhadu symetrie koordinačního okolí a případných změn koordinační geometrie v závislosti na vnějších vlivech. K tomuto účelu se nejlépe hodí studium spekter Eu^{3+} komplexů, a to hlavně díky dobře rozlišeným hypersenzitivním přechodům. Energetické štěpení různých spin-orbitálních stavů iontu Eu^{3+} je uvedeno na *Obrázek 11*.



Obrázek 11 Schématické znázornění štěpení elektronových stavů iontu Eu^{3+} díky mezielektronové repulzi, spin-orbitální interakci a ligandovému poli.[37]

Nejvýznamnějšími luminiscenčními přechody v případě Eu^{3+} komplexů jsou přechody $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ a $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$. Přechod $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ je povolený díky interakci magnetického dipólového momentu a ve spektru odpovídá emisním píkům v oblasti 580–600 nm. Z rozštěpení těchto píků lze přímo odečíst některé parametry síly ligandového pole. Přechod $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ je povolený díky interakci elektrického dipólu a je označován jako hypersenzitivní. Odpovídající signály leží zpravidla v rozmezí 610–620 nm. Pokud se mění mód koordinace a s ním také geometrie molekuly, můžeme pozorovat významné spektrální změny, a to jak

ve štěpení pásů, tak i v jejich intenzitě – méně symetrické ligandové okolí obecně vede k nárůstu intenzity hypersenzitivního přechodu, zatímco intenzita přechodu $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ zůstává konstantní. Kromě zmíněných přechodů jsou v emisních spektrech ve viditelné oblasti patrné též přechody $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ (580 nm), $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$ (650–660 nm) a $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ (680 – 710 nm). Přechod $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ je velice málo intenzivní, neboť je zakázaný Juddovým-Ofeltovým pravidlem,[45] avšak na luminiscenčních spektrometrech s vysokým rozlišením může být diagnostickým přechodem, jelikož díky nemožnosti degenerace je energie tohoto přechodu, potažmo vlnová délka emitovaného světla, specifická pro každou europium-obsahující komponentu ve studovaném systému. Této vlastnosti se však využívá hlavně při měření vysokorozlišených absorpčních spekter. Přechod $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$ je taktéž zakázaný, zatímco emise $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ je velmi intenzivní (a hypersenzitivní). Při změně spekter v závislosti na pH lze pak např. z poměru intenzit různých přechodů určit pomocí sigmoidálního proložení hodnoty pK_A . [44] Z hlediska kontrastních látek pro MRI je klíčovým parametrem též počet (přítomnost) koordinovaných molekul vody k centrálnímu iontu Gd^{3+} . S využitím europitých a terbitých komplexů lze tento parametr odhadnout na základě měření dob života excitovaných stavů luminoforu. Koordinovaná H_2O je efektivní zhášec (quencher), který snižuje dobu života (lifetime) excitovaného stavu díky přenosu energie excitovaného stavu kovu do vibrací O–H vazeb. Naopak D_2O je značně méně účinný zhášec. Na základě rozdílů dob života (resp. rychlostních konstant popisujících rychlost vyhasínání) lze pomocí empirických rovnic určit počet koordinovaných vod. Nejčastěji využívanou rovnicí odvozenou pro kontrastní látky a příbuzné koordinační sloučeniny je:

$$q = [(k_{H_2O} - k_{D_2O}) - 0,26] \cdot 1,2 \text{ (ref. [46])}, \quad (6)$$

kde q je počet molekul koordinované vody (hydratační číslo), k je převrácená hodnota doby života v ms, a ostatní hodnoty jsou experimentální konstanty, které jsou specifické pro ion Eu^{3+} a makrocyclické komplexy. Z provedené pH titrace lze určit q při jednotlivých hodnotach pH.

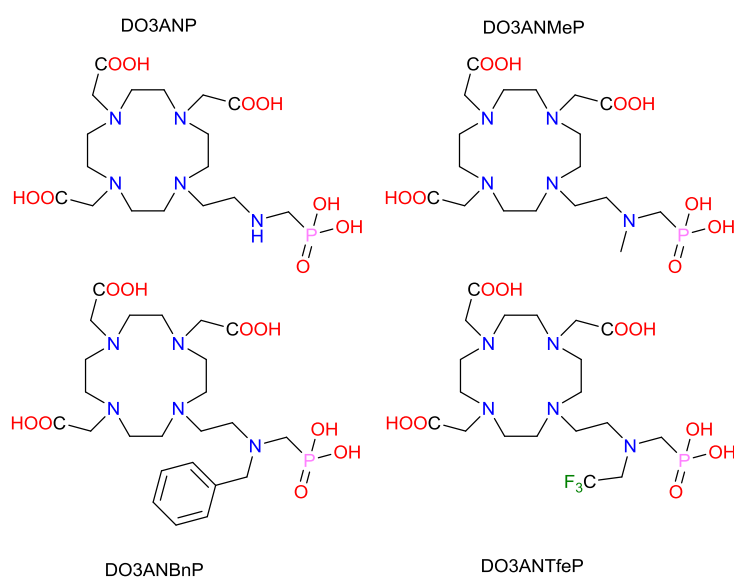
Vibrace N–H vazby, která je srovnatelně efektivní zhášec jako H_2O , [47] představuje značnou komplikaci při určování počtu koordinovaných molekul vody v případě, že se v molekule nachází sekundární, nebo primární amin.

Cíle práce

Předchozí studium komplexu EuDO3ANP [29] ukázalo velký potenciál této látky jako „smart agent“ pro zobrazování mapy pH pomocí ^{31}P MRI a pomocí CEST experimentu. Některé klíčové otázky o struktuře různě protonizovaných komplexních částic v roztoku však zůstaly nezodpovězeny. Jednou z podstatných informací je přítomnost/absence molekuly vody v koordinační sféře v závislosti na pH. Úkolem této práce je tedy na základě luminiscenčních, NMRD a dalších NMR měření určit případnou přítomnost molekuly koordinované vody u komplexů LnDO3ANP. Dalším cílem těchto měření bylo zjištění, jakým způsobem a s jakou geometrií se koordinuje pendantní rameno s amino-fosfonátovou skupinou DO3ANP.

Pro lepší porozumění principů koordinace u LnDO3ANP je zapotřebí připravit i modelové deriváty obsahující terciární aminovou skupinu, DO3ANRP.

V neposlední řadě si tato práce dává za úkol přípravu výchozích ligandů a jejich komplexů, popř. optimalizaci syntetických postupů vedoucích k přípravě studovaných ligandů ze série DO3ANRP, kde R = H, methyl (Me), benzyl (Bn) a trifluoroethyl (Tfe), viz *Obrázek 12*.



Obrázek 12 Cílové ligandy řady DO3AN(R)P

Experimentální část

V rámci syntetické části byly použity dva makrocyclické ligandy DO3ANP[29] a DO3ANN[48], které byly již dříve připraveny publikovanými syntetickými procedurami. Tyto makrocyclické prekurzory byly použity pro přípravu DO3ANMeP.

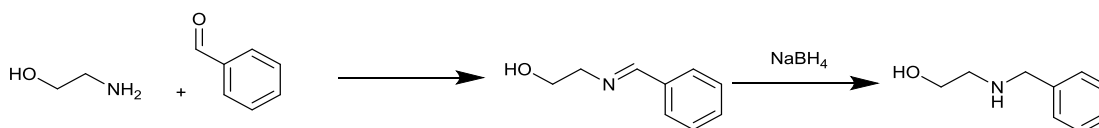
Dalším makrocyclickým prekurzorem je $t\text{Bu}_3\text{DO3A}\cdot\text{HBr}$, který vzhledem k ceně není komerční, ale který je v naší skupině pravidelně připravován optimalizovaným postupem, čistota produktu je ověřována pomocí ^1H NMR.

Ligandy DO3ANBnP a DO3ANP byly připraveny drobnou modifikací postupu popsánoho v literatuře [29] a v této práci byly učiněny pokusy o optimalizaci jejich syntézy.

Dále byly používány komerční chemikálie běžně dostupné od společností Fluka, Sigma Aldrich, Acros Organics, Lach:ner a TCI. Pokud je uvedeno, že reakce byla provedena v bezvodém rozpouštědle, tak bylo využito komerčně dodávaných rozpouštědel uchovávaných pod septem v lahvích obsahujících molekulová síta. V případě dichlormethanu byl použit komerční DCM, který byl dosušen přidávkem molekulových sít. Reakční směsi byly kontrolovány pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na chromatografických destičkách *TLC Silica gel 60 F₂₅₄* od společnosti Merck. Pro kontrolu syntetických postupů a čistoty připravovaných látek byl používán NMR spektrometr Varian 300 MHz s možností měření jader ^1H , ^{13}C , ^{19}F a ^{31}P .

Zavádění alkylových substituentů na jednoduché aminy

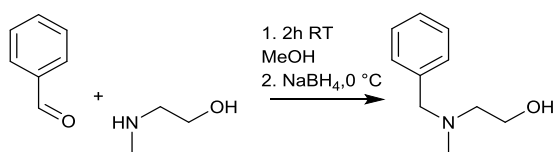
Příprava *N*-benzylaminoethanolu



Do 100ml baňky bylo naváženo 3,25 g (53 mmol) aminu, který byl rozpuštěn v 20 ml MeOH. K rozpuštěnému aminoethanolu byl přilít roztok 5,67 g (53 mmol) benzaldehydu v 30 ml MeOH. Směs aminu a aldehydu byla chlazena směsí voda/led/NaCl. Po 15 minutách teplota následovala redukce enaminu pomocí NaBH₄. Během 40 minut bylo po malých částech přidáno celkem 1,02 g (27 mmol) NaBH₄. Reakce byla následně vyjmuta z chladicí lázně a míchána po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. K reakční směsi bylo následně přilito 10 ml vody a směs byla zbavena MeOH pomocí RVO. K izolaci produktu byla použita extrakce mezi vodou a DCM. Organická fáze byla následně vysušena pomocí Na₂SO₄, zfiltrována na fritě S1 a odpařena pomocí RVO. Byl získán produkt v podobě bezbarvého oleje o hmotnosti 7,6 g, což představuje 95% výtěžek.

NMR spektra jsou ve shodě s daty z databáze scifinder.cas.org pro látku CAS 104-63-2.

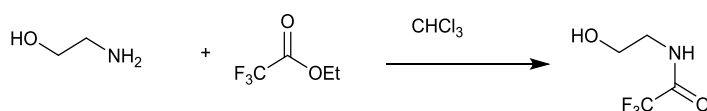
Příprava *N*-benzyl-*N*-methylaminoethanolu



Do 100ml baňky opatřené míchadlem bylo naváženo 3,02 g (40 mmol) *N*-methylaminoethanolu, který byl následně rozpuštěn ve 40 ml MeOH. K rozpuštěnému *N*-methylaminoethanolu bylo přidáno 4,66 g (43 mmol) benzaldehydu. Reakce byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin, poté byla reakční směs vychlazena ledovou lázní a následně bylo do reakční směsi přidáno po malých částech 0,84 g (22 mmol) NaBH₄. NaBH₄ byl přidáván 30 minut, aby nedocházelo k přílišnému kypění směsi a případnému přehřívání. Po přidavku NaBH₄ byla reakční směs ještě hodinu míchána při laboratorní teplotě. Ukončení reakce bylo provedeno přidavkem 10 ml vody a odpařením MeOH pomocí RVO při 65 °C. Výsledný vodný roztok zbavený metanolu byl 3× extrahován v systému 6M HCl/DCM. U vodné fáze bylo pomocí 5% NaOH zvýšeno pH na hodnotu okolo 9. Tato bazická vodná fáze byla opět 3× extrahována pomocí DCM. Organická fáze byla vysušena pomocí Na₂SO₄, zfiltrována na fritě S3 a odpařena na RVO. Výsledkem reakce bylo 5,2 g bezbarvého oleje, což představuje 78% výtěžek.

NMR spektra jsou ve shodě s daty z databáze scifinder.cas.org pro látku CAS 101-98-4.

Příprava *N*-trifluoracetylaminomethanolu

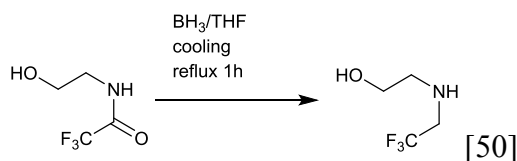


Do 100ml baňky bylo naváženo 5,08 g (83 mmol) aminoethanolu, který byl rozpuštěn ve 20 ml CHCl₃. Roztok byl ochlazen v ledové lázni. Následně bylo přidáno 13,3 g (94 mmol) ethyl trifluoracetátu. Reakce byla míchána přes noc. Reakční směs byla odpařena pomocí RVO a odparek byl přefiltrován přes silikagel elucí EtOAc.[49] Organická fáze byla sušena na Na₂SO₄, sušidlo bylo odfiltrováno na fritě S2 a EtOAc byl odpařen při 60 °C pomocí RVO. Byl získán čirý olej, který následně ztuhl na bílou pevnou látku. Bylo získáno 10,3 g čistého produktu, což představuje 79% výtěžek.

NMR spektra jsou ve shodě s publikovanou charakterizací.[49]

Příprava *N*-(2,2,2-trifluorethyl)aminoethanolu

Metoda A: Redukce *N*-trifluoracetylamin ethanolu pomocí $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$



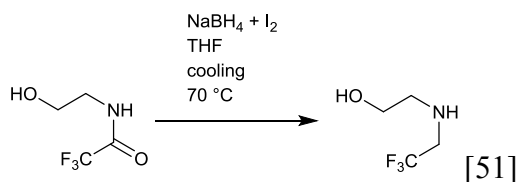
Reakce byla prováděna v trojhrdlé baňce opatřené magnetickým míchadlem, přívodem argonu, chladičem, bublačkou s nujolem a chlazenou bublačkou se směsí 5% NaOH a 10% H_2O_2 . Do vysekurované aparatury bylo skrze septum injektováno 15 ml (15 mmol) 1M BH_3 v THF. Aparatura byla chlazená ve vodní lázni s ledem. Za chlazení byl pomocí injekční stříkačky přidán roztok 0,23 g (1,5 mmol) amidu v 5 ml THF. Reakce byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 18 hodin. Reakce byla ukončena přidavkem vodné 6M HCl (objem). Přídavek HCl byl zprvu velice pozvolný. Po prvních kapkách reakční směs silně pěnila. Reakční směs byla odpařena za vzniku bílého odparku. Podle NMR v D_2O reakce proběhla za vzniku trifluorethylamino derivátu.

^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 3.85 (q, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.73 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.19 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H). ^{19}F NMR (282 MHz, D_2O) δ -68.40 (t, $J = 8.9$ Hz)

^1H i ^{19}F spektra vykazovala 100% čistotu. Bílý odparek byl následně extrahován mezi 5% vodný NaOH a DCM pro odstranění přebytečné kyseliny borité. Organická fáze byla vysušena pomocí bezvodého Na_2SO_4 , který byl odfiltrován, roztok produktu v DCM byl odpařen při 40 °C pomocí RVO. Odparek obsahující produkt byl následně použit pro další reakci Mannichova typu.

Reakce proběhla a látka byla charakterizována, avšak výtěžek reakce nebyl zjištěn.

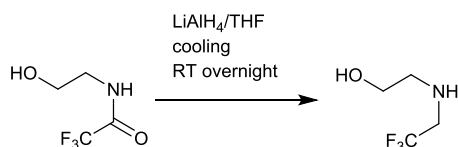
Metoda B: Redukce *N*-trifluoracetylamin ethanolu pomocí BH_3 generovaného *in situ*



Reakce byla prováděna v trojhrdlé baňce opatřené magnetickým míchadlem, přívodem argonu, chladičem, bublačkou s nujolem a chlazenou bublačkou se směsí 5% NaOH a 10% H_2O_2 . Do trojhrdlé baňky bylo před sekurací naváženo 1,1 g (7,0 mmol) výchozího amidu a 0,8g (21 mmol) NaBH_4 . Po sekuraci bylo injekční stříkačkou přidáno 70 ml suchého THF a amid byl rozpuštěn. Do přikapávací nálevky bylo skrze septum injektováno 1,8 g (7,1

mmol) I_2 rozpuštěného ve 20 ml THF. Následné přikapávání I_2 v THF bylo nastaveno tak, aby se roztok jódu stíhal odbarvovat. Reakce velice silně šuměla. Přikapávání trvalo 3 h, následně byla reakce zahřívána k varu pod zpětným chladičem přes noc. Reakce byla ukončena velice pomalým přidavkem 6M HCl. Reakční směs byla převedena do jednohrdlé baňky a odpařena pomocí RVO. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml 5% NaOH a extrahován 3x s DCM. Organická fáze byla sušena pomocí bezvodého Na_2SO_4 . Sušidlo bylo zfiltrováno a DCM fáze odpařena pomocí RVO při 40 °C. Z naměřeného ^{19}F NMR spektra bylo zjištěno, že reakce proběhla za vzniku trifluorethylové derivátu, avšak ^1H NMR spektrum vykazovalo velké množství nečistot. Generování BH_3 v THF z $NaBH_4$ a I_2 bylo úspěšné. Látka nebyla dále čištěna a nebyl stanoven výtěžek reakce.

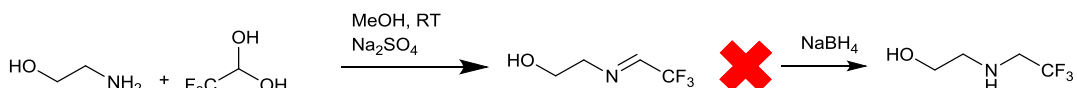
Metoda C: Redukce *N*-trifluoracetylamin ethanolu pomocí $LiAlH_4$



Do baňky s 5,2 g (33 mmol) amidu bylo vloženo míchadlo a olej byl rozpuštěn v suchém THF. Při laboratorní teplotě bylo přidáno 7 ml $TMSCl$. Směs byla míchána 5 minut a poté byla vychlazena ve vodní lázni s ledem. Za chlazení bylo postupně přidáno 1,0 g $LiAlH_4$. Přídavek byl řízen pěněním směsi. Po přidavku všeho hydridu byla ledová lázeň odstraněna a reakce doreagovala při laboratorní teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem malého množství vody. Reakce poskytla v ^{19}F NMR spektru charakteristický triplet (−68 až −71 ppm v závislosti na rozpouštědle), avšak jako u metody B reakce neprobíhá čistě (^1H NMR) a také neposkytuje vysokou konverzi (max. 25 %).

Metoda D: Reduktivní aminace trifluoracetaldehydu

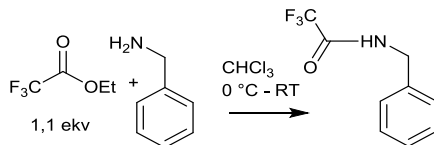
Vedle redukce trifluoracetamidu byla vyzkoušena i reakce monohydrátu trifluoracetaldehydu (Fluoralu).



Do 25 ml baňky bylo naváženo 0,25 g (4,1 mmol) aminoethanolu, který byl následně rozpuštěn v 10 ml MeOH. Do baňky bylo přidáno 1,5 g bezvodého Na_2SO_4 v roli sušidla. Reakční směs byla vychlazena v ledové lázni. Následně bylo přidáno 1,0 g (8,6 mmol) Fluoralu, reakční směs byla uzavřena zátkou a ponechána při pokojové teplotě 20 minut.

K reakční směsi bylo po částech přidáno 0,35 g (9,2 mmol) NaBH₄. Podle ¹⁹F NMR reakce neproběhla. S největší pravděpodobností nedošlo ani k formaci Shiffovy báze.

Příprava *N*-trifluoracetylbenzylaminu



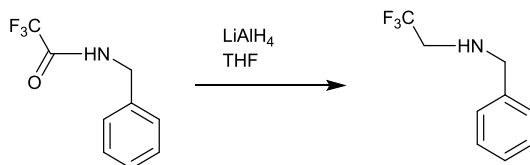
Ve 100ml baňce bylo smícháno 3,71 g (34 mmol) benzylaminu v 15 ml CHCl₃ a za chlazení bylo přidáno 4,5 ml (38 mmol) ethyl trifluoracetátu. Chlazení bylo odstaveno a reakce byla ponechána při laboratorní teplotě. Po dvou dnech byla reakce odpařena na RVO při 65 °C za vzniku bílého prášku. Bylo získáno 6,94 g produktu (100%).

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.44–7.30 (m, 3H), 7.34–7.22 (m, 2H), 6.61 (s, 1H), 4.52 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H).

¹⁹F NMR (282 MHz, Chloroform-*d*) δ –75,83 (s)

Příprava *N*-(2,2,2-trifluorethyl)benzylaminu

Metoda A:



Do 50ml baňky bylo naváženo 1,98 g (9,7 mmol) výchozího amidu, který byl následně rozpuštěn v 15 ml suchého THF. K roztoku amidu bylo za stálého míchání a chlazení vodní lázni přidáno 0,18 mg (4,7 mmol) LiAlH₄. Podle ¹⁹F NMR reakce neproběhla. Žádná reakce nebyla pozorována ani po pozdějším přidavku TMSCl, a ani po krátkém zahřátí k varu v kyvetě.

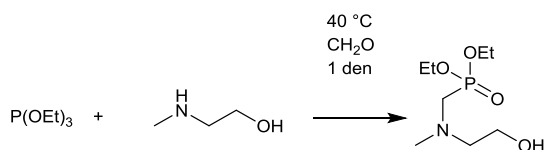
Metoda B:

Do 50ml baňky bylo naváženo 2,00 g (9,8 mmol) výchozího amidu, který byl následně rozpuštěn v 15 ml suchého THF. K tomuto roztoku bylo přidáno 1,9 ml (15 mmol) TMSCl. Reakční směs se bíle zakalila. Po několika minutách bylo za stálého míchání a chlazení ledem přidáno 0,18 g (4,7 mmol) LiAlH₄. Podle ¹⁹F NMR reakce neproběhla.

Zavádění fosforových skupin na aminoethanolové deriváty

Příprava diethyl *N*-(2-hydroxy)ethyl-*N*-methyl-aminomethylfosfonátu

Metoda A:

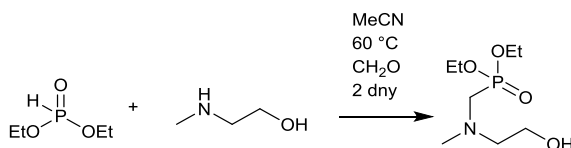


Do 100ml baňky bylo naváženo 5,0 g (67 mmol) *N*-methylaminoethanolu, který byl následně rozpuštěn ve 33 g (198 mmol) triethyl fosfitu (TEP). Dále bylo přidáno 3,0 g (100 mmol) paraformaldehydu a reakční směs byla uzavřena plastovou zátkou a míchána jeden den při 40 °C. Celá reakční směs byla bez předchozího odpařování nalita na 150 g sloupec silného kationového iontoměniče Dowex 50 v H^+ cyklu v EtOH:H₂O 1:1. Celý sloupec byl promyt 2,4 litry směsi EtOH:H₂O 1:1, během čehož byl všechen přebytečný TEP přeměněn na diethyl fosfit (DEP), který byl vymyt ze sloupce iontoměniče. Produkt byl posléze eluován směsí NH_3 :EtOH 1:5. Eluát byl odpařen při 60 °C. Zbytková voda byla odpařena azeotropickým odpařováním s toluenem pomocí RVO. Bylo získáno 14,0 g světle žlutého oleje, což by představovalo 93% výtěžek, avšak podle ^{31}P NMR obsahuje produkt neznámou fosforovou nečistotu.

^1H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.33–3.63 (m, 4H), 3.52 (dfd, $J = 5.6, 4.9$ Hz, 2H), 3.31 (s, 2H), 2.78 (d, $J = 10.7$ Hz, 2H), 2.59 (ddd, $J = 5.9, 4.8, 0.8$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

^{31}P NMR (121 MHz, Chloroform-*d*) δ 25.67 (p, $J = 9.3$ Hz).

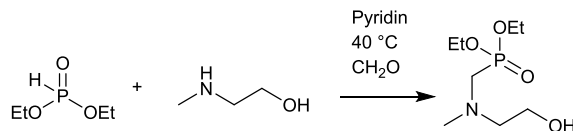
Metoda B:



Do 100ml baňky bylo naváženo 5,0 g (67 mmol) *N*-methylaminoethanolu, který byl rozpuštěn ve 30 ml suchého MeCN. Dále bylo přidáno 2,4 g (80 mmol) paraformaldehydu a 11,1 g (80 mmol) DEP a reakce byla uzavřena plastovou zátkou a míchána dva dny při 60 °C. Reakční směs byla odpařena pomocí RVO při 60 °C. Odparek byl rozpuštěn v malém množství vody a nalit na silný kationový iontoměnič Dowex 50 v H^+ cyklu. Většina nečistot byla vymyta vodou. Produkt byl eluován směsí NH_3 :EtOH 1:5. Eluát byl odpařen při 60 °C. Zbytková voda byla odpařena azeotropickým odpařováním s toluenem pomocí RVO. Bylo

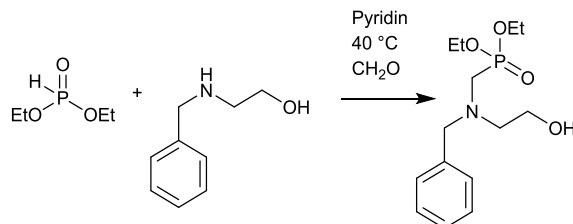
získáno 14,2 g světle žlutého oleje, což by představovalo cca 95% výtěžek, avšak i takto připravený produkt obsahuje neznámou fosforovou nečistotu.

Metoda C:



Do 100ml baňky bylo naváženo 5,10 g (68 mmol) *N*-methylaminoethanolu, který byl rozpuštěn ve 30 ml pyridinu. Do reakční směsi bylo přidáno 11,4 ml (82 mmol) DEP a 2,6 g (86 mmol) paraformaldehydu. Reakce probíhala 18 h při teplotě 40 °C za konstantního míchání. Reakční směs byla odpařena a další čištění produktu bylo provedeno na silném kationovém iontoměniči Dowex 50, který byl převeden do H⁺ cyklu. Nečistoty byly eluovány vodou. Produkt byl vymyt pomocí eluční soustavy NH₃:EtOH 5:1. Eluát byl odpařen na RVO při 60 °C. Odparek byl ještě 3× odpařen s malým množstvím toluenu pro odpaření zbytkové vody. Bylo získáno 14,0 g světle žluté olejovité látky s výtěžkem 92 %.

Příprava diethyl *N*-(2-hydroxy)ethyl-*N*-benzyl-aminomethylfosfonátu

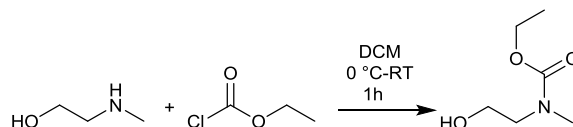


Do 250ml baňky bylo naváženo 7 g (46 mmol) *N*-benzylaminoethanolu, který byl rozpuštěn ve 40 ml pyridinu. Do reakční směsi bylo přidáno 7,2 ml (52 mmol) DEP a 2,0 g (67 mmol) paraformaldehydu. Reakce probíhala 2 dny při teplotě 40 °C za konstantního míchání. Pyridin z reakční směsi byl odpařen pomocí RVO při teplotě 65 °C a odparek byl nalit na silný kationový iontoměnič Dowex 50 v H⁺ cyklu. Zbytky diethyl fosfitu a vzniklý monoethyl fosfit byly vymyty z iontoměniče vodou. Jako eluční činidlo pro chtěný produkt byla zvolena směs EtOH:NH₃ 5:1. Eluát byl odpařen za zisku světložlutého oleje, který byl ještě jednou odpařen s toluenem pro odpaření zbytkové vody. Bylo získáno 12,7 g oleje, což činí 92 % výtěžek.

NMR spektra jsou ve shodě s publikovanou charakterizací. [29]

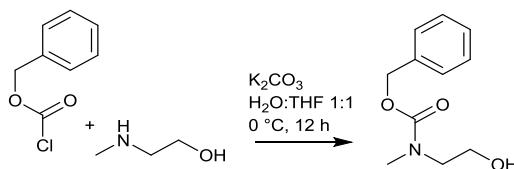
Příprava acylovými skupinami chráněných aminoethanolů

Příprava *N*-ethoxykarbonyl-*N*-methylaminoethanolu



Do 250ml baňky NZ 29 bylo naváženo 6,25 (83 mmol) *N*-methylaminoethanolu, který byl následně rozpuštěn v 70 ml DCM. Do reakční směsi bylo přidáno 11,5 ml (89 mmol) TEA a reakční směs byla vychlazena na ledovou lázní. Následně bylo za chlazení přikapáno 8 ml (84 mmol) ethylchlorformiátu. Po přidání ethylchlorformiátu byla reakce míchána při RT další hodinu. Do reakční směsi byla přidána 3% kyselina chlorovodíková o objemu 50 ml, aby bylo docíleno nízkého pH a celá reakční směs. Reakční směs byla nakonec 3x extrahována mezi 3% HCl a DCM, a poté ještě mezi 3x Mezi DCM. Organická fáze byla sušena pomocí bezvodého Na₂SO₄. Sušidlo bylo zfiltrováno a DCM roztok produktu byl odpařen na RVO při 45 °C. za vzniku bezbarvého oleje o hmotnosti 9 g, což představuje 73% výtěžek. Naměřená ¹H NMR spektra jsou ve shodě s publikovanou charakterizací u patentu. [52]

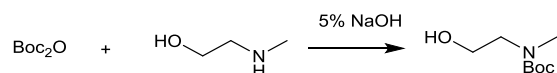
Příprava *N*-benzyloxykarbonyl-*N*-methylaminoethanolu



Do 500ml baňky bylo naváženo 10,0 g (133 mmol) *N*-methylaminoethanolu, který byl rozpuštěn ve 100 ml THF a 100 ml vody s 30 g K₂CO₃. Na baňku byla připevněna přikapávací nálevka s 19,6 g (115 mmol) benzyloxykarbonylchloridu (ZCl), který byl rozpuštěn ve 20 ml THF. ZCl byl přikapáván po dobu 30 minut. Přídavek byl prováděn za neustálého chlazení ledovou lázní. Po přidání všeho ZCl bylo skrze přikapávací nálevku přidáno dalších 10 ml THF a poté byla přikapávací nálevka nahrazena za plastovou zátku. Po 12 h míchání byla reakční směs extrahována 2× 200 ml EtOAc v 1000ml dělicí nálevce. Organická fáze byla následně extrahována pomocí nasyceného roztoku Na₂CO₃ a sušena přídavkem K₂CO₃. Sušidlo bylo odsáto na fritě S3 a roztok produktu v EtOAc byl zbaven rozpouštědla pomocí RVO při teplotě 50 °C. Bylo získáno 20,8 g bezbarvého oleje, což představuje 90% výtěžek.

NMR spektra jsou ve shodě s publikovanou charakterizací.[53]

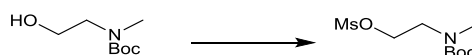
Příprava *N*-*t*butyloxykarbonyl-*N*-methylaminoethanolu



Reakce byla prováděna v 100ml baňce. Do baňky bylo naváženo 4,67 g (62 mmol) *N*-methylaminoethanolu, který byl rozpuštěn v 70 ml 5% vodného NaOH. Roztok aminu byl chlazen ledem. Do reakční nádoby bylo nasypáno 15,0 g (69 mmol) Boc_2O . Po přidání Boc_2O přestala být reakční směs chlazená a při laboratorní teplotě se míchala 2 dny. Reakční směs byla extrahována EtOAc. Získaná organická fáze byla sušena pomocí Na_2SO_4 a následně odpařena pomocí RVO při 60 °C. Bylo získáno 8,6 g bezbarvého oleje, což odpovídá 80% výtěžku. Kvalita produktu byla zkontrolována metodou NMR a naměřená data se shodují s publikovanou charakterizací [54]

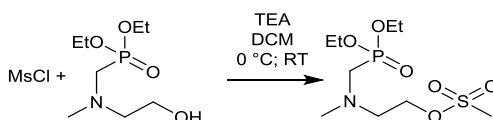
Příprava alkylačních činidel ze substituovaných aminoethanolů

Příprava *N*-*t*butyloxykarbonyl-*N*-methylaminoethyl mesylátu



Do 50ml baňky bylo naváženo 2,3 g (13 mmol) *N*-Boc-*N*-methylaminoethanolu, který byl naředěn 10 ml DCM. Následně bylo přidáno 10 ml (78 mmol) TEA a směs byla ponechána při RT a míchání po dobu 30 minut. Reakční směs byla vychlazená v lázni s ledem a následně za neustálého chlazení bylo pomocí přikapávačky přikapáno 1,3 ml (17 mmol) mesylchloridu (MsCl) v 10 ml DCM. Již při první kapce byl pozorován vznik bílé sraženiny $\text{TEA}\cdot\text{HCl}$ v DCM. Reakční směs byla téměř po celou dobu přidávání bílá, avšak nakonec při přebytku MsCl reakční směs zoranžověla. Po dokončení přidávání MsCl (2,5 hodiny) bylo přidáno 20 ml nasyceného roztoku NaHCO_3 . Byla provedena extrakce 2× s NaHCO_3 a 2× s vodou. Organická fáze byla vysušena pomocí Na_2SO_4 a odpařena pomocí RVO. Bylo získáno 3,2 g oranžového oleje, který byl ihned použit pro další syntézu.

Příprava diethyl *N*-(2-methylsulfonyloxy)ethyl-*N*-methyl-aminomethylfosfonátu



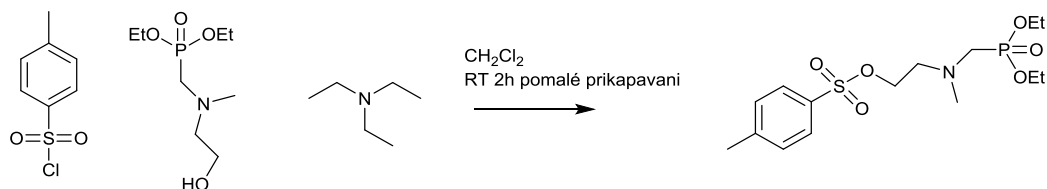
Do 250ml baňky bylo naváženo 2,0 g (8,8 mmol) výchozího substituovaného aminoethanolu, který byl pro jistotu odpařen s toluenem pro odstranění vlhkosti. Olejovitý odparek byl rozpuštěn v 50 ml DCM (sušený pouze síty). Za prudkého míchání bylo přidáno

2,0 ml (15,5 mmol) TEA. K baňce byla připevněna přikapávací nálevka se směsí 50 ml DCM a 0,75 ml (9,7 mmol) MsCl. Mesyl chlorid byl přikapáván do prudce míchané reakční směsi po dobu 4 hodin. Reakční směs během přidávání MsCl neměnila barvu. Ke změně barvy došlo až během míchání při RT. Po 16 hodinách byla reakční směs extrahována dvakrát 25 ml vody. Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄ a odpařena pomocí RVO za vzniku 2,0 g žlutého oleje, což představuje 75% výtěžek. Tento olej byl neprodleně použit pro další reakci.

¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 5.84 (s, 0H), 4.21 – 3.93 (m, 1H), 3.48 (td, *J* = 6.8, 0.7 Hz, 0H), 2.89 – 2.65 (m, 1H), 2.40 (d, *J* = 0.9 Hz, 0H), 1.24 (td, *J* = 7.1, 0.7 Hz, 1H).

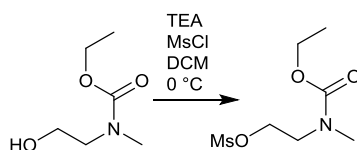
³¹P NMR (121 MHz, Chloroform-*d*) δ 24.29 (p, *J* = 9.0 Hz).

Příprava diethyl *N*-(2-*p*-toluensulfonyloxy)ethyl-*N*-methyl-aminomethylfosfonátu



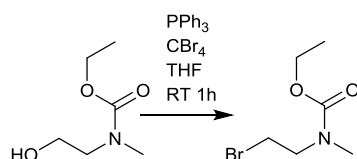
K 3,2 g (~ 14 mmol) oleje obsahujícího směs dvou fosforových komponent (vstupní diethylester a neznámá nečistota při 17 ppm) bylo přidáno 15 ml DCM a 9,5 ml TEA. K reakci byl následně po dobu dvou hodin přikapáván tosylchlorid (TsCl) v DCM (3,4 g (17,9 mmol) / 40 ml). Reakční směs se zabarvila do červena. Reakce byla sledována pomocí ³¹P NMR. Bylo pozorováno, že fosforová komponenta s chemickým posunem cca kolem 17 ppm s TsCl nereaguje. Bylo pozorováno přelévání intenzity ze signálu výchozí látky na tosylát, jehož signál měl chemický posun cca o 2 ppm nižší. Reakce byla ponechána přes noc při RT. Následně bylo k reakční směsi přilito 30 ml nasyceného roztoku NaHCO₃ a reakční směs byla prudce míchána po dobu 10 minut. Směs byla přelita do dělicí nálevky a extrahována 2× s NaHCO₃ a 2× vodou. Organická fáze byla odpařena na RVO při 40 °C za vzniku červeného oleje. Tento olej byl chromatografován na sloupci silikagelu. Mobilní fází byl čistý MeOH. Najímané frakce byly odpařeny. Podle ³¹P NMR byla látka čistá, a signál u 17 ppm vymizel. Odparek byl rozpuštěn v CHCl₃ a ještě jednou byl extrahován vodou. Organická fáze byla sušena pomocí Na₂SO₄. Sušidlo bylo odstraněno filtrací. Organická fáze byla odpařena za vzniku oleje. Látka nebyla plně charakterizována.

Příprava *N*-ethyloxykarbonyl-*N*-methylaminoethyl mesylátu



Do 100 ml baňky bylo naváženo 2,7 g (18,4 mmol) výchozího alkoholu, který byl rozpuštěn ve 20 ml DCM. Bylo přidáno 7,5 ml (55 mmol) TEA a reakční směs byla vychlazena v ledové lázni. K baňce byla připevněna příkapávací nálevka s 3,2 g (28 mmol) MsCl v 10 ml DCM. MsCl byl příkapáván za stálého míchání a chlazení. Po přidání MsCl byla reakce míchána při pokojové teplotě 1 hodinu. Reakce byla ukončena přidáním 20 ml nasyceného roztoku NaHCO₃. Po 5 minutách míchání byla reakční směs extrahována 2x s NaHCO₃ a 2x s vodou. Organická fáze byla sušena bezvodým Na₂SO₄. Sušidlo bylo odfiltrováno a roztok produktu v DCM byl odpařen na RVO při 40 °C. Bylo získáno 3,2 g oleje, který byl bez dalšího čištění použit pro další syntézu.

Látka nebyla plně charakterizována.

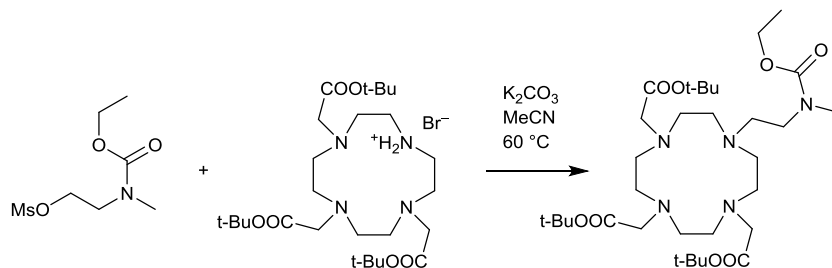


Příprava 2-[*N*-(Ethyloxykarbonyl)-*N*-methylamino]bromethanu

Do 250 ml baňky bylo naváženo 5,08 g (34,3 mmol) výchozího alkoholu a 17,0 g (51,3 mmol) CBr₄. Obě reagenty byly rozpuštěny v 40 ml suchého THF. Za pokojové teploty byla k reakční směsi připevněna příkapávací nálevka s 13,4 g (51,0 mmol) PPh₃ v 80 ml THF. Příkapávání trvalo 1 h a během něj reakční směs několikrát změnila barvu (zelená, červená). Po příkapání všeho PPh₃ byla reakce míchána další hodinu. Následně byla reakce zfiltrována a polovina roztoku byla odpařena a čištěna na SiO₂. Nečistoty byly eluovány pomocí DCM, produkt byl následně eluován mobilní fází aceton:DCM 1:9. Byly získány 3 g produktu, který dle NMR obsahoval stopy trifenylofosfinoxidu, avšak látka obsažená ve vzorku odpovídala publikované charakterizaci [48]. Rozhodující při určení přítomnosti látky bylo ¹³C spektrum s charakteristickým signálem u 29,5 ppm. ¹H spektra výchozí látky a produktu si jsou velice podobná.

Příprava makrocyclických ligandů

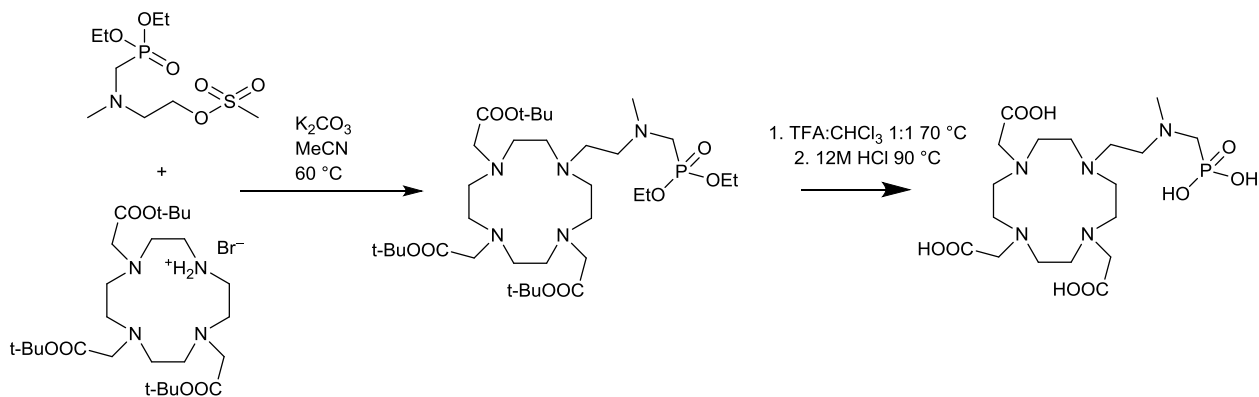
Příprava DO3ANN



Do baňky bylo naváženo 1,75 g (2,9 mmol) *t*Bu₃DO3A·HBr a 4,00 g (29 mmol) K₂CO₃. Směs makrocyclu a báze byla suspendována v 30 ml suchého MeCN. K baňce se suspenzí byla připevněna příkapávačka s roztokem 3,2 g (14 mmol) mesylátu v 30 ml suchého MeCN. Mesylát byl příkapáván po dobu 3 hodin. Reakční směs byla míchána jeden den při RT. Reakce byla zkontrolována pomocí TLC. Reakce probíhala, ale v reakční směsi byla stále přítomná *t*Bu₃DO3A. Reakční směs byla zahřátá na 50 °C a míchána 4 dny. Reakce neposkytla dostatečnou konverzi, aby bylo možné snadno izolovat produkt.

Příprava DO3ANMeP

Metoda A: Alkylace pomocí mesylátu pendantního ramene

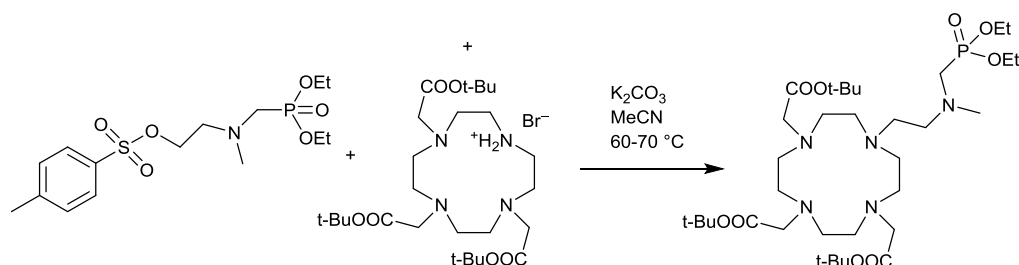


Do 100ml baňky bylo naváženo 1,9 g (3,2 mmol) *t*Bu₃DO3A a 0,96 g (7 mmol) K₂CO₃ a směs byla suspendována v suchém MeCN. Na baňku byla přidána příkapávací nálevka, do které byla převedena směs 40 ml MeCN a 2,0 g příslušného mesylátu. Reakční směs byla prudce míchána při pokojové teplotě. Rychlost příkapávání byla nastavena na 1–2 kapky za 5 sekund. Reakce byla míchána 2 dny. Reakce byla zfiltrována přes fritu S4. Filtrát byl odpařen za vzniku žlutého oleje. Odparek byl extrahován mezi CHCl₃ a vodu. Organická fáze byla odpařena za vzniku oleje. Tento olej byl rozpuštěn v 50 ml směsi CHCl₃ a TFA 1:1. Ve 100ml baňce byla směs míchána a zahřívána k varu pod zpětným chladičem 1 den.

Změřené ^{31}P NMR spektrum ukázalo dva fosforové signály, kdy se nejspíše jednalo o přebytek alkylačního činidla a alkylovaný produkt (rozdíl mezi signály je pouhých 0,4 ppm / 16,1 a 15,7 ppm). Reakce byla odpařena 3x s vodou při 60 °C za vzniku žlutého oleje. V dalším kroku byl odparek rozpuštěn ve 12M HCl a zahříván na 90 °C. Po 1 dni byl získán plně deestirifikovaný produkt, který byl následně čištěn pomocí chromatografie na silikagelu. Všechny nečistoty byly eluovány mobilními fázemi EtOH:NH₃ 10:1. Chtěný produkt byl eluován mobilní fází EtOH:H₂O:NH₃ 1:2:1.

Bylo získáno pár desítek miligramů produktu v podobě bílého prášku. Je nutné podotknout, že značnou část tohoto bílé prášku mohl tvořit také síran amonný. Výtěžek této syntetické cesty je pod 10 %.

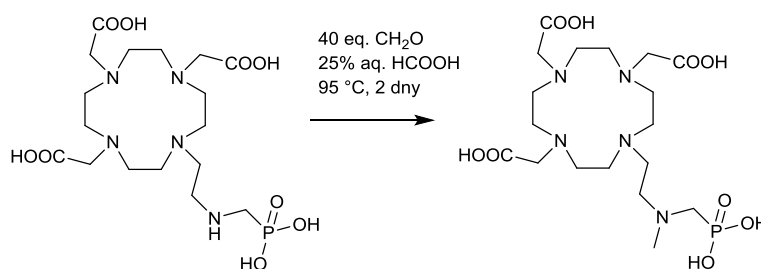
Metoda B: Alkylace pomocí tosylátu pendantního ramene



Do 100 ml baňky bylo naváženo 1,3 g (2,2 mmol) *t*Bu₃DO3A·HBr a 1,0 g vyžihaného K₂CO₃. Směs byla suspendována v suchém MeCN. Suspenze byla míchána při RT na magnetické míchačce. Do baňky bylo přikapáno 2,0 g olejnatého tosylátu, který byl rozpuštěn v 50 ml MeCN. Reakční směs byla ponechána jeden den při RT, ale podle ^{31}P NMR reakce neprobíhala. Následně byla reakční směs jeden den zahřívána na 50 °C, avšak ^{31}P NMR spektrum nevykázalo žádnou změnu. Reakce neproběhla ani při zahřívání na 70 °C.

Metoda C: Methylace DO3ANP

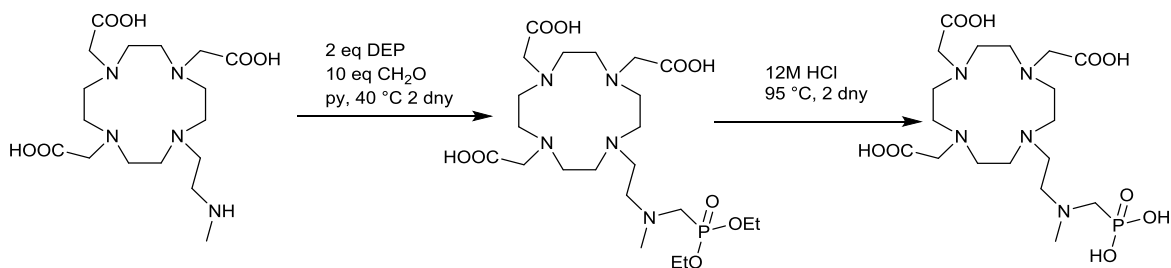
Vzhledem k předchozí dostupnosti DO3ANP[29] byl ligand DO3ANMeP připraven též methylační reakcí.



Reakce byla provedena dle Eschweilera-Clarka.[55] Do 25ml baňky bylo naváženo 230 mg (0,4 mmol) výchozího DO3ANP, který byl rozpuštěn v 20 ml 25% vodné kyselině mravenčí. K roztoku aminu bylo přidáno 0,50 g (17 mmol) paraformaldehydu a reakce byla míchána při 95 °C po dobu dvou dnů. Reakční směs byla odpařena na RVO při 70 °C. Přebytný paraformaldehyd a zbytky kyseliny mravenčí byly odpařeny opakovaným odpařováním z vody. Produkt byl získán jako transparentní sklovitá látka, která po naškrábání přechází do podoby bílého prášku.

Metoda D: Mannichova reakce s DO3ANNMe

Vzhledem k předchozí dostupnosti DO3ANNMe [48] byl ligand DO3ANMeP připraven též reakcí Mannichova typu.



Do 25ml baňky se zábrusem a míchadlem bylo naváženo 183 mg (0,45 mmol) makrocyclického prekurzoru a 120 mg (4 mmol) paraformaldehydu. Tato směs byla rozpuštěna 15 ml pyridinu (nedestilován, nesušen). Ke směsi bylo přikapáno 128 mg (0,93 mmol) DEP. Reakce byla uzavřena plastovou zátkou a zahřívána na 40 °C na olejové lázni po dobu dvou dní. Reakční směs byla odpařena na RVO při 60 °C a poté ještě 2× s vodou. Odparek byl rozpuštěn v malém množství vody a nalit na sloupec silného kationtového iontoměniče (Dowexu 50, H⁺ cyklus, 1×5 cm). Přebytný DEP a hydrolyzovaný monoethyl fosfit byly vymyty vodou. Produkt byl eluován nejprve 10% vodným pyridinem a následně směsí EtOH:NH₃ 5:1. Produkt byl eluován v obou elučních fázích. Eluát byl odpařen na RVO při teplotě 60 °C. Čištění pomocí silného kationtového iontoměniče bylo ověřeno pomocí ³¹P NMR. Bez dalšího čištění byla nažloutlá pevná látka použita k další reakci.

¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 3.99 (dq, *J* = 8.2, 7.1 Hz, 4H), 3.43 (s, 6H), 3.36 – 2.98 (m, 18H), 2.95 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.83 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.79 – 2.70 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

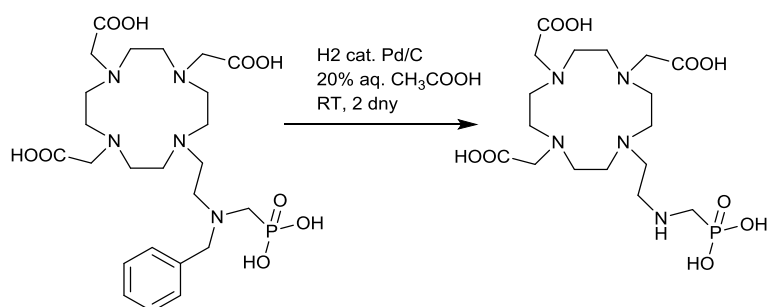
³¹P NMR (121 MHz, D₂O) δ 23.65.

Čistá komponenta (podle ^{31}P NMR) byla zalita 20 ml 12M HCl a směs byla zazátkována a ponechána za míchání při 95 °C po dobu 2 dnů. Kyselina chlorovodíková byla odpařena na RVO při 60 °C. Byla získána nažloutlá pevná látka, jejíž ^{31}P NMR spektrum obsahuje pouze jediný signál.

^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 3.91 – 3.73 (m, 4H), 3.60 – 3.14 (m, 15H), 2.96 (m, 11H).

^{31}P NMR (121 MHz, D_2O) δ 6.85 (t, $J = 12.4$ Hz).

Příprava DO3ANP



Do 100ml hruškovité baňky byl nalit roztok výchozího DO3ANBnP v 30 ml 20% kyseliny octové. Do baňky bylo naváženo 230 mg Pd/C a následně byla baňka uzavřena zábrusovým kohoutem. Baňka byla vysekurována a poté k ní byl připevněn gumový balónek naplněný vodíkem. Míchání v aparatuře bylo nastaveno tak, aby vznikaly vysoké vlny a docházelo tak k efektivnímu kontaktu vodíkové atmosféry s roztokem. Reakce probíhala 2 dny při pokojové teplotě. Katalyzátor byl zfiltrován přes papír a roztok byl několikrát odpařen s vodou za zisku lehce nažloutlého prášku. Reakce byla kvantitativní.

NMR spektra se shodují s publikovanou charakterizací [29]

Příprava komplexů

Komplexy DO3ANRP byly připravovány ligandových navážek v řádech desítek miligramů. K ligandu rozpuštěnému ve vodě bylo přidáno podstechiometrické množství (0,9 ekv.) příslušné Ln^{3+} soli. Sole byly přidávány v podobě roztoku, u nichž byla koncentrace stanovena titračně s přesností 10^{-5}M . Pro komplexace byly použity vodné roztoky 0,05796 M GdCl_3 , 0,05112 M DyCl_3 a 0,05742 M EuCl_3 .

Po smíchání ligandu a příslušné sole bylo upraveno pH reakční směsi na hodnoty 7–8 pomocí vodného roztoku NaOH. Při postupném přidávání NaOH po okamžitém zvýšení pH následovalo postupné snižování hodnoty pH díky pomalé komplexaci. Pro kvantitativní

zakomplexování Ln^{3+} iontu do kavity DO3ANRP byly komplexy zahřívány za stálého míchání na olejové lázni přes noc při 60 °C.

Komplex YbDO3ANP byl připraven z čerstvě připraveného roztoku $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Tento roztok nebyl titrován. Díky hygroskopičnosti Ln^{3+} solí byla zřejmě výsledná koncentrace Yb^{3+} v roztoku nižší, avšak pro standardní paramagnetická NMR měření je používán nadbytek ligandu. Roztok komplexu byl stejně jako v předchozích případech zahříván při 60 °C v bazickém prostředí přes noc.

Seznam použitých přístrojů

Přístroje dostupné na pracovišti chemické sekce PřF UK.

VNMR5300 – Varian NMR spektrometr s protonovou frekvencí 300 MHz byl použit pro kontrolu syntetických kroků, měření ^1H , ^{13}C , ^{31}P a ^{19}F spekter, BMS a pH ^1H a ^{31}P NMR titrace

BrukerAscend400 – Bruker NMR spektrometr s protonovou frekvencí 400 MHz byl použit pro měření teplotních závislostí relaxací ^{17}O a DIS.

Přístroje dostupné na pracovišti Università del Piemonte Orientale – Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Alessandria, Itálie.

BrukerAvance III 500 – Bruker NMR spektrometr s protonovou frekvencí 500 MHz byl použit pro měření BMS a T1 relaxace vody u studovaných komplexů GdDO3ANP při různých teplotách.

Fast fieldcycling Stellar Smar Tracer – relaxometr s proměnným magnetickým polem od 0,00024 do 0,25 T (0,01-10 MHz protonové Larmorovy frekvence) byl použit pro GdDO3ANP NMRD

StellarRelaxometerwith Bruker WP 80 NMR electromagnet – relaxometr pro vysoká pole od 15 do 70 MHz protonové Larmorovy frekvence byl použit pro GdDO3ANP NMRD

Přístroje dostupné na pracovišti Department of Chemistry – Durham University, Durham, Velká Británie

Varian Mercury 200 – Varian NMR spektrometr s protonovou frekvencí 200 MHz

Varian Mercury 400 – Varian NMR spektrometr s protonovou frekvencí 400 MHz

VNMR5500 – Varian NMR spektrometr s protonovou frekvencí 500 MHz

PerkinElmer LS 55 Fluorescence spectrometer – měření dob života EuDO3ANXP

ISA Jobin-Yvon SpexFluorolog-3 – měření luminiscenčních spekter látek EuDO3ANXP s přímou excitací při 398 nm

Měření NMR experimentů

Relaxivní měření ^1H NMRD

U komplexu GdDO3ANP byly naměřeny ^1H NMRD profily při teplotách 10, 25 a 37 °C a při dvou různých pH (AC = 5,7; BA 11,4). Při měření byly použity relaxometry s laditelným magnetickým polem. Měření byla provedena na pracovišti v Alessandrii v Itálii. Ve frekvenční oblasti od 0,01 MHz do 10 MHz byl použit takzvaný *low field relaxometer*, u kterého je změna magnetického pole plně automatizována. U frekvencí mezi 21 a 61 MHz bylo nutné pro každý bod (rozdíl byl vždy 10 MHz) upravit kabeláž a přístroj – *high field relaxometer* naladit na správnou frekvenci pomocí ladících knoflíků *tunning and matching*. Teplota byla kontrolována před každým měřením pomocí odporového teploměru. Naměřené hodnoty relaxačního zvýšení R_1 byly následně vyděleny koncentrací komplexu za zisku hodnot r_1 . Koncentrace byly určeny pomocí metody BMS. Měření BMS v italské Alessandrii bylo prováděno odlišným způsobem než je standardní způsob zmíněný v úvodu. Šíře NMR sondy na tamním Bruker Avance III 500 umožňuje měření pouze v úzkých kyvetách, do kterých není možné vložit externí referenci. Měření paramagnetického vzorku a diamagnetické reference tedy probíhalo separátně, což může být zdrojem chyby.

^{17}O NMR DIS

Byl proveden DIS experiment pro kyselou a bazickou podobu komplexu odvozeného od ligandu DO3ANP, pro zjištění rozdílného q pro jednotlivé pH závislé koordinační módy. Připravený komplex DyDO3ANP byl rozdělen do deseti NMR kyvet tak, aby po naředění a úpravě pH pomocí vodného roztoku NaOH a HCl bylo přibližně dosaženo chtěných koncentrací. Hodnoty pH byly upraveny tak, aby v každé kyvetě kyselé série byla hodnota pH mezi 5,5 a 6,0, v případě bazické oblasti byla hodnota pH mezi 9,5 a 10,0. Hodnoty pH byly voleny na základě pK_A pro sekundární amin ligandu DO3ANP, které bylo stanoveno potenciometricky a publikováno.[29]

Pro přípravu komplexu i kontrolní série byl použit ofaktorovaný roztok DyCl_3 . Koncentrace měřených dysprositých látek byly voleny tak, aby výsledné rozdíly byly pokud možno ekvidistantní. U všech 16 kyvet (10 s komplexem a 6 kontrolní série aqua komplexu) bylo změřeno ^1H BMS NMR spektrum a pomocí Evansovy metody byly dopočítány jednotlivé koncentrace.

U všech vzorků byla provedena měření pomocí ^{17}O NMR, kde byla sledována změna chemického posunu H_2^{17}O . Pro nízké přirozené zastoupení ^{17}O kyslíku bylo nutné měřit 2048 scanů na 400MHz spektrometru (^1H frekvence).

Nastavení měření ^{17}O spekter bylo $nt = 2048$, $at = 0,0500$ s, $d1 = 0,100$ s, $pw = 32,0000$ μ s, $T = 298,1$ K, $SF^{17}\text{O} = 54,24$ MHz.

Pro výpočet DIS byl změřen i chemický posun ^{17}O ve vzorku čisté vody s přírodním zastoupením H_2^{17}O . Na základě ^{17}O chemických posunů a dat z BMS, potažmo z koncentrace Dy^{3+} , byly vypočteny hodnoty DIS.

Další ^{17}O experimenty

Spektra ^{17}O NMR byla měřena na přístroji Bruker Ascend s nastavením $nt = 2048$, $at = 0,0500$ s, $d1 = 0,100$ s, $SF^{17}\text{O} = 54,24$ MHz. Puls byl kalibrován pro každý bod měření. Hodnoty pw byly mezi 17,5 a 20,1 μ s. Teplota byla upravována vždy po 10 °C od 5 do 95 °C. Reálná teplota byla zjišťována z chemického posunu ethylenglykolu. Temperování vzorku trvalo vždy 10 minut. Z jednodimenzionálních spekter H_2^{17}O byly získány pološířky signálů, tj. šířka signálu/Hz v polovině výšky píku. Hodnoty pH byly 5,7, 10,0 a 11,5.

T_1 ^{17}O NMR experimenty

^{17}O T_1 relaxační časy H_2^{17}O byly získány pomocí experimentu Inversion Recovery. Nastavení měření ^{17}O spekter bylo $nt = 256$, $at = 0,0500$ s, $d1 = 0,0500$ s, $SF^{17}\text{O} = 54,24$ MHz. Teplota byla upravována vždy po 10 °C od 5 do 95 °C. Reálná teplota byla zjišťována z chemického posunu ethylenglykolu. Temperování vzorku trvalo vždy 10 minut. Puls byl kalibrován pro každý bod měření. Hodnoty pw byly mezi 17,5 a 20,1 μ s. Hodnoty T_1 byly získány zpracováním experimentů Inversion Recovery pomocí softwaru Topspin. Hodnoty pH byly 5,7, 10,0 a 11,5.

^1H relaxivní pH NMR titrace

Pro relaxivní titraci bylo nutné pro každý bod změřit spektrum BMS, které udává koncentraci ligandu v roztoku. Hodnoty pH vzorku byly upravovány pomocí roztoků HCl a NaOH. Pro kontrolu byla hodnota pH měřena před i po NMR experimentu. pH meter s úzkou elektrodou, která se vejde do NMR kyvet, měl poměrně pomalou odezvu. Pro zjištění hodnot r_1 byl změřen experiment Inversion Recovery pro zjištění T_1 relaxačního času ^1H signálu H_2O . Pro každý bod bylo nutné kalibrovat puls. Vyhodnocení Inversion Recovery experimentů bylo provedeno pomocí softwaru VNMRJ.

NMR pH titrace

NMR titrace byly prováděny na stroji s rezonanční frekvencí 300 MHz pro ^1H a 121 MHz pro ^{31}P . Ligandy DO3ANBnP a DO3ANMeP byly rozpuštěny v D_2O a převedeny do NMR kyvet. U vzorků bylo změřeno počáteční pD. pD pro DO3ANBnP činilo 0,52, v případě DO3ANMeP bylo pD rovno -0,71. Jako titrační činidlo byl použit roztok 1M NaOD v D_2O . Titrační činidlo bylo přidáváno pomocí automatické pipety tak, aby bylo docíleno rozdílu pH mezi jednotlivými body rovnému cca 0,5 jednotky pH/pD. V průběhu titrace byla měřena jednodimenzionální ^1H spektra bez přítomnosti insertu. ^1H spektra byla referencována na signál vody (4,7 ppm). Dále byla měřena ^{31}P NMR spektra s i bez decouplingu ^1H . ^{31}P spektra byla referencována na vložený standard v externí kyvetě. Tento standard obsahoval H_3PO_4 , jejíž chemický posun byl použit jako reference a byl upraven na hodnotu 0,00 ppm). Všechna měření byla prováděna s lockem na D_2O a shimem. Spektra byla zpracována v programu MestRenova.

Závislosti chemických posunů fosfonátových a benzylové/methylové skupiny na pH byly použity pro zjištění hodnot pK_A . Hodnoty pK_A byly získány fitováním v programu Opium.[56] Pro fitování byly použity pouze hodnoty chemických posunů mezi pD 2 až 10.

Luminiscenční měření

Před každým luminiscenčním měřením v D_2O je zapotřebí zajistit co největší podíl D_2O ve vzorku, proto je před měřením v D_2O nutné vzorek několikrát odpařit s těžkou vodou. V laboratoři v Durhamu byl využit lyofilizátor pro lepší vysušení. Před měřením v D_2O byl vzorek 3× vysušen z D_2O . Hodnoty pD byly upravovány pomocí roztoků NaOD v D_2O a DCl v D_2O . Vzorek byl po měření v D_2O vysušen od D_2O a rozpuštěn v H_2O . Takto připravený vzorek byl použit pro měření v H_2O . Hodnoty pH byly upravovány pomocí roztoků NaOH a HCl.

Luminiscenční měření byla prováděna u roztoků komplexů v D_2O i H_2O , kdy koncentrace komplexů bývala v řádu jednotek mg/ml. Jelikož ligandy neobsahují funkční skupiny, které by mohly vykazovat „anténa efekt“ [57] bylo europium v komplexech excitováno přímo. Pro měření luminiscenčních spekter byla zvolena excitační vlnová délka 398 nm.

V případě měření dob života byl komplex excitován taktéž 398 nm. Doba života byla měřena pro vlnovou délku odpovídající hypersenzitivnímu přechodu $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$, což představovalo 616 nm. Měření dob života bylo prováděno vždy 3×, aby měření bylo co nejpresnější. pH/pD

bylo měřeno vždy před a po měření. Parametry měření dob života jsou uvedeny v *Tabulka 3*.

Tabulka 3 Parametry měření dob života EuDO3AN(R)P na stroji LS55

Parametry měření dob života excitovaných stavů europitých komplexů						
Sample	EuDO3ANP		EuDO3ANMeP		EuDO3ANBnP	
Solvent	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O
Excitation wavelength	398 nm					
Emission wavelength	616 nm					
Excitation slit	10	10	10	15	15	15
Emission slit	5	5	5	15	15	15
Gate time	0.1 ms					
Delay time	0.1 – 5.0 ms					

Na základě následujících rovnic (7) a (8) (ref. [46]) byly z hodnot dob života na titračních „platech“ vypočteny počty molekul koordinovaných vod pro jednotlivé módy koordinace všech EuDO3ANRP komplexů. Použité rovnice:

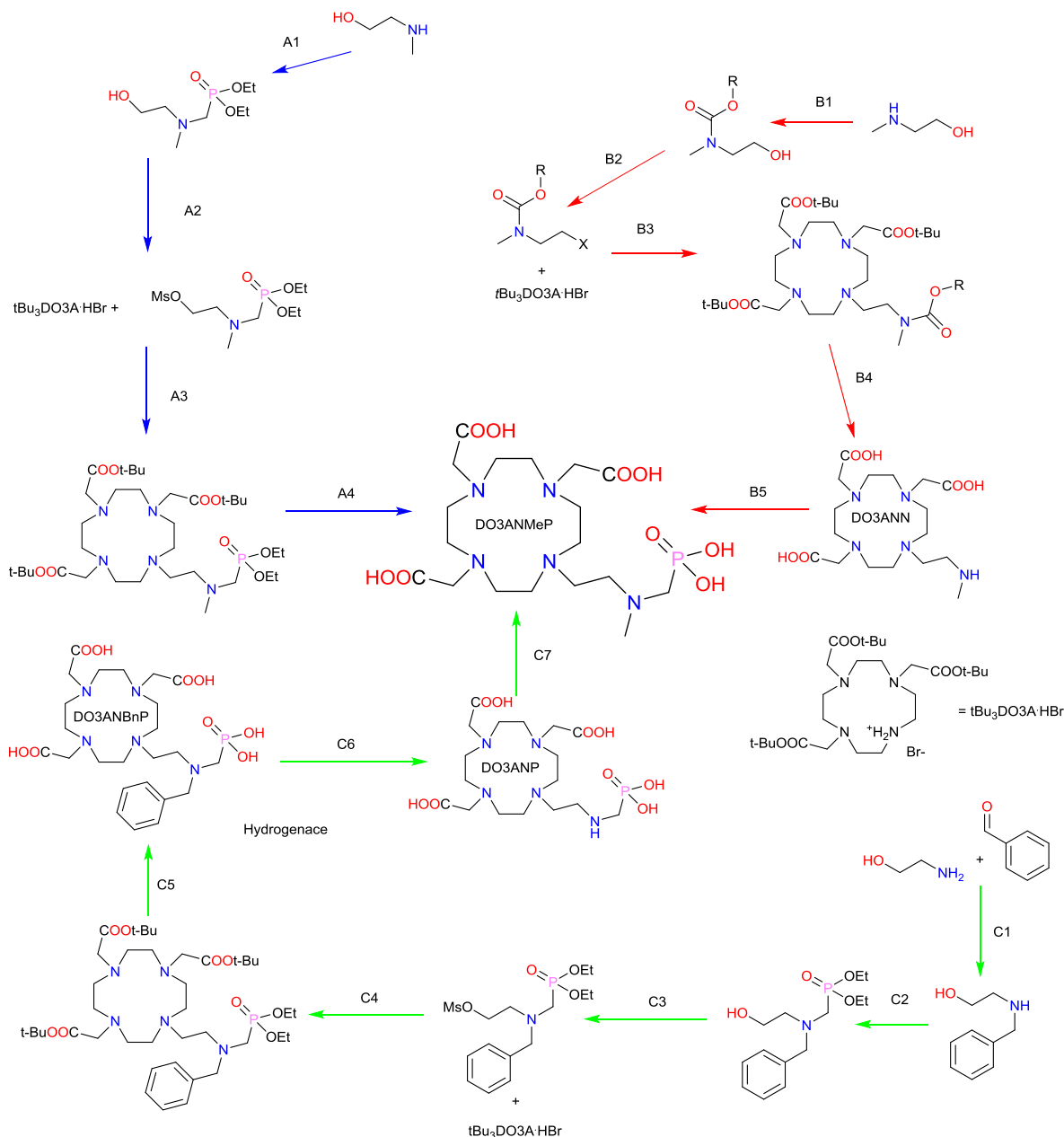
$$\tau = \frac{1}{k} \quad (7)$$

$$q = (|k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}}| - 0.25) \cdot 1,2 \quad (8)$$

Stejně jako měření doby života byly měření emisních spekter prováděny v křemenných kyvetách. Měření byla prováděna v rozsahu 550–720 nm. Kvůli přímé excitaci europia bylo nutné odstranit z přístroje filtr pro vlnové délky vyšší než 390 nm. Rozlišení bylo nastaveno na 0,25 nm a integrační čas byl 1,00 s.

Výsledky a diskuse

K cílovému ligandu DO3ANMeP byly navrženy 3 hlavní cesty (*Obrázek 13*). Dvě tyto cesty vychází z makrocyclických prekurzorů, které byly připraveny v rámci naší laboratoře již dříve a syntetická cesta k nim již byla dříve publikovaná. Jedná se o a DO3ANN (Cesta B) a DO3ANP (Cesta C). Další syntetická strategie je založena na syntetické cestě, která je analogická k syntéze DO3ANP, avšak vychází z jiného komerčního prekurzoru – z *N*-methylaminoethanolu (Cesta A).



Obrázek 13 Schéma syntetických strategií (A,B a C) pro přípravu DO3ANMeP

Syntetická cesta A:

V rámci syntetické cesty A se jedná o následující kroky: **A1** je reakce Mannichova typu na *N*-methyলামinoethanolu, u níž byly vyzkoušeny 3 modifikace. Reakce **A1**¹ byla prováděna v pyridinu, který zde vystupuje jako rozpouštědlo, s DEP. Reakce **A1**² byla prováděna v TEP, který byl použit v trojnásobném nadbytku a vystupoval tak i jako rozpouštědlo. **A1**³ byla reakce DEP v MeCN. Všechny reakce probíhaly srovnatelně dobře. Hlavním čistícím krokem je promytí skrze silný kationový iontoměnič. V průběhu tohoto procesu dochází k degradaci produktu. S největší pravděpodobností dochází k odštěpení jedné z ethylových esterových skupin fosfonátu a uzavírání 6tičlenného laktonového cyklu, avšak tento boční produkt nebyl izolován.

Reakční krok **A2** představuje výměnu hydroxylové skupiny za lépe odstupující skupinu, taková látka poté vystupuje v reakci **A3** jakožto alkylační činidlo. V rámci kroku **A2** byly připraveny Ms a Ts deriváty. V případě mesylátů došlo k obrovské ztrátě času, jelikož se ukázalo, že používaný MsCl nejspíš už není dostatečné kvality. Tento MsCl byl vyměněn za jiný zdroj a byl připraven mesylovaný produkt. V případě Ts byl využit TsCl, avšak tosyl deriváty nebyly v dalším reakčním kroku vůbec aktivní (žádná změna ve ³¹P NMR spektrech ani na TLC). Ts derivát byl nereaktivní i po přidavku I₂, který měl podléhat *in situ* Finkelsteinově reakci. Bez reakce byl také přídavek MeONa, jakožto silnější báze v porovnání se standardními podmínkami K₂CO₃/MeCN 60°C. Ani zvýšení teploty nevedlo k reakci.

Mesylát reagoval, avšak krok **A3** – alkylace na *t*Bu₃DO3A·HBr, byl nejspíš značně ztrátový i přes nadbytek alkylačního činidla, které má teoretický potenciál podléhat beta eliminaci. Vzhledem k nadbytku alkylačního činidla jsou ¹H NMR spektra a TLC velice špatně čitelná a proto bylo pokračováno dále s olejovitou směsí produktu a nadbytku mesylátu bez detailnější charakterizace. Odstraňování esterů (**A4**) probíhalo standardními metodami. Zahříváním látky ve směsi CHCl₃ a TFA dochází k odbourání *t*butylesterů a následné zahřívání v 12M HCl odbourává ethylestery na atomu fosforu. Reakce odbourávání esterů jsou vcelku bezproblémové a lze je provádět v jedné baňce, aby docházelo k minimálním ztrátám. Kvůli problematickému kroku **A3** jsou výtěžky velmi nízké.

Metody B a C byly studovány na základě toho, že jejich téměř finální prekursor byly k dispozici a byly na nich provedeny reakce, které téměř kvantitativně poskytovaly chtěný produkt DO3ANMeP.

V rámci cesty B byl nejprve proveden krok **B5**, kdy dochází k reakci Mannichova typu na sekundárním aminu pendantního ramena DO3ANN. Tato reakce byla prováděna za podmínek, které v rámci naší skupiny studuje Mgr. Peter Urbanovský, tj. reakce aminu, paraformaldehydu a DEP v pyridinu. Tato reakce byla prakticky kvantitativní. Následná deesterifikace probíhá už za dříve diskutovaných podmínek při zvýšené teplotě v 12M HCl. V rámci usnadnění syntézy bylo připraveno několik podskupin cesty B. Byly připraveny R-oxykarbonyl-*N*-methyلامinoethanoly (R= *t*Bu, Bn, Et). Přípravy těchto látek nepředstavovaly žádný zásadní problém, až na silný zápach reagentů (Z-chlorid, ethylchlorformiát).

Jako problém se ukázala kombinace kroků **B2** a **B3** a s tím spojená příprava alkylačního činidla, které by bylo dostatečně reaktivní při alkylationi. Pokusy o přípravu chloridů pomocí SOCl₂ byly úspěšné, avšak reaktivita příslušných chloridů je nedostačující. Pokusy o přípravu bromidů byly veskrze neúspěšné a v porovnání s přípravou chloridů byly náročnější na čištění. Po sérii nezdarů, která zahrnovala také reakci s PBr₃ nebo SOBr₂ (značně nevalné kvality), byla provedena publikovaná reakce, kdy hydroxylová skupina u ethoxykarbonyl-*N*-methyلامinoethanolu (krok **B2**, kde x = Br a R=Et) byla vyměněna za brom za využití Appelovy reakce, kde bromační činidlo vzniká *in situ* reakcí PPh₃ s CBr₄. Tato reakce je také podporována značnou oxofilicitou trifenyfosfinu. Během čištění produktu se trifenyfosfinoxid rozmývá po celém objemu kolony, avšak jedná se o vcelku inertní nečistotu. Výsledný bromderivát byl úspěšně použit v kroku **B3** jako alkylační činidlo. Krok **B4** – deesterifikace *t*butylesterů a hydrolýza ethoxykarbonylové skupiny – probíhal bez větších problémů. Ke ztrátě produktu z kroku **B4** však došlo při finálním čištění na aniontovém iontoměniči Dowex 1.

Syntetická cesta C byla použita při přípravě komplexů pro luminiscenční měření v Durhamu v Anglii, jelikož ligandy DO3ANBnP a DO3ANP jsou při této syntetické strategii meziprodukty. Jako výchozí komponenta této syntézy je aminoethanol, který reakcí s benzaldehydem vytváří Schiffovu bázi, která je následně redukována pomocí NaBH₄. Krok **C1** tedy poskytuje velice dobré výtěžky a reakci je možné provádět v gramových škálách. Se vzniklým benzylaminoethanolem v kroku **C2** probíhá reakce Mannichova typu, která opět dává prakticky kvantitativní výtěžky. U zpracování reakce **C2** byl taktéž pozorován problém s degradací produktu, stejně jako v případě **A1**. Reakce **C3** byla prováděna pouze s MsCl. Mesylát z kroku **C3** byl použit pro zavedení pendantního ramena na cyklus *t*Bu₃DO3A. Během kroku **C5** byly odstraněny *t*butylestery z karboxylátů a ethylestery

z fosfonátové skupiny pendantního ramena. Byl získán ligand DO3ANBnP. Hydrogenací DO3ANBnP byl v kroce C6 získán ligand DO3ANP. Reakcí C7 – Eschweilerovou–Clarkovou methylací v kyselině mravenčí byl získán finální ligand DO3ANMeP.

Při studiu stability fosforových produktů kroků A1 a C2 byl proveden pokus, kdy *N*-methylový derivát byl promyt skrze iontoměnič co možná nejrychleji, a naopak *N*-benzylový derivát byl ponechán absorbovaný na iontoměniči přes noc. Výsledkem byla minimální fosforová „nečistota“ v případě *N*-Me derivátu, avšak u *N*-Bn derivátu došlo k cca 50% konverzi produktu Mannichovy reakce na „nečistotu“. V prostředí kyseliny trifluoroctové přechází oba ^{31}P NMR signály v jeden, který svým chemickým posunem odpovídá plně deesterifikovanému derivátu.

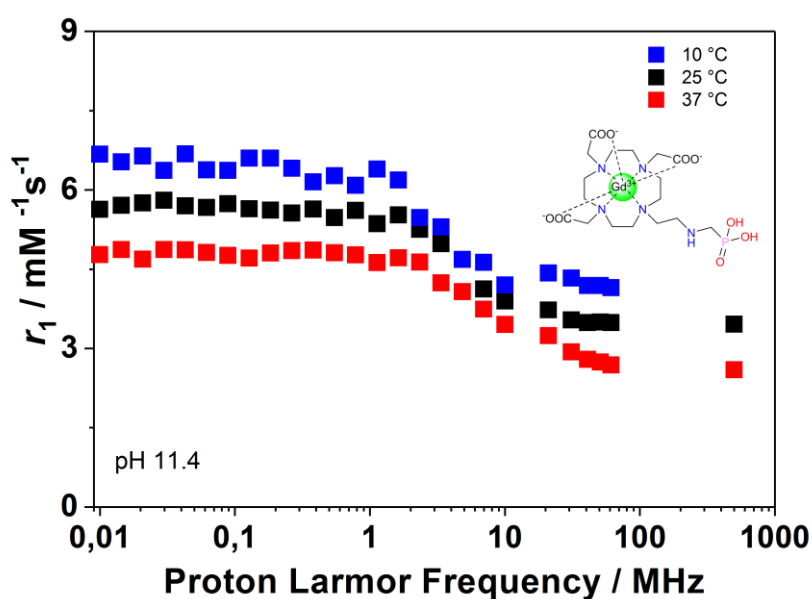
Na kvalitativní úrovni bylo otestováno několik syntetických strategií, které by v budoucnu měly vést k derivátu DO3ANTfEP. Kritickou se částí je bezesporu redukce trifluoracetamido prekurzoru na trifluorethyl derivát pro přípravu pendantních ramen. Redukce byla pozorována při použití LiAlH_4 s TMSCl a také při použití 1M BH_3 v THF. Dále byla studována možnost přípravy BH_3 *in situ* z NaBH_4 . Jako levná a funkční metoda se ukázala být reakce NaBH_4 s I_2 .

Komplexace připravených ligandů byly bezproblémové. Jelikož však probíhají pomalu, bylo nutné neutralizovat směs ligandu a soli lanthanoidu přísadky báze po malých dávkách, aby nedocházelo k vylučování nerozpustného hydroxidu. Nakonec byla reakční směs zahřívána při pH 7–8 přes noc při 60 °C. Tímto způsobem byly získány komplexy $\text{Ln}^{3+}\text{DO3ANP}$ ($\text{Ln} = \text{Eu}, \text{Gd}, \text{Dy}, \text{Yb}$), EuDO3ANBnP a EuDOANMeP , na kterých byla následně prováděna měření diskutovaná dále.

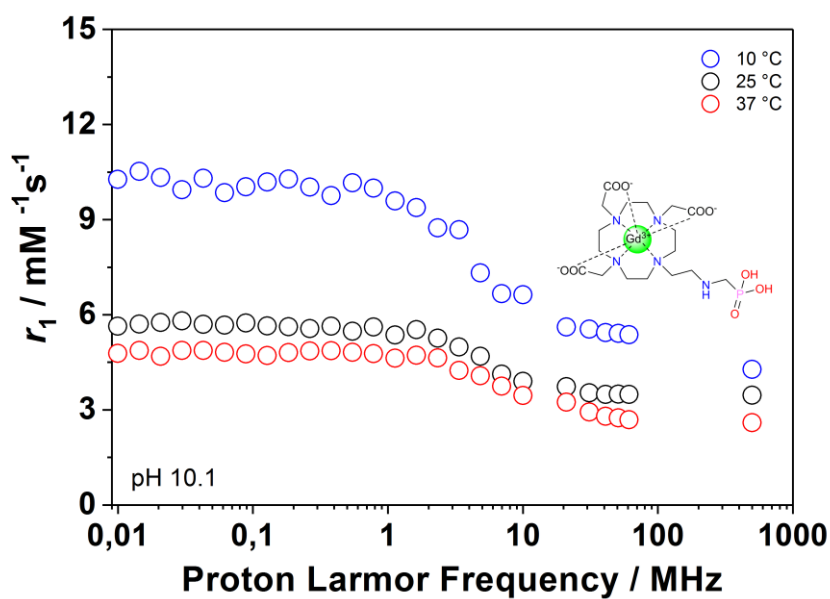
NMR studium

Relaxivita GdDO3ANP

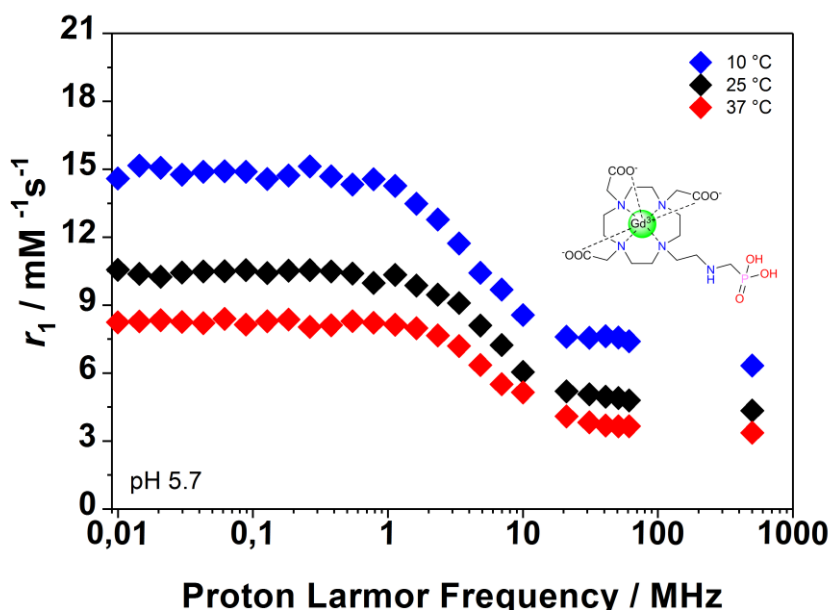
Byly naměřeny ^1H NMRD profily látky GdDO3ANP při různých hodnotách pH (11,4 (Obrázek 14), 10,1 (Obrázek 15) a 5,7 (Obrázek 16)) pro 3 různé teploty (10, 25, 37 °C). U všech zmíněných NMRD profilů je patrné, že nejvyšších hodnot relaxivity se dosahuje při nižších teplotách, v tomto případě při 10 °C. Porovnání NMRD profilů při teplotě 10 °C pro 3 odlišná pH je zobrazeno na Obrázek 17.



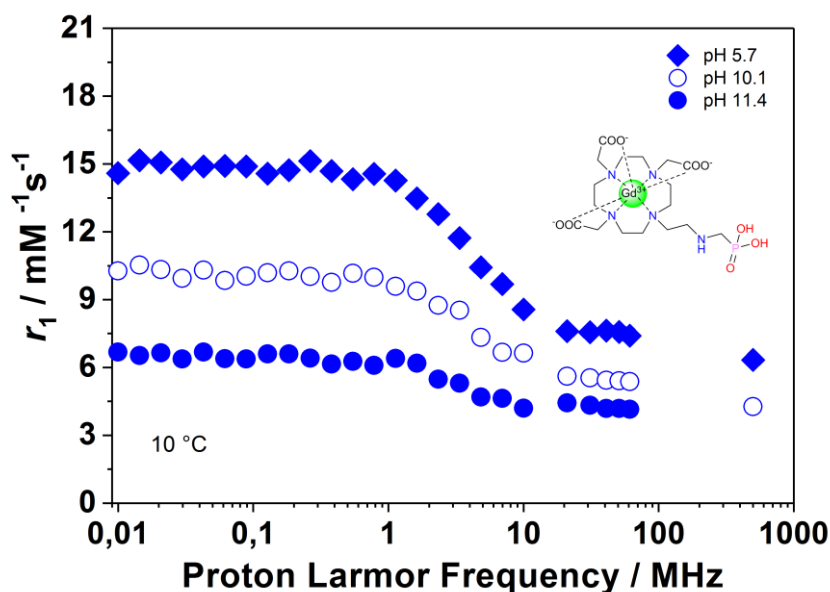
Obrázek 14 ^1H NMRD profil pro GdDO3ANP při teplotách 10, 25 a 37 °C a při pH 11,4



Obrázek 15 ^1H NMRD profil pro GdDO3ANP při teplotách 10, 25 a 37 °C a při pH 10,1



Obrázek 16 ^1H NMRD profil pro GdDO3ANP při teplotách 10, 25 a 37 °C a při pH 5,7

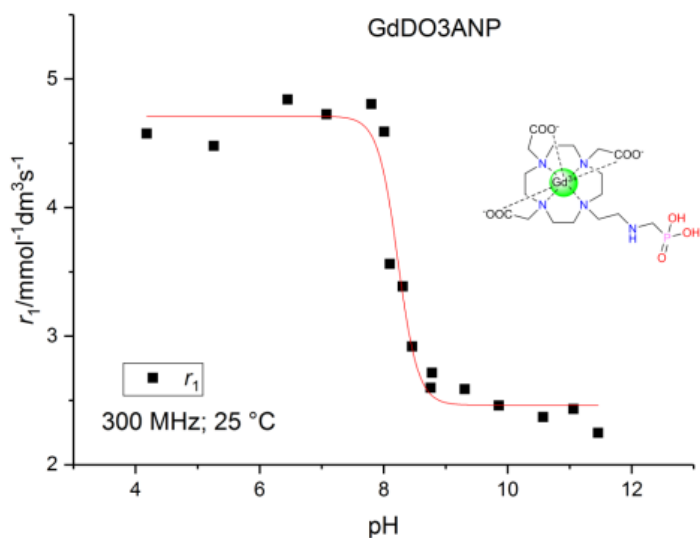


Obrázek 17 Porovnání ^1H NMRD profilů při teplotě 10 °C pro hodnoty pH 5,7, 10,1 a 11,4

Z výše uvedených NMRD profilů vyplývá, že u komplexu GdDO3ANP dochází ke změně počtu molekul koordinované vody. Vyšší relaxivita pozorovaná v kyselém prostředí jednoznačně svědčí o $q = 1$, zatímco pokles relaxivity pozorovaný v bazickém prostředí odpovídá $q = 0$, a relaxivita v bazickém prostředí je řízena pouze příspěvkem vnější hydratace.[40] Naměřené hodnoty pro pH = 10,1 daly prostor pro otázku, zdali je zastoupení „bazické částice“ při pH = 10,1 100%. Odpověď na tuto otázku poskytly měření DIS a ^{17}O teplotně závislé experimenty, které potvrdily, že při pH = 10 je q stejné, jako při pH = 11,4.

Úskalím měření NMRD profilů v italské Alessandrii, je již zmiňovaná odlišná metoda BMS měření. Chyba v určení koncentrace pomocí BMS, se bezpodmínečně musí projevit na výsledcích NMRD profilů, jelikož veličina r_1 je koncentračně nezávislá.

Pro lepší určení závislosti q na pH byla provedena pH ^1H relaxivní titrace GdDO3ANP na stroji o frekvenci 300 MHz (Varian300).(Obrázek 18)

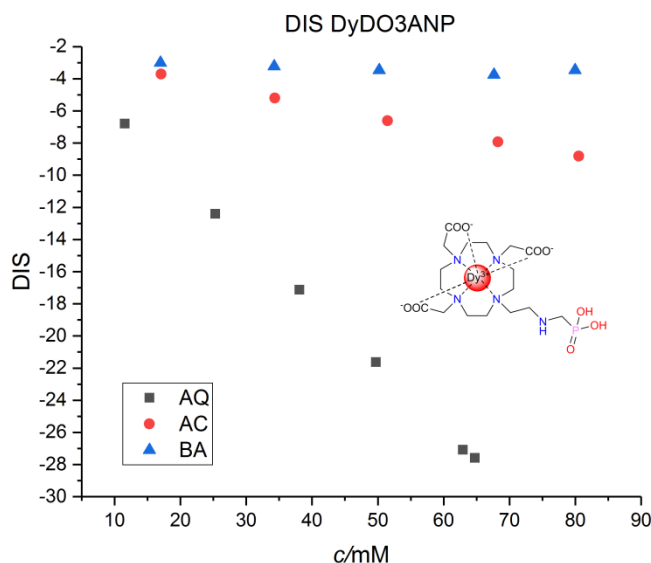


Obrázek 18 ^1H Relaxivní titrace GdDO3ANP prováděná na Varian 300 MHz při 25°C

Celkovou relaxivitu ovlivňují i molekuly vody v tzv. *second sphere*. [40] Inflexní bod titrační křivky přísluší hodnotě pH, která je téměř totožná s hodnotami pK_A pro komplex EuDO3ANP. [29]

^{17}O DIS DyDO3ANP

Na Obrázek 19 je zobrazená vynesená závislost DIS (rovnice 4) na koncentraci komplexu, potažmo aqua komplexu Dy^{3+} , u kterého se literatura rozchází v tom, jestli se jedná o $\text{Dy}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_8$ [37] nebo $\text{Dy}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_9$. [36] Červeně je znázorněna závislost pro referenční aqua komplex, modře je pak komplex DyDO3ANP v bazickém prostředí a černě je znázorněn tentýž komplex v kyselém prostředí. Ze směrnic vzniknuvších přímk byly dle rovnice (5) dopočítány hodnoty q pro obě hodnoty pH. Hodnoty q jsou uvedeny v Tabulka 4.



Obrázek 19 Graf závislosti DIS ^{17}O na koncentraci – DyDO3ANP (modré trojúhelníky pH = 9,5–10,0; červené puntíky pH = 5,5–6,0) a Dy-aquakomplexu

Na základě experimentů DIS u látky DyDO3ANP byly vypočteny hodnoty q pro kyselou i bazickou částici (Tabulka 4).

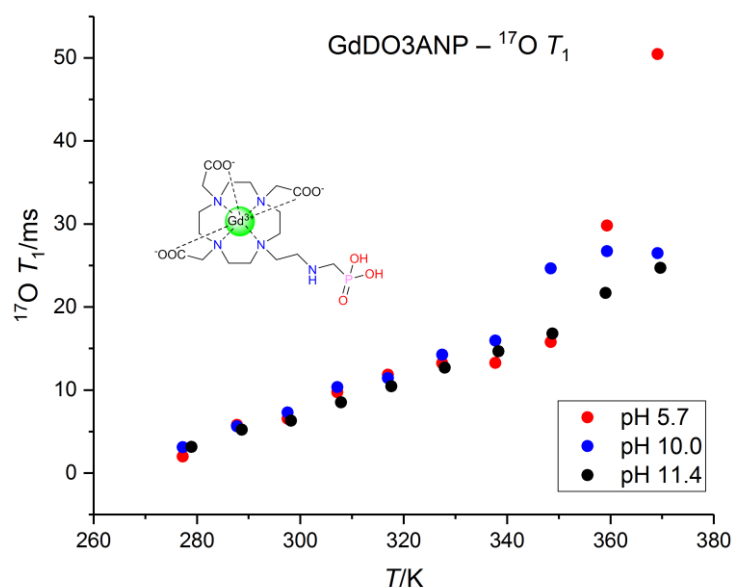
Tabulka 4 Vypočtené hodnoty q z DIS experimentu pro DyDO3ANP.

pH	q pro referenci $\text{Dy}(\text{H}_2\text{O})_8^{3+}$	q pro referenci $\text{Dy}(\text{H}_2\text{O})_9^{3+}$
9,5 – 10,0	0,19	0,21
5,5 – 6,0	1,65	1,85

Hodnoty q pro DyDO3ANP v bazickém prostředí odpovídají tomu, že molekula neobsahuje žádnou *inner-sphere* vodu. Vypočtená hodnota q je nenulová kvůli vlivu druhé hydratační sféry v okolí fosfonátu. V kyselém prostředí bylo pozorováno $q = 1$ a vyšší vliv vod druhé sféry. Pro komplex DyDO3ANP byla pomocí metody DIS prokázána změna počtu molekul vody koordinované na centrální atom v závislosti na pH.

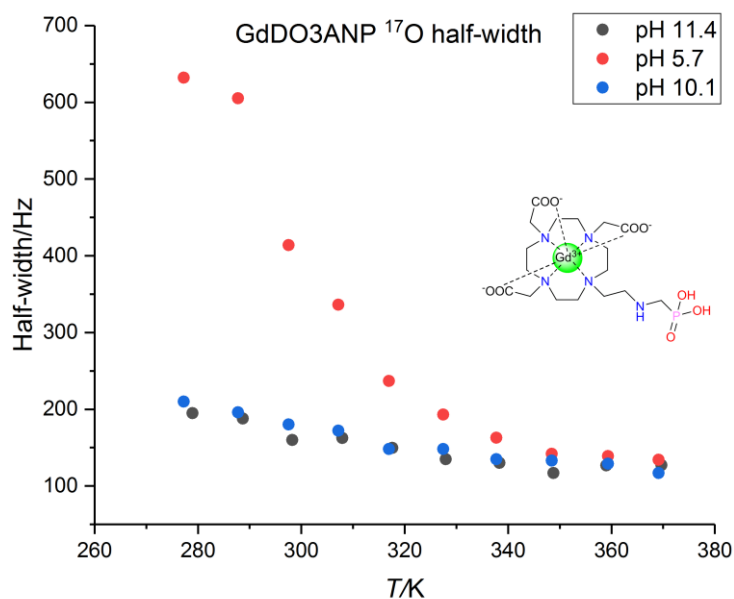
Teplotní závislost ^{17}O NMR GdDO3ANP

Z grafu na Obrázek 20 je patrné, že T_1 relaxační časy H_2^{17}O jsou na pH nezávislé. Při teplotách nad 75 °C/ 348 K se kyveta uvnitř značně rosila, což v konečném důsledku ovlivňovalo koncentraci komplexu v roztoku, proto jsou poslední 3 body značně nepravidelně odchýleny od předchozího trendu.



Obrázek 20 Teplotní závislost T_1 ^{17}O – GdDO3ANP

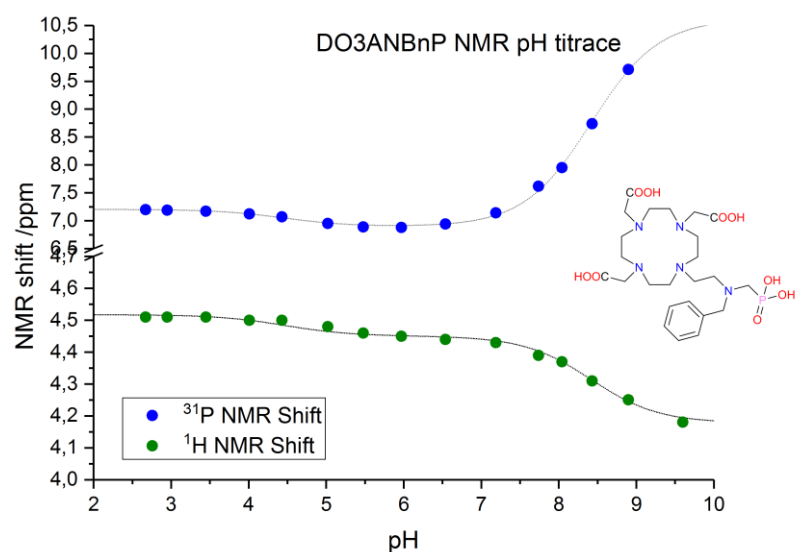
Oproti tomu, pološířka ^{17}O NMR signálu, která je významně ovlivněna relaxačním časem T_2 (nepřímo úměrně), vykazuje významnou pH závislost (viz *Obrázek 21*). T_2 relaxace je velmi ovlivňována kontaktem molekul vody s centrálním iontem Gd^{3+} . V kyselém prostředí je zjevně v komplexu GdDO3ANP koordinována molekula vody, která se rychle vyměňuje s okolními molekulami. V bazickém prostředí pak buď výměna s okolními molekulami zcela ustane (což je velmi nepravděpodobné), nebo nedochází ke koordinaci, což je v souladu se spekulativním předpokladem ([29]) i s výsledky měření DIS (*Obrázek 19*).



Obrázek 21 Teplotní závislost pološířky signálů ^{17}O H_2^{17}O – GdDO3ANP

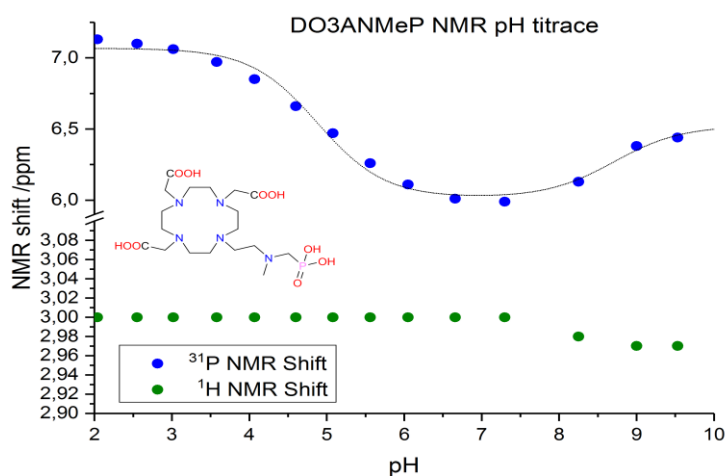
pH NMR titrace ligandů DO3ANBnP a DO3ANMeP

Pro účely studia protonizace molekuly byly provedeny pH NMR titrace jader ^1H a ^{31}P . U jádra ^1H byly studovány změny chemického posunu u atomů, které se nachází nejbližší dusíku terciárního aminu pendantního ramena (Me/ CH_2Bn). Fitováním byly získány přibližné hodnoty $\text{p}K_{\text{A}}$ pro systém v těžké vodě. Hodnoty v H_2O by nabývaly jiných hodnot. Přepočtu pD na pH se věnuje spousta studií. Často používaný vztah je pak $\text{pD} = \text{pH}^* + 0,41$, kde pH^* je hodnota odečtená z pH metru při měření v D_2O . Závislosti chemických posunů ^1H a ^{31}P NMR na pH^* je vynesena na *Obrázek 22* (DO3ANBnP) a na *Obrázek 23* (DO3ANMeP).



Obrázek 22 pH NMR titrace ligandu DO3ANBnP

Pro látku DO3ANBnP byly získány hodnoty $\log\beta_1 = 8,83(2)$ a $\log\beta_2 = 13,7(1)$. Výsledná pK_A pak jsou 8,8 a 4,9 pro systém v těžké vodě.



Obrázek 23 pH NMR titrace ligandu DO3ANMeP

Pro látku DO3ANMeP byly získány hodnoty $\log\beta_1 = 9,1(2)$ a $\log\beta_2 = 14,4(2)$. Výsledná pK_A pak jsou 9,1 a 5,3 pro systém v těžké vodě. Chemický posun methylové skupiny terciárního aminu pendantního ramena je téměř konstantní, proto nebyla provedena simulace proložení a chemické posuny nebyly použity pro výpočet protonizačních konstant.

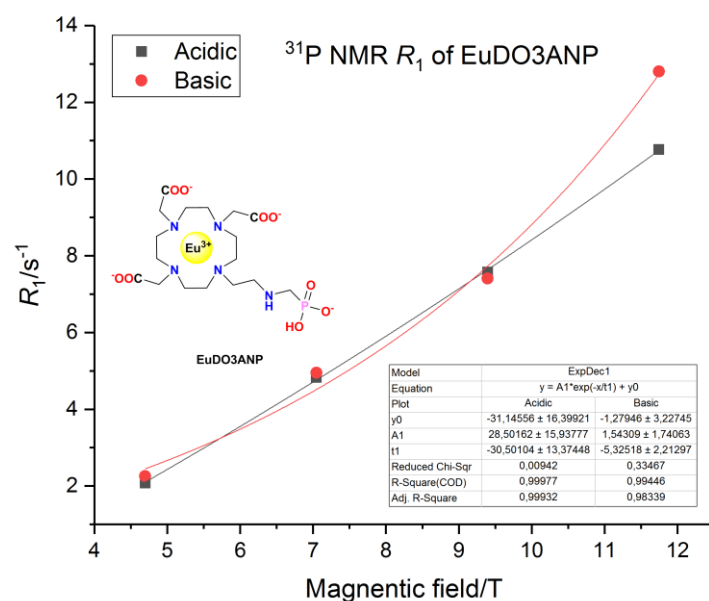
Na základě pH NMR titrací byly určeny hodnoty pK_A fosfonátové a aminové funkční skupiny pedantního ramene pro oba ligandy. Hodnoty pK_A byly získány na základě změny chemického posunu v závislosti na pH pomocí fitování v programu Opium. Pro DO3ANMeP jsou hodnoty pK_A 9,1 pro aminoskupinu a 5,3 pro fosfonát. V případě DO3ANBnP jsou hodnoty pK_A 8,8 pro aminoskupinu a 4,9 pro fosfonát. Při porovnání s hodnotami pK_A zjištěných pomocí NMR titrace u DO3ANP [29], kde pK_A aminoskupiny činí 9,4 a fosfonátu 6,0 je zjevné, že terciární aminy jsou v souladu s očekáváním méně bazické, avšak fosfonáty u derivátů DO3ANBnP a DO3ANMeP jsou znatelně kyslejší. Výsledné odlišné hodnoty mohou být z části způsobeny použitím odlišného titračního činidla, kdy v případě DO3ANMeP a DO3ANBnP byly titrovány NaOD, což může vést ke slabé koordinaci Na^+ vyvolávající snížení pK_A fosfonátu, na rozdíl od publikované titrace DO3ANP, která byla prováděna pomocí NMe_4OH .

^{31}P NMR YbDO3ANP

V rámci řady lanthanoidů hraje významnou roli i velikost centrálního atomu. V případě komplexu YbDO3ANP nebyla pozorována změna chemického posunu ^{31}P jako v případě EuDO3ANP, což může být důsledkem přednostního koordinačního čísla 9 pro Eu^{3+} , a naopak 8 pro Yb^{3+} . Měření ^{31}P NMR bylo prováděno při pH 4,0, 5,3 a 10,0 a chemický posun se pohyboval od -62 do -72 ppm. Relaxační časy T_1 pro YbDO3ANP byly cca čtvrtinové v porovnání s EuDO3ANP – 0,025 s resp. 0,1 s při magnetickém poli 11,7 T. Hodnota chemického posunu, stejně jako hodnota relaxačního času, svědčí o koordinaci fosfonátové skupiny, avšak se změnou pH nenastává v případě malého ytterbitého iontu žádná zásadní změna koordinační geometrie.

^{31}P NMR T_1 relaxace EuDO3ANP

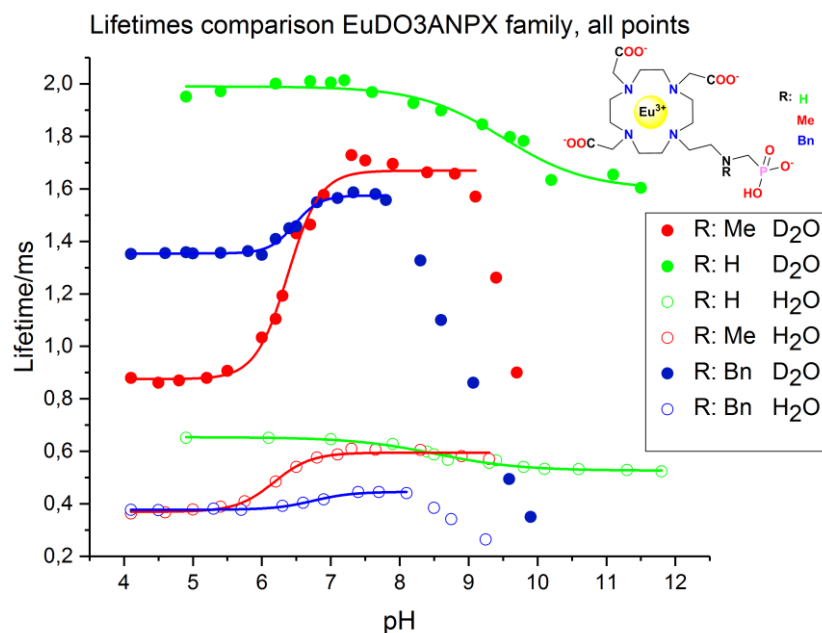
Na základě porovnání relaxačních časů ^{31}P NMR signálu EuDO3ANP bylo zjištěno, že fosfonátová funkční skupina je koordinovaná v obou módech. Relaxační časy T_1 (potažmo relaxivity) jsou pro obě částice při započítání experimentální chyby stejné. Závislost R_1 na magnetickém poli pro obě částice je uvedena na *Obrázek 24*.



Obrázek 24 Závislost ^{31}P R_1 na magnetickém poli pro EuDO3ANP. Černý čtvereček zastupuje pH = 5,7 a červené kolečko pH = 10.

Luminiscenční měření EuDO3AN(R)P

V rámci luminiscenčních studií na univerzitě v Durhamu byly měřeny doby života excitovaných stavů (Life-time) a emisní spektra u komplexů EuDO3ANP, EuDO3ANMeP a EuDO3ANBnP. Na *Obrázek 25* je znázorněna závislost dob života na pH pro všechny tři EuDO3AN(R)P komplexy v D_2O i v H_2O . Tyto hodnoty byly použity pro výpočet q u jednotlivých komplexů (Tabulka 5).



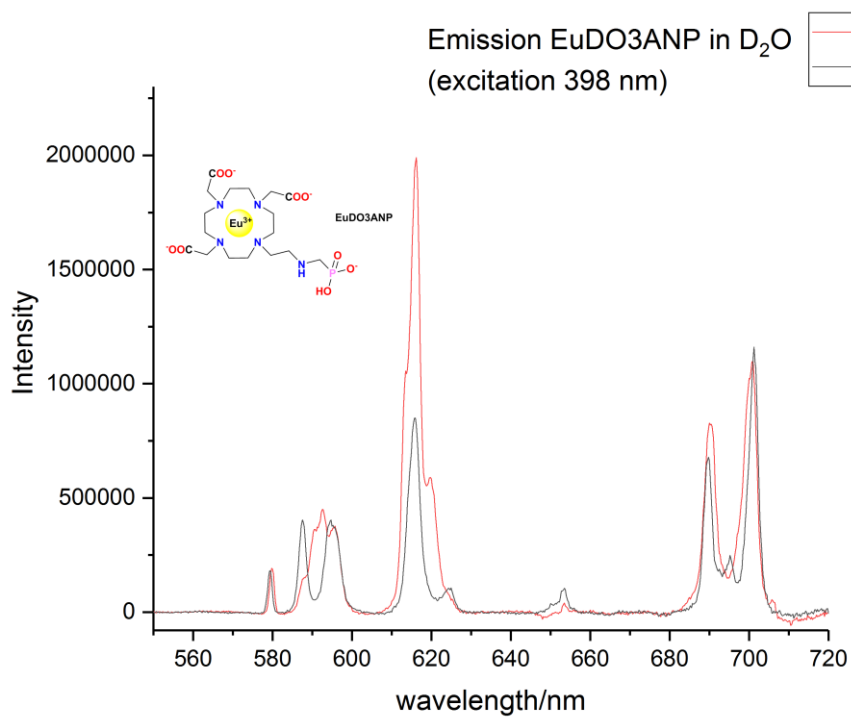
Obrázek 25 Vynesení závislosti dob života na pH pro komplexy EuDO3AN(R)P

Tabulka 5 Vypočtené hodnoty q z dob života pro komplexy EuDO3AN(R)P

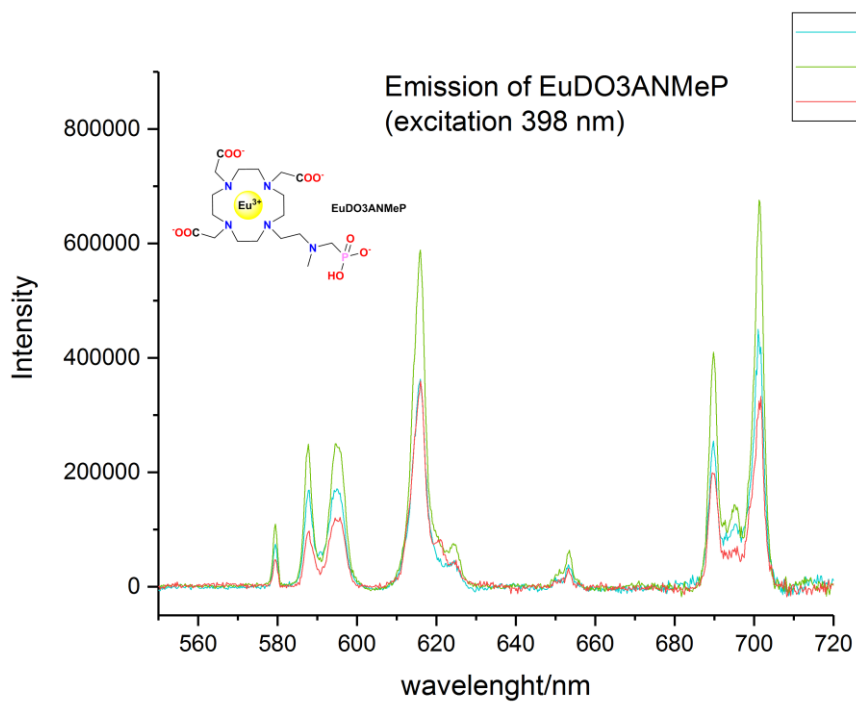
Komplex	q (kyselá oblast)	q (bazická oblast)
EuDO3ANP	0.95	1.22
EuDO3ANMeP	1.57	0.98
EuDO3ANBnP	1.96	1.66

V případě EuDO3ANP je hodnota $q = 1,22$ pro bazickou oblast zavádějící, jelikož dochází ke změně módu koordinace (což je patrné z emisních spekter na *Obrázek 26*) a chybějící molekulu koordinované vody nahrazuje ve zhášení koordinace sekundárního aminu. N-H vibrace je také efektivním zhášecem. [47]

Pro lepší přehlednost v případné změně spekter je zobrazeno jenom několik bodů z titrace každého komplexu EuDO3A(R)P. Kompletní soubor spekter jednotlivých titrací je uveden v Apendixu (*Apendix 1* pro EuDO3ANBnP, *Apendix 2* EuDO3ANMeP, *Apendix 3* pro EuDO3ANP).



Obrázek 26 Vybraná luminiscenční spektra z pH titrace EuDO3ANP v D₂O



Obrázek 27 Vybraná luminiscenční spektra z pH titrace EuDO3ANMeP v D₂O

Závěr

Pomocí NMR, relaxivních a luminiscenčních měření prováděných na komplexech Eu^{3+} , Gd^{3+} a Dy^{3+} s ligandem DO3ANP byla potvrzena hypotéza o pH závislých módech koordinace. Pomocí DIS a NMRD bylo zjištěno, že v kyselé oblasti se v komplexech DyDO3ANP a GdDO3ANP vyskytuje jedna koordinovaná molekula vody, v bazickém prostředí nikoliv. U obou metod byl pozorován vliv tzv. „second sphere“ molekul vody, tj. molekul vody vyskytujících se v blízkosti komplexní částice.

Dále byly připraveny a dále studovány ligandy DO3ANMeP a DO3ANBnP (který je prekurzorem DO3ANP). Od těchto ligandů byly připraveny komplexy s Eu^{3+} , na kterých byl pozorován vliv terciárního aminu na pH závislost koordinace v porovnání s původním sekundárním aminem.

U všech Eu^{3+} komplexů byly zjištěny počty koordinovaných vod pomocí pH lifetime titrací. U EuDO3ANP byla zjištěna jedna molekula koordinované vody v kyselém prostředí, naopak v bazickém prostředí byla nepřímo zjištěná koordinace sekundárního aminu (N-H quencher) a absence koordinované vody v „inner sphere“. V Případě EuDO3ANMeP zřejmě nedochází ke koordinaci terciárního aminu pendantního ramena, a proto bylo pozorováno $q = 1$ pro oblast mezi pH 4 a 10. U EuDO3ANBnP zjevně nedochází ke koordinaci, vzhledem k objemnosti benzylové skupiny, a počet molekul koordinovaných v komplexu je 2.

Na základě ^{31}P T_1 relaxačních časů, změně módu v emisních spektrech a ztrátě vody v bazické oblasti, bylo zjištěno, že u komplexu EuDO3ANP dochází při změně koordinace v bazické oblasti k přesunu fosfonátové skupiny do axiální polohy, kde vytlačí molekulu koordinované vody. Místo fosfonátu v ekvatoriální poloze pak zaujímá sekundární amin. Toto pozorování potvrzuje hypotézu založenou na interpretaci dvoudimenzionálních NMR spekter. [29]

Při přípravě DO3ANMeP byla vyzkoušena syntetická dráha, která vycházela z *N*-methylovaného aminoethanolu. Tato syntetická cesta má několik úskalí, která by však mohla být v budoucnu optimalizací eliminována. Ligand DO3ANMeP byl nakonec připraven dvěma cestami z makrocyclických prekurzorů, a to zavedením fosfonátové skupiny na DO3ANN pomocí Mannichovy reakce, a methylací sekundární skupiny

v DO3ANP pomocí Eschweilerovy–Clarkeovy reakce. Obě cesty poskytly cílový ligand DO3ANMeP ve velmi vysokém výtěžku.

V rámci této práce byly vyzkoušeny různé typy zavádění CF_3CH_2- skupiny, které budou v budoucnu využity pro přípravu ligandu DO3ANTfeP.

Použité zkratky

BMS	Bulk Magnetic Susceptibility
Bn	Benzyl
CSI	Chemical Shift Imaging
CT	Computed Tomography
DEP	Diethylfosfit
DIS	Dysprosium Induced Shift
DCM	Dichlormethan
FDG	2-deoxy-2(¹⁸ F)-D-glukóza
MeCN	Acetonitril
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MRSI	Magnetic Resonance Spectroscopy Imaging
Me	Methyl
Ms	Mesyl – methansulfonyl
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nt	number of transients – počet scanů
PET	Positron Emission Tomography
pw	Puls width – šíře pulsu
RT	Room Temperature
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
TEA	Triethylamin
TEP	Triethylfosfit
TFA	Kyselina trifluoroctová
Tfe	Trifluorethyl
TLC	Thin Layer Chromatography
Ts	Tosyl – p-toluensulfonyl
TMS	Trimethylsilyl
sf	standard frequency
ÚJV	Ústav jaderného výzkumu
ZCl	Benzyloxykarbonylchlorid

Zdroje

- [1] I. Hassan *et al.*, “Nuclear Medicine Original article Segmental analysis of SPECT 99mTc-methoxy isobutyl,” *Med. Nucl.*, 99–100, **1990**.
- [2] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, and C. J. Anderson, “Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease,” *Chem. Rev.*, 110, 2858–2902, **2010**.
- [3] K. Yoshinaga, R. Klein, and N. Tamaki, “Generator-produced rubidium-82 positron emission tomography myocardial perfusion imaging-From basic aspects to clinical applications,” *J. Cardiol.*, 55, 163–173, **2010**.
- [4] A. Kato, Y. Lucas, and M. Diksic, “Tracer Autoradiography for Simultaneous Measurement of LCBF and LCGU,” 896–901.
- [5] ÚJV Řež, “PET radiofarmaka v ČR a naše PET centrum Na Homolce - setkání s novináři,” **2018**. [Online]. Available: <https://www.ujv.cz/cs/aktuality/pet-radiofarmaka-v-cr-a-nase-pet-centrum-na-homolce-setkani-s-novinari-11521>. [Accessed: 11-May-2018].
- [6] M. Benešová *et al.*, “Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer,” *J. Nucl. Med.*, 56, 914–920, **2015**.
- [7] M. H. Levitt, *Spin dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. John Wiley & Sons, Ltd, **2001**.
- [8] X. H. Li *et al.*, “Abdominal MRI at 3.0 T: LAVA-flex compared with conventional fat suppression T1-weighted images,” *J. Magn. Reson. Imaging*, 40, 58–66, **2014**.
- [9] F. Bloch, W. W. Hansen, and M. Packard, “The Nuclear Induction Experiment,” *Phys. Rev.*, 70, 474–485, **1946**.
- [10] P. C. Lutterbur, M. H. Mendoca-Dias, and A. M. Rudin, *Frontiers of Biological Energetics*. New York: Academics Press, **1978**.
- [11] C. Klein *et al.*, “The intravascular contrast agent ClariscanTM (NC 100150 injection) for 3D MR coronary angiography in patients with coronary artery disease,” *Magma Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.*, 11, 65–67, **2000**.
- [12] K. M. Ward, A. H. Aletras, and R. S. Balaban, “A New Class of Contrast Agents for MRI Based on Proton Chemical Exchange Dependent Saturation Transfer (CEST),” *J. Magn. Reson.*, 143, 79–87, **2000**.
- [13] T. Krchová, A. Gálisová, D. Jiráček, P. Hermann, and J. Kotek, “Ln-complexes of a

- DOTA analogue with an ethylenediamine pendant arm as pH-responsive PARACEST contrast agents,” *Dalt. Trans.*, 45, 3486–3496, **2016**.
- [14] “Blockimaging.com,” **2018**. [Online]. Available: https://info.blockimaging.com/bid/92623/MRI-Machine-Cost-and-Price-Guide?_ga=2.42713197.998363477.1526066998-768304403.1524570786. [Accessed: 11-May-2018].
- [15] “Statista,” *Number of magnetic resonance imaging (MRI) units in selected countries as of 2016 (per million population)*, **2018**. [Online]. Available: <https://www.statista.com/statistics/282401/density-of-magnetic-resonance-imaging-units-by-country/>. [Accessed: 11-May-2018].
- [16] D. F. Van Wijk *et al.*, “Increasing spatial resolution of 3T MRI scanning improves reproducibility of carotid arterial wall dimension measurements,” *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.*, 27, 219–226, **2014**.
- [17] SÚKL, “Kontrastní látky obsahující gadolinium - konečné stanovisko EMA,” **2017**. [Online]. Available: <http://www.sukl.cz/kontrastni-latky-obsahujici-gadolinium-konecne-stanovisko>.
- [18] M. Srinivas, A. Heerschap, E. T. Ahrens, C. G. Figdor, and I. J. M. de Vries, “¹⁹F MRI for quantitative in vivo cell tracking,” *Trends Biotechnol.*, 28, 363–370, **2010**.
- [19] “Transplantace Langerhansových ostrůvků.” [Online]. Available: <https://www.ikem.cz/cs/transplantcentrum/klinika-transplantacni-chirurgie/co-uz-nas-lecime/transplantace/transplantace-langerhansovych-ostruvku/a-2471/>. [Accessed: 11-May-2018].
- [20] J. Blahut *et al.*, “Nickel complexes of N-CH₂ CF₃ cyclam derivatives as contrast agents for ¹⁹F magnetic resonance imaging,” *Dalt. Trans.*, 45, 474–478, **2016**.
- [21] F. Schmid, C. Höltke, D. Parker, and C. Faber, “Boosting ¹⁹F MRI - SNR efficient detection of paramagnetic contrast agents using ultrafast sequences,” *Magn. Reson. Med.*, 69, 1056–1062, **2013**.
- [22] F. Koucký, “Bakalářská práce,” **2016**.
- [23] U. Flogel *et al.*, “In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging,” *Circulation*, 118, 140–148, **2008**.
- [24] P. A. Bottomley, “Spatial Localization in NMR Spectroscopy in Vivo,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 508, 333–348, **1987**.
- [25] B. L. Van De Bank, M. C. Maas, L. J. Bains, A. Heerschap, and T. W. J. Scheenen, “Is visual activation associated with changes in cerebral high-energy phosphate

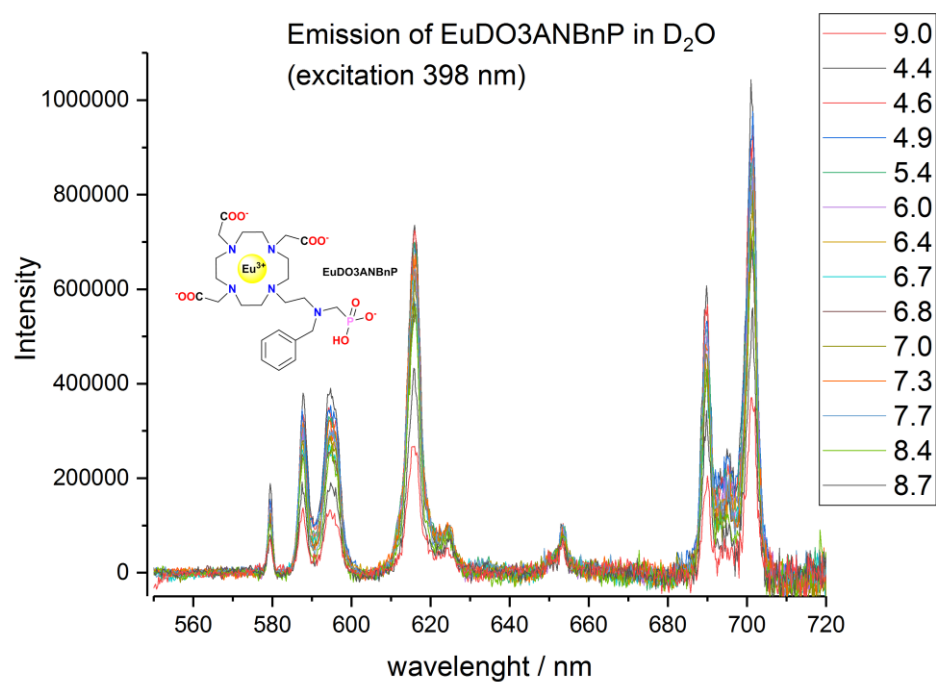
- levels ?,” *Brain Struct. Funct.*, 0, 0, **2018**.
- [26] L. Valkovič *et al.*, “Dynamic³¹P–MRSI using spiral spectroscopic imaging can map mitochondrial capacity in muscles of the human calf during plantar flexion exercise at 7 T,” *NMR Biomed.*, 29, 1825–1834, **2016**.
- [27] M. Stubbs, R. L. Veech, and J. R. Griffiths, “Tumor metabolism: The lessons of magnetic resonance spectroscopy,” *Adv. Enzyme Regul.*, 35, 101–115, **1995**.
- [28] R. J. Labotka and R. A. Kleps, “A Phosphate-Analogue Probe of Red Cell pH Using Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance,” *Biochemistry*, 22, 6089–6095, **1983**.
- [29] T. Krchová, V. Herynek, A. Gálisová, J. Blahut, P. Hermann, and J. Kotek, “Eu(III) Complex with DO3A-amino-phosphonate Ligand as a Concentration-Independent pH-Responsive Contrast Agent for Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS),” *Inorg. Chem.*, 56, 2078–2091, **2017**.
- [30] J. L. Sudmeier and C. N. Reilley, “Nuclear Magnetic Resonance Studies of Protonation of Polyamine and Aminocarboxylate Compounds in Aqueous Solution,” *Anal. Chem.*, 36, 1698–1706, **1964**.
- [31] C. F. G. C. Geraldes *et al.*, “Preparation, physico-chemical characterization, and relaxometry studies of various gadolinium(III)-DTPA-bis(amide) derivatives as potential magnetic resonance contrast agents,” *Magn. Reson. Imaging*, 13, 401–420, **1995**.
- [32] D. M. Corsi, C. Platas-Iglesias, H. Van Bekkum, and J. A. Peters, “Determination of paramagnetic lanthanide(III) concentrations from bulk magnetic susceptibility shifts in NMR spectra,” *Magn. Reson. Chem.*, 39, 723–726, **2001**.
- [33] S. Cotton, *Lanthanide and Actinide Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, **2006**.
- [34] “IFASonline.com.” [Online]. Available: http://ifasonline.com/chemicalScience_topic28.jsp. [Accessed: 11-May-2018].
- [35] M. J. A. Valérie C Pierre, *Contrast Agents for MRI: Experimental Methods (New Developments in NMR)*. **2017**.
- [36] J. Chen, *Application of Ionic Liquids on Rare Earth Green Separation and Utilization, Green Chemistry and Sustainable Technology*. Springer, **2015**.
- [37] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, and R. B. Lauffer, “Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications,” *Chem. Rev.*, 99, 2293–352, **1999**.
- [38] A. Merbach, L. Helm, and É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. John Wiley & Sons, Ltd, **2013**.

- [39] R. B. Lauffer, "Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation Agents for NMR Imaging: Theory and Design," *Chem. Rev.*, **87**, 901–927, **1987**.
- [40] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubiček, and I. Lukeš, "Gadolinium(iii) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes," *Dalt. Trans.*, 9226, 3027, **2008**.
- [41] G. Facey, "University of Ottawa NMR Facility Blog," *T1 Measurements and Estimation*, **2007**. [Online]. Available: <http://u-of-o-nmr-facility.blogspot.cz/2007/10/t1-measurements-and-estimation.html>. [Accessed: 11-May-2018].
- [42] K. H. Chalmers *et al.*, "Design principles and theory of paramagnetic fluorine-labelled lanthanide complexes as probes for ^{19}F magnetic resonance: a proof-of-concept study," *Chem. - A Eur. J.*, **16**, 134–148, **2010**.
- [43] J. Kotek *et al.*, "Lanthanide(III) Complexes of Novel Mixed Carboxylic-Phosphorus Acid Derivatives of Diethylenetriamine: A Step towards More Efficient MRI Contrast Agents," *Chem. - A Eur. J.*, **9**, 5899–5915, **2003**.
- [44] K. Binnemans, "Interpretation of europium(III) spectra," *Coord. Chem. Rev.*, **295**, 1–45, **2015**.
- [45] B. M. Walsh, "Judd-Ofelt theory: principles and practices brian m. walsh," *Int. Sch. At. Mol. Spectrosc.*, 403–433, **2006**.
- [46] M. P. Lowe and D. Parker, "Controllable pH modulation of lanthanide luminescence by intramolecular switching of the hydration state," *Chem. Commun.*, 707–708, **2000**.
- [47] A. Beeby *et al.*, "Non-radiative deactivation of the excited states of europium, terbium and ytterbium complexes by proximate energy-matched OH, NH and CH oscillators: an improved luminescence method for establishing solution hydration states," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **2**, 493–504, **1999**.
- [48] T. Krchová, J. Kotek, D. Jiráček, J. Havlíčková, I. Císařová, and P. Hermann, "Lanthanide(iii) complexes of aminoethyl-DO3A as PARACEST contrast agents based on decoordination of the weakly bound amino group," *Dalt. Trans.*, 42, 15735, **2013**.
- [49] M. S. Shim and Y. J. Kwon, "Controlled Delivery of Plasmid DNA and siRNA to Intracellular Targets Using Ketalized Polyethylenimine," 1–7, **2008**.
- [50] W. V. Curran and R. B. Angier, "Selective Borane Reduction of a Trifluoroacetamide Substituent in the Presence of a Carbamate," *J. Org. Chem.*, **31**, 3867–3868, **1966**.
- [51] M. Periasamy, "New Organic Synthetic Methods Using the NaBH_4/I_2 System," 65–

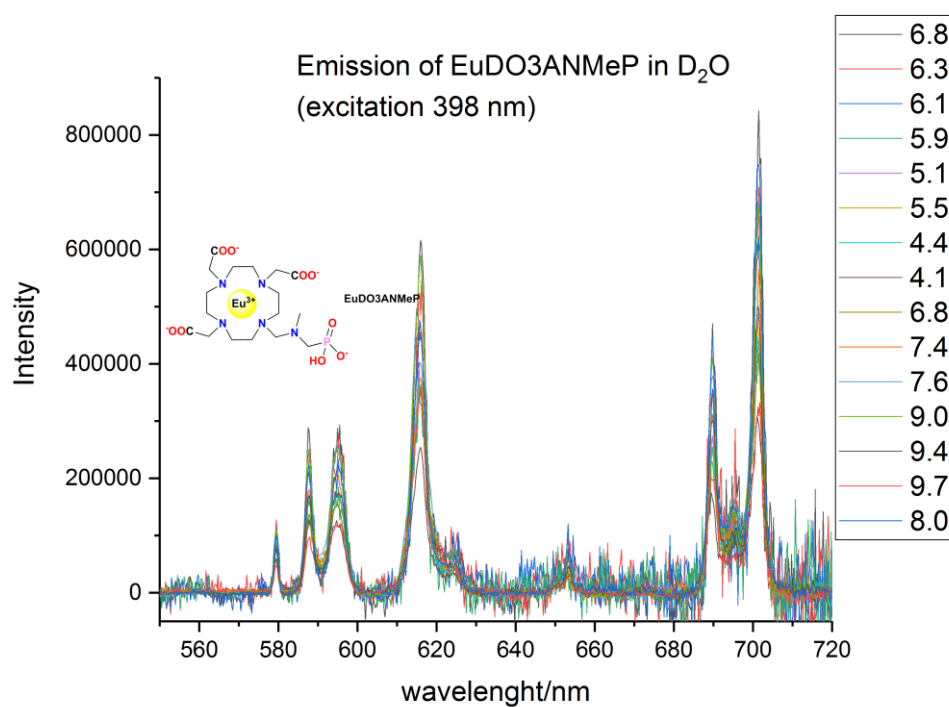
78, **2001**.

- [52] P. S. Liu, S. M. Denysenko, and G. Huang, "A process for the preparation of (Z)-endoxifen," WO 2017070651, **2017**.
- [53] D. L. Mohler and G. Shen, "The synthesis of tethered ligand dimers for PPAR γ -RXR protein heterodimers," *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 2082–2087, **2006**.
- [54] A. Sinclair, T. Bai, L. R. Carr, J. R. Ella-Menye, L. Zhang, and S. Jiang, "Engineering buffering and hydrolytic or photolabile charge shifting in a polycarboxybetaine ester gene delivery platform," *Biomacromolecules*, **14**, 1587–1593, **2013**.
- [55] H. T. Clarke, B. Gillespie, and S. Z. Weiss Haus, "The Action of Formaldehyde on Amines and Amino Acids," *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 4571–4587, **1933**.
- [56] M. K $\acute{y}$ vala and I. Lukeš, "Solution Equilibria Analysis with the OPIUM Computer Program." Pardubice, **1995**.
- [57] B. Alpha, R. Ballardini, V. Balzani, J. -M Lehn, S. Perathoner, and N. Sabbatini, "Antenna Effect in Luminescent Lanthanide Cryptates: a Photophysical Study," *Photochem. Photobiol.*, **52**, 299–306, **1990**.
- [58] D. Parker, I. Kuprov, E. Suturina, K. Mason, and C. Geraldes, "Beyond Bleaney's Theory: Experimental and Theoretical Analysis of Periodic Trends in Lanthanide Induced Chemical Shift," *Angew. Chemie Int. Ed.*, 12215–12218, **2017**.

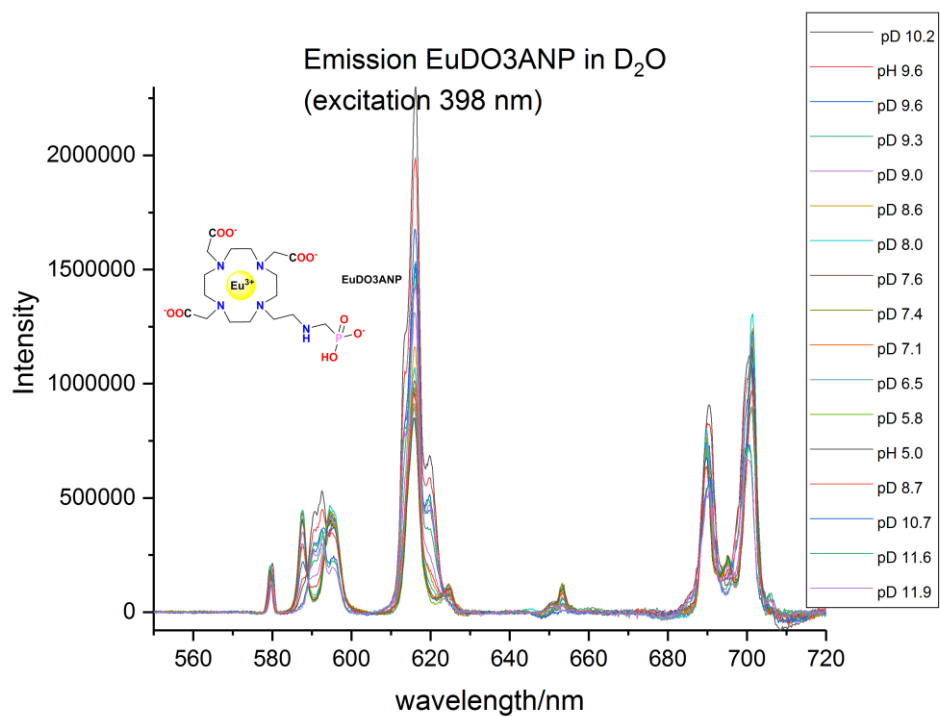
Appendix



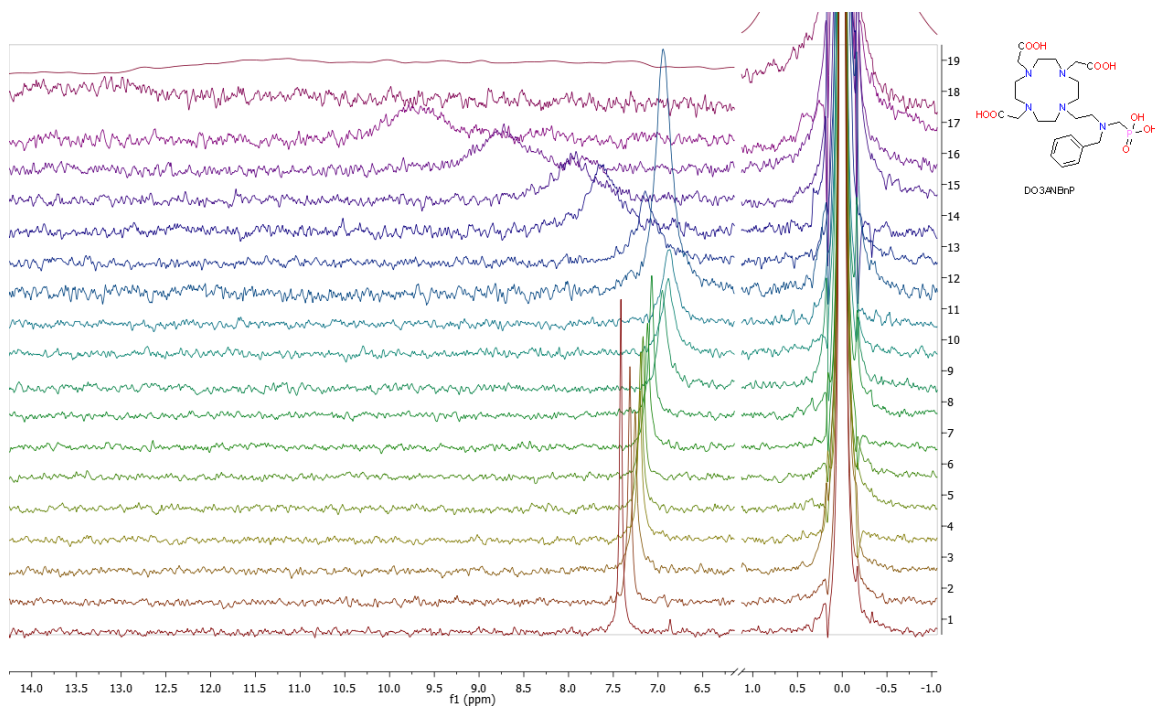
Appendix 1 Luminiscenční pH titrace EuDO3ANBnP v D₂O



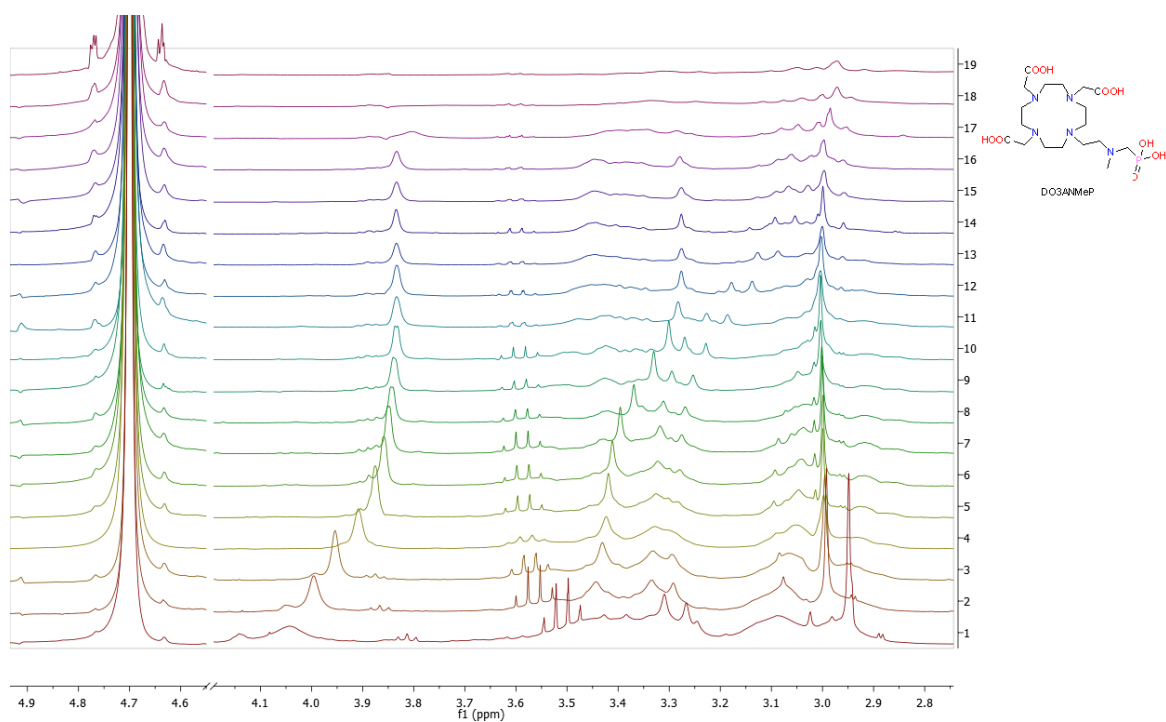
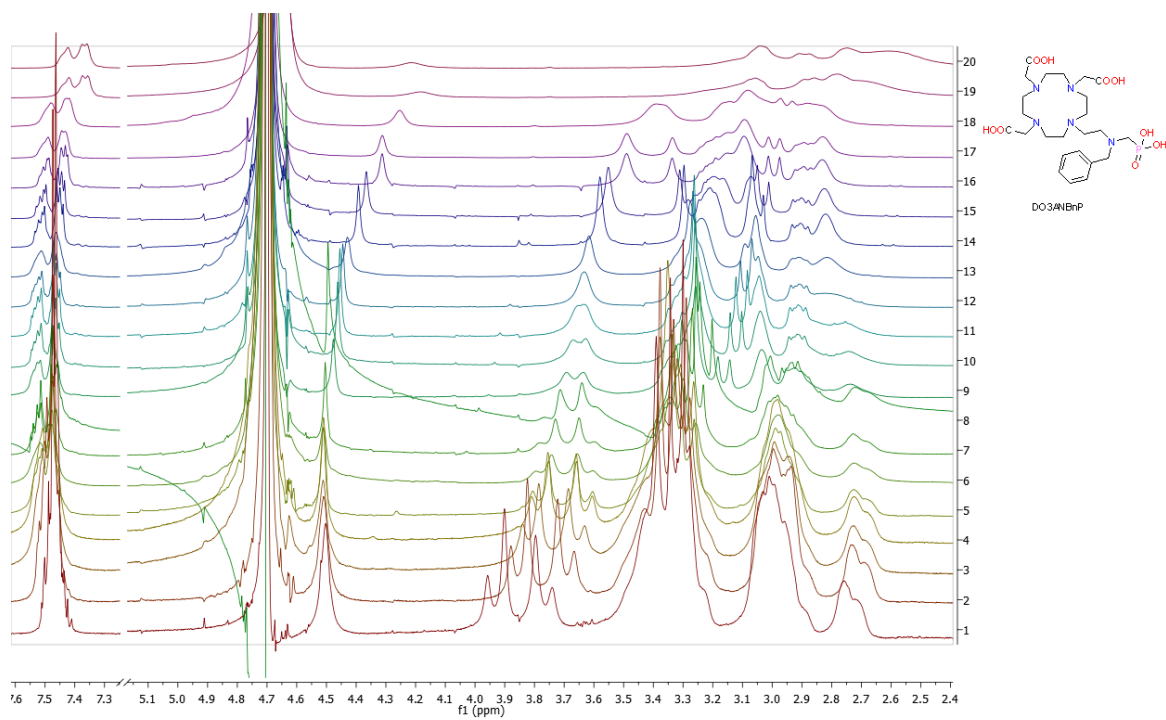
Appendix 2 Luminiscenční pH titrace EuDO3ANMeP v D₂O

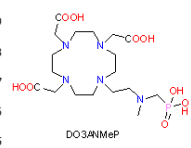


Appendix 3 Luminiscenční pH titrace EuDO3ANP v D₂O

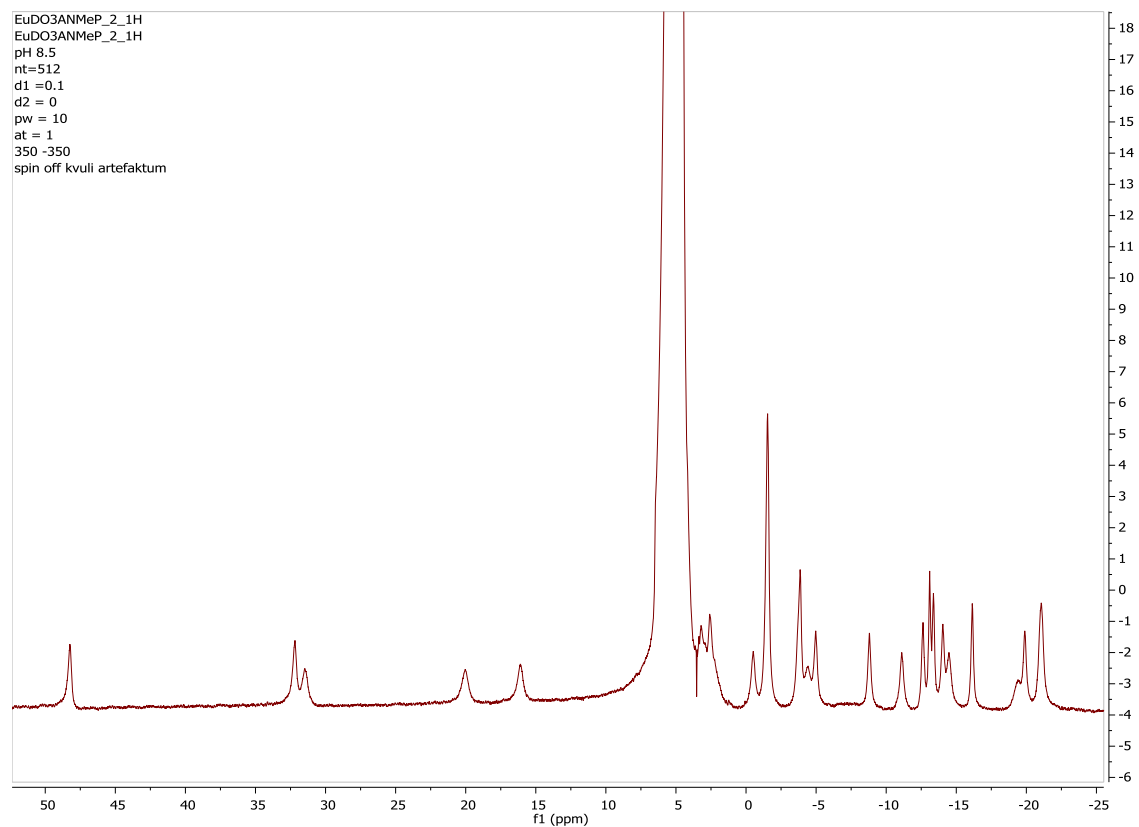


Appendix 4 pH ³¹P NMR titrace DO3ANBnP pD 0,9–10,4

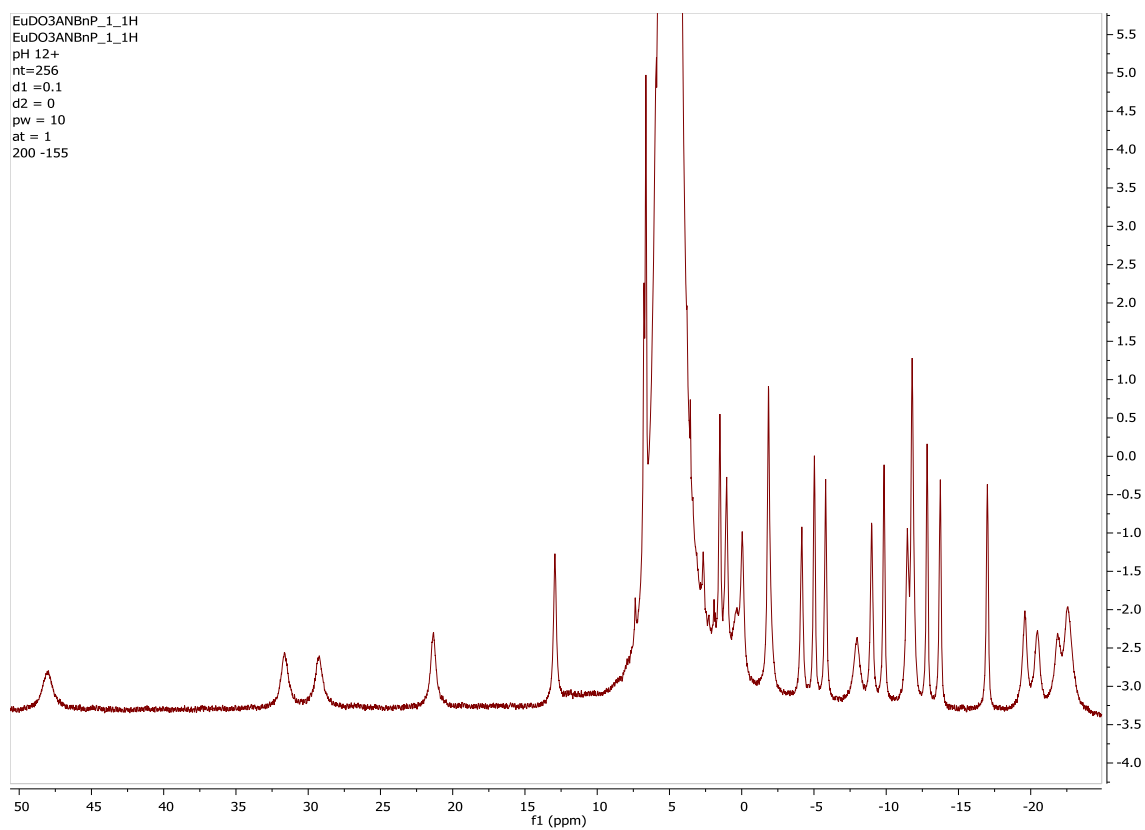




```
EuDO3ANMeP_2_1H
EuDO3ANMeP_2_1H
pH 8.5
nt=512
d1 =0.1
d2 = 0
pw = 10
at = 1
350 -350
spin off kvuli artefaktum
```



74



Appendix 9 ^1H NMR spektrum paramagnetického komplexu EuDO3ANbP