

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



**Tetrafosforová analoga Ln–DOTA:
Komplexy bez vody ve vnitřní koordinační sféře**

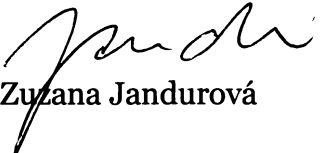
Diplomová práce

Zuzana Jandurová

2006

Prohlašuji, že předkládanou diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením školitele a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Praha, květen 2006


Zuzana Jandurová

I.	Úvod.....	7
II.	Teoretický úvod (Obecná část).....	8
II.–1.	Makrocyclické ligandy.....	8
II.–2.	Metody studia ligandů a komplexů.....	10
II–2.1.	Potenciometrické titrace.....	10
II–2.2	Rentgenostrukturní analýza.....	10
II–2.3.	EPR.....	11
II–2.4.	NMR.....	12
	II–2.4.1. Princip metody.....	12
	II–2.4.2. Aplikace NMR na paramagnetické komplexy.....	16
	II–2.4.2.1. Elektronová struktura a koordinační chování Ln ³⁺ iontů.....	16
	II–2.4.2.2. LIS (Lanthanide Induced Shift).....	17
II–3.	Použití komplexů s makrocyclickými ligandy.....	21
II–3.1.	Posuvová činidla; činidla pro NMR termometrii a pH-metrii <i>in vivo</i>	21
II–3.2.	Kontrastní látky pro MRI.....	22
II–3.3.	Radiofarmaka.....	29

III. Teoretický úvod (Tetrafosforová analoga DOTA).....	31
III.–1a. Makrocyclické ligandy.....	31
III.–1b. Izomerie komplexů v roztocích.....	32
III.–2. Metody studia ligandů a komplexů.....	34
III.–2.1. Potenciometrické titrace (Acidobazické vlastnosti ligandů, stabilita komplexů).....	34
III.–2.2. Studium struktury ligandů a komplexů v pevné fázi.....	34
III.–2.3. EPR.....	35
III.–2.4. NMR (LIS).....	35
III.–3. Použití komplexů s makrocyclickými ligandy.....	35
III.–3.1. Posuvová činidla; činidla pro NMR termometrii a pH-metrii <i>in vivo</i>	35
III.–3.2. Kontrastní látky pro MRI.....	36
III.–3.3. Radiofarmaka.....	36
III.–4. Další výzkum a aplikace těchto komplexů.....	37

IV. Cíl práce.....	38
V. Experimentální část.....	39
V.-1.a. Seznam použitých chemikálií.....	39
V.-1.b. Metody charakterizace připravených látek.....	40
V.-1.c. Syntéza ligandů a komplexů.....	41
V.-2. Metody studia ligandů a komplexů.....	46
V.-2.1. Potenciometrické titrace.....	46
V.-2.2. Rentgenostrukturní analýza.....	49
V.-2.3. EPR experimenty.....	50
V.-2.4. NMR experimenty.....	50
V.-2.4.1. Studium struktury komplexů v roztocích (^1H a ^{31}P NMR spektroskopie).....	50
V.-2.4.2. Studium termodynamiky komplexů (Teplotní závislost ^{31}P NMR spekter; ^{31}P EXSY spektra).....	51
V.-2.4.3. Studium ^{17}O a ^{31}P LIS.....	51
V.-2.4.4. Relaxometrické studie komplexů (^1H , ^{17}O a ^{31}P relaxometrie).....	52
V.-2.5. Vyhodnocení dat.....	53

VI. Výsledky a diskuze.....	54
VI.–1. Syntéza ligandů a komplexů.....	54
VI.–2. Metody studia ligandů a komplexů.....	56
VI.–2.1. Potenciometrické titrace.....	56
VI.–2.2. Rentgenostrukturní analýza.....	61
VI.–2.3. EPR.....	64
VI.–2.4. NMR.....	67
VI.–2.4.1. Studium struktury komplexů v roztocích (^1H a ^{31}P spektroskopie).....	67
VI.–2.4.2. Studium termodynamiky komplexů (Teplotní závislost ^{31}P NMR spekter; ^{31}P EXSY spektra).....	70
VI.–2.4.3. Studium ^{17}O a ^{31}P LIS.....	74
VI.–2.4.4. Relaxometrické studie komplexů (^1H , ^{17}O a ^{31}P relaxometrie).....	81
VII. Závěr.....	96
VIII. Literatura.....	97
IX. Seznam použitých zkratk.....	102
X. Příloha.....	103

I. Úvod

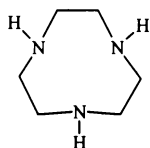
V průběhu posledních desetiletí se mnoho studií zaměřovalo na polyazacykloalkany s atomy dusíku nesoucími karboxymethylovou nebo alkylfosfonátovou (alkylfosfinátovou) skupinu. Na rozdíl od komplexů ligandů s otevřeným řetězcem, uplatňuje se u těchto tzv. makrocyclický efekt, který napomáhá výraznému zvýšení stability komplexů. Zejména kinetická stabilita je nutným předpokladem pro *in vivo* použití těchto komplexů jako kontrastních látek pro MRI (MRI = Magnetic Resonance Imaging) (zejména gadolinité komplexy), posuvových činidel (SR = shift reagents), činidel pro NMR termometrii a pH-metrii nebo komplexů s radionuklidy využívaných v radiomedicíně jako tzv. otevřené zářiče.

Stále se ovšem setkáváme s poptávkou po efektivnějších a selektivnějších komplexech pro výše uvedené aplikace. Je proto třeba dále zkoumat vliv struktury komplexů (ligandů) a ostatních parametrů na jejich klíčové vlastnosti. Ke studiu těchto ligandů a komplexů se využívá zejména nukleární magnetické rezonanční (NMR) spektroskopie, potenciometrie, rentgenostrukturní analýza a podobně.

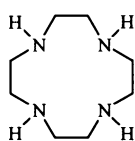
II. Teoretický úvod (Obecná část)

II.–1. Makrocyclické ligandy

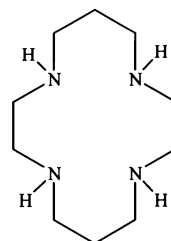
Zavedení pojmu ligand spadá do doby, kdy A. Werner v rozmezí let 1893–1913 položil základy koordinační chemie.¹ Ligand je Lewisovou bazí, která předává Lewisově kyselině (akceptoru – iontu kovu) „volný elektronový pár“, přičemž atom bezprostředně vázaný k akceptoru je označován jako donorový. Makrocyclické ligandy (MCL) jsou polydentátní ligandy obsahující donorové atomy buď začleněné do cyklu, nebo připojené ke kostře cyklu. Jak je běžně definováno, MCL obsahuje minimálně 3 donorové atomy, přičemž makrocyklus samotný se skládá minimálně z 9 atomů.² Jako donorové atomy v makrocyklu mohou sloužit např. dusíkové atomy, jak je tomu v případě ligandů uvedených na *Obrázku 1*,



1,4,7-triazacyclononan



1,4,7,10-tetraazacyclododekan



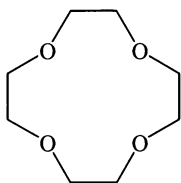
1,4,8,11-tetraazacyclotetradekan

(cyklen)

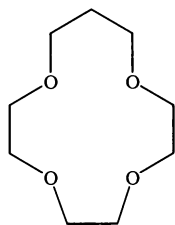
(cyklam)

Obrázek 1. Příklady makrocyclických ligandů s dusíkatými donorovými atomy

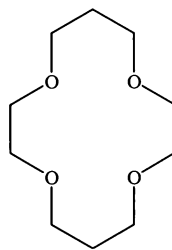
kyslíkaté atomy v případě crownetherů³ (*Obrázek 2*),



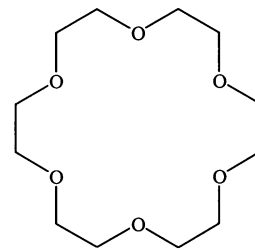
12-crown-4



13-crown-4



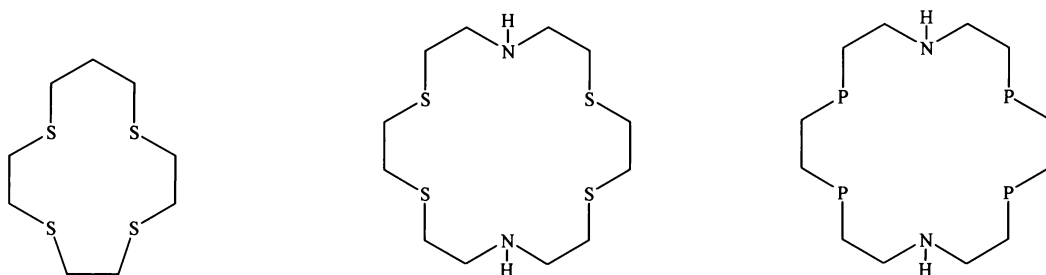
14-crown-4



18-crown-6

Obrázek 2. Příklady makrocyclických ligandů s kyslíkatými donorovými atomy

nebo ligandů s jinými donorovými atomy (například s atomy síry, fosforu a podobně, *Obrázek 3*).

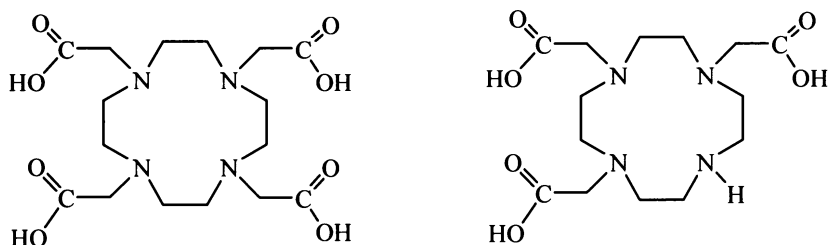


Obrázek 3. Příklady makrocyclických ligandů s různými donorovými atomy

Makrocyclických ligandů je tedy celá řada, my se však budeme v této práci zabývat pouze těmi odvozenými od **cyklenu**. Atomy dusíku jeho kruhu umožňují i navázání tzv. pendantních (pendant = přívěsek) skupin, které mohou být schopny koordinace.

Nejčastějšími pendantními skupinami jsou karboxylové kyseliny (octová, propionová), jejich deriváty (amidy, estery), oxokyseliny fosforu, jejich estery a podobně.

V současné době jsou velice skloňovány ligandy DOTA a deriváty DO3A (*Obrázek 4*), které se v komplexu s gadolinitými ionty využívají například jako kontrastní látky pro MRI (viz. níže).



Obrázek 4. Struktura ligandu DOTA (vlevo), DO3A (vpravo)

II.–2. Metody studia makrocyclických ligandů a komplexů

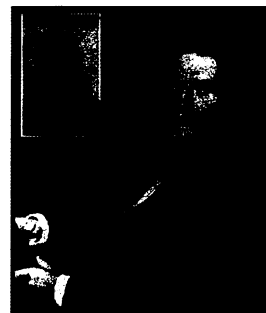
II.–2.1. Potenciometrické titrace⁴

Potenciometrickými titracemi se rozumí titrace, při nichž se spolu s objemem přidaného titračního roztoku zaznamenává napětí elektrického článku tvořeného dvojicí elektrod (měrné a srovnávací) ponořených do titrovaného roztoku (čili rozdíl **potenciálů** na elektrodách) nebo veličina od tohoto napětí odvozená, např. hodnota pH. Grafickým výstupem potenciometrické titrace je potenciometrická titrační křivka, která má v jednoduchých případech charakteristický „esoovitý“ průběh. Cílem potenciometrické titrace (ostatně stejně jako jakékoliv jiné titrace) je nalezení bodu (případně bodů) ekvivalence, který v tomto případě odpovídá bodu s největší změnou pH. Z těchto křivek lze po jejich počítačovém zpracování získat například hodnoty pK_A dané studované látky, či v případě titrace v přítomnosti iontů kovů i hodnoty konstant stability výsledných komplexů.

II.–2.2. Rentgenostrukturní analýza⁵



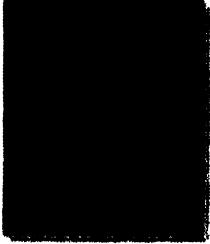
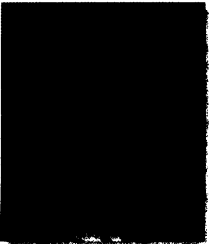
Prvotní přístup spočíval v charakteristice krystalů na základě jejich vnějšího tvaru. Existence vnějších přirozených krystalových ploch však není podstatná při posuzování, zda je látka krystalická, neboť tyto plochy nemusí při růstu krystalu vznikat nebo



mohou být záměrně porušeny. Mnohem důležitější je uspořádání vnitřní. Mocný experimentální nástroj – paprsky X – k potvrzení teoretických úvah o vnitřním uspořádání látek dal krystalografům W.C. Röntgen a umožnil jim tak studium vnitřní struktury krystalických látek. Ty jsou (na rozdíl od plynů a kapalin) ve stavu, kdy je tepelný pohyb redukován natolik, že již není schopen narušit vazbu mezi sousedními molekulami ani měnit například konformaci molekuly (což je možné v případě molekul ve fázi kapalné). Typ mřížky u těchto látek může být rentgenograficky určen přímým vyšetřením tzv. difrakčního záznamu, a to pomocí systematického vyhasínání reflexí určitých rovin.

II.-2.3. EPR⁶

Skutečné (Lauren Jonas z Diablo Balet) i fantastické (The Spinning Top od Hanse Bellmera)

 makroskopické objekty mohou (leč nemusí) rotovat kol vlastní osy a vnějším zásahem dokonce plynule měnit svůj moment hybnosti. Vypadá to tak, že elektron kolem vlastní osy nerotuje. Jeho nerozlučnou vlastností je však „vnitřní“  moment hybnosti – spin. Je-li více elektronů pohromadě, většinou vytvoří páry lišící se pouze opačnou orientací spinu. Valenční elektrony se však někdy nespárují. Docela často proto, že je jich lichý počet. Částice s nevykompenzovaným elektronovým spinem (a pouze takové) „vidíme“ pomocí EPR (EPR = Elektronová Paramagnetická Resonanční) spektroskopie. Ostatních si tato metoda nevšimá a nedá se tedy použít ke zkoumání většiny chemických problémů. EPR spektroskopie je prakticky sestrou mnohem většinou nukleární magnetické rezonance, NMR. I fyzikální princip metody je prakticky totožný s NMR spektroskopií s pouze jediným rozdílem, a to, že v případě NMR se jedná o interakci jaderného spinu a u EPR elektronového spinu s magnetickým polem. Princip NMR je vysvětlen níže. Pro běžnou chemickou potřebu jsou většinou nejdůležitější identifikační a strukturní informace vyplývající z hyperjemné struktury spektra. Informace lze ale získat i z linie samotné, a to z její polohy, intenzity a šířky. **Poloha** je kvalitativní charakteristikou a v EPR se udává pomocí *g*-faktoru. **Intenzita** je, při splnění patřičných podmínek, mírou koncentrace radikálu. **Šířka linie** se běžně v EPR kvantifikuje vodorovnou vzdáleností maxima a minima na křivce první derivace absorpce („peak to peak“). V šířce linie se skrývá dynamika spinového systému, která může být ovlivněna rychlostí chemicky zajímavých procesů.

II.-2.4. NMR spektroskopie

Vlastnosti připravených komplexů jsou většinou dále zkoumány NMR (NMR = Nukleární Magnetická Resonanční) spektroskopií, jejíž princip je v krátkosti vysvětlen v následující podkapitole.

II.-2.4.1. Princip metody⁷

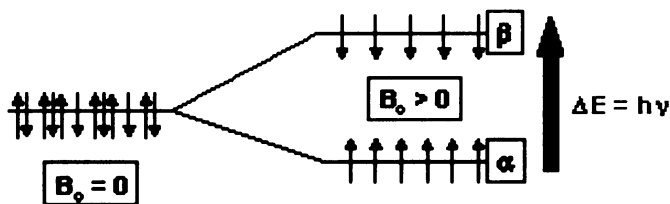
NMR spektroskopie je absorpční (emisní) spektroskopií podobně jako spektroskopie infračervená nebo UV-Vis absorpční. Detekuje absorpci radiofrekvenčního (RF) záření jádry atomů v molekule. Aktivní jsou pouze jádra s nenulovým spinovým kvantovým číslem. Většina prvků má alespoň jeden svůj NMR aktivní izotop, ale běžně se měří jen některé z nich, např. ^1H , ^{13}C , ^{17}O nebo ^{31}P . Tato jádra mohou absorbovat RF záření.

V základním stavu nejsou jaderné spiny uspořádány a neexistuje mezi nimi žádný energetický rozdíl. Jsou tzv. degenerované (Obrázek 5a). Vlivem externího magnetického pole dojde však k jejich uspořádání buď v souhlasném (stav o nižší energii, α) nebo v opačném (stav o vyšší energii, β) směru (Obrázek 5b):



Obrázek 5. Uspořádání jaderných spinů při absenci (vlevo) a v přítomnosti vnějšího magnetického pole (vpravo)

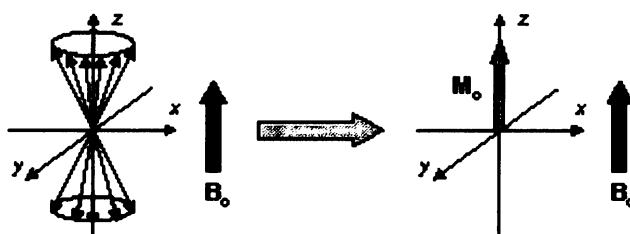
Vždy existuje přebytek jader uspořádaných souhlasně se směrem externího magnetického pole a rozdíl v populacích se zvyšuje se vzrůstající intenzitou externího magnetického pole.



Obrázek 6. Rozštěpení základního stavu vlivem externího magnetického pole na dvě hladiny α a β

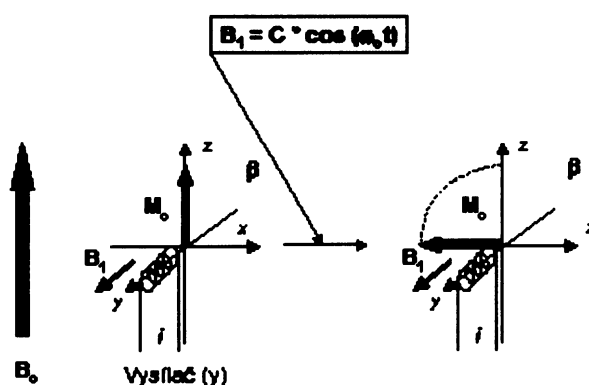
Další důležitou vlastností částic s nábojem je tzv. magnetický moment (μ). Jedná se o vektorovou veličinu, má tedy velikost a směr. Z pohledu klasické mechaniky vykonává vektor magnetického momentu precesní pohyb okolo osy z (směru externího magnetického pole). Frekvence tohoto pohybu se nazývá Larmorova a značí se ω_0 . Bez ohledu na původní orientaci vektoru μ tento má vždy snahu orientovat se podle externího pole B_0 .

Precesní pohyb je tak výslednicí interakce síly, která se snaží přimět vektor μ k souhlasné nebo nesouhlasné orientaci s vektorem B_0 a síly udržující jej v rotaci. Frekvence precesního pohybu je přímo úměrná rozdílu energií dvou spinových stavů. Výslednice všech magnetických momentů se nazývá magnetizace a značíme ji obvykle M_0 (Obrázek 7).



Obrázek 7. Znárodnění výslednice magnetických momentů – magnetizace M_0

Působíme-li na systém ještě polem B_1 , které je kolmé k B_0 , jehož frekvence je shodná s frekvencí precesního pohybu magnetizace, je dosaženo tzv. rezonanční podmínky a systém absorbuje energii. Vzájemnou interakcí RF pole B_1 a magnetizace M_0 dojde k jejímu překlpení kolem tohoto pole B_1 o úhel β , který odpovídá velikosti dodané energie a době jejího působení (Obrázek 8).



Obrázek 8. Překlpení magnetizace vlivem pole B_1 o úhel β

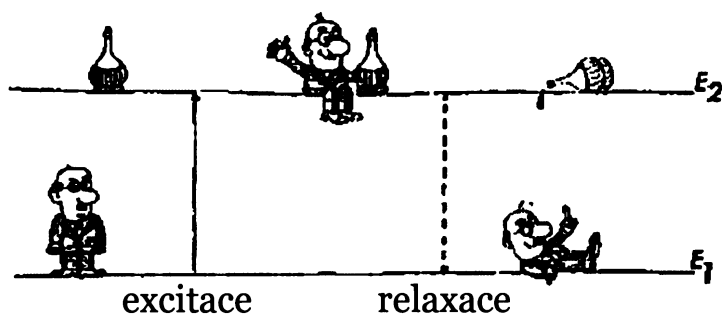
Dle velikosti absorbované energie můžeme usuzovat na chemické okolí daného měřeného jádra. V molekule totiž nejsou měřená jádra atomů izolována, ale jsou obklopena elektrony ať již vlastního atomu či atomů sousedních, které se podílejí na vazbě atomu se zbytkem molekuly. Tyto elektrony svými magnetickými vlastnostmi odstiňují jádro atomu od vnějšího magnetického pole, což se projevuje změnou rezonanční frekvence. Protože stínící efekt elektronů se mění podle toho, jakým způsobem je atom v molekule vázán (v jakých funkčních skupinách se vyskytuje), odpovídají různým vazbám (různým funkčním skupinám) různé rezonanční frekvence. Resonanční frekvence se zjišťují NMR spektrometrem a znázorňují se ve formě NMR spektra, která vyjadřují intenzitu signálu pro různé chemické posuny.

Chemický posun se zavádí z důvodu, aby bylo možno porovnávat NMR spektra látek získaných za různých experimentálních podmínek a na různých přístrojích (a tak např. identifikovat látku porovnáním jejího NMR spektra s tabelovanými spektry látek známých). Jedná se o relativní rezonanční frekvenci vztahenou k určitému standardu a je definován rovnicí (1):

$$\delta = \frac{\nu - \nu_s}{\nu_s} \quad (1)$$

kde ν je hodnota rezonanční frekvence příslušející určité funkční skupině ve vzorku látky a ν_s je rezonanční frekvence standardu. Standardem pro ^1H NMR bývá sloučenina tetramethylsilan (TMS), v němž je 12 zcela identicky vázaných vodíkových atomů; hodnota jejich chemického posunu byla definována jako nulová.

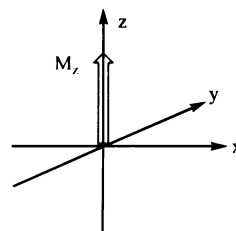
Při absenci externího magnetického pole B se magnetizace bude snažit přejít zpět do původního rovnovážného (stacionárního) stavu. Tento proces se nazývá relaxace (Obrázek 9) a jde o tedy navrácení spinového systému do rovnováhy.



Obrázek 9. Excitace a relaxace

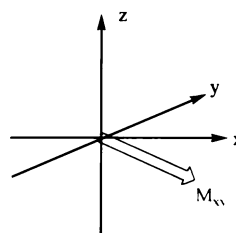
Fenomenologicky jsou zavedeny dva základní druhy relaxace.

- 1) Podélná (longitudinální, spin–mřížková) relaxace (charakterizovaná longitudinálním relaxačním časem T_1) se týká složky M_z spinové magnetizace (Obrázek 10). Systém při ní ztrácí energii, která se přenáší na okolí (mřížku) ve formě tepla. Jedná se o dipolární interakce s ostatními spiny, interakce s paramagnetickými částicemi a podobně.



Obrázek 10. Složka M_z magnetizace

- 2) Příčná (transversální, spin–spinová) relaxace (charakterizovaná transversálním relaxačním časem T_2), která se týká komponent magnetizace M_{xy} (Obrázek 11) ležící v rovině $\langle xy \rangle$. Jde o rozptyl energie mezi samotnými jádry, kdy spin–spinové interakce rozfázují M_{xy} . Přispívá k ní též nehomogenita magnetického pole. Zpravidla je hodnota T_2 menší než T_1 .



Obrázek 11. Složka M_{xy} magnetizace

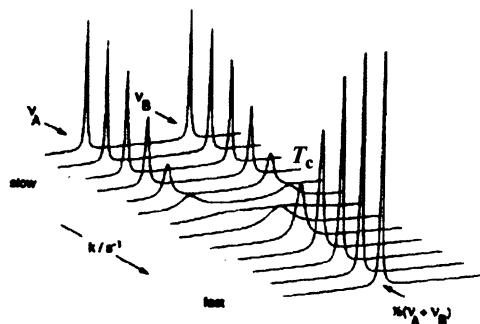
NMR spektroskopii můžeme sledovat i děje, jako je například **chemická výměna**. Ta zahrnuje všechny procesy, kdy sledované jádro přechází do jiného chemického okolí – tj. chemické reakce, konformační změny, mezomerní přechody, tvorbu komplexu a podobně. Chemická výměna se neřadí přímo mezi relaxační mechanismy, ale velmi se jim podobá – místo samotné magnetizace nám po systému putuje celé jádro, včetně svého spinu. Důsledky i popis chemické výměny jsou velmi podobné spinové relaxaci. Chemická výměna má vliv i na příčnou složku magnetizace. Rychlost výměny závisí na Gibbsově energii daného procesu. Rychlost se tedy zvýší při zvyšování teploty T . Při **koalescenční teplotě** (T_c) se rychlost výměny k mezi jednotlivými stavy stává srovnatelná s rozdílem chemických posunů (v Hz), $\pi(\Delta\nu)/2$, při T_c tedy platí následující rovnice (2)

$$k = \frac{\pi\Delta\nu}{2} \quad (2)$$

Pro chemickou výměnu rozlišujeme dva režimy vzhledem k rozdílu chemických posunů (ν Hz) dvou vyměňujících stavů

$k \ll \Delta\nu$ pomalá výměna

$k \gg \Delta\nu$ rychlá výměna



Obrázek 12. Teplotní závislost NMR spekter při chemické výměně

Výměnné procesy, které jsou dle výše uvedeného rozdělení pomalé, vyžadují pro analýzu jejich dynamického chování sofistikovanějších metod. V posledních letech se ke studiu výměnných a dynamických procesů u systému s vysokou energetickou bariérou využívá dvoudimenzionálních (2D) technik, jakými je například **2D EXSY** (EXchange SpectroscopY) experiment. Tato metoda nám nyní tyto procesy dokáže popsat nejen kvalitativně, ale díky stále lepším a lepším softwarům i matematicky naměřené spektrum zpracovat a dostat tak údaje kvantitativní.

II.–2.4.2. Aplikace NMR spektroskopie na paramagnetické komplexy

II.–2.4.2.1. Elektronová struktura a koordinační chování Ln^{3+} iontů⁸

Ln^{3+} ionty mají elektronovou konfiguraci $[\text{Xe}]4f^n$, kde $n = 0-14$. La^{3+} a Lu^{3+} nemají nepárové elektrony a jsou tedy diamagnetické, kdežto ostatní ionty vlastní 1–7 nepárových 4f elektronů a jsou paramagnetické. 4f valenční elektrony jsou stíněny 5s a 5p elektrony a nejsou tedy prakticky schopné kovalentní interakce s ligandy. Interakce jsou převážně elektrostatické a geometrie Ln^{3+} komplexů je spíše určena sterickými než elektronickými faktory. Ln^{3+} ionty mohou být klasifikovány jako tvrdé Lewisovy kyseliny a proto afinita k donorovým místům ligandu obvykle roste s elektronegativitou (např. $\text{F}^- > \text{OH}^- > \text{H}_2\text{O} > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$). Z důvodu stínění 4f elektronů

jsou si všechny Ln^{3+} ionty velmi chemicky podobné. Každý Ln^{3+} ion má však charakteristické efekty na NMR parametry jádra v jejich blízkosti. Některé změny v chemickém chování v řadě Ln^{3+} komplexů daného ligandu mohou být připisovány poklesu iontového poloměru směrem od La^{3+} (1.36) k Lu^{3+} (1.17). Koordinační číslo (KČ) závisí na sterických požadavcích ligandu. Byla pozorována koordinační čísla mezi 3–12, přičemž KČ 8 a 9 je nejběžnější. Solvatační číslo volných iontů ve vodném roztoku (tzv. hydratační číslo) je předmětem rozsáhlých debat. Neutronovou difrakcí bylo zjištěno, že hodnota hydratačního čísla u série Ln^{3+} klesá od 9 k 8.

II.–2.4.2.2. LIS (Lanthanide Induced Shift)⁸

Mezi metody, které lze využít pro studium struktury sloučenin v roztoku, může být zahrnuto i měření indukovaných posunů způsobených přítomností Ln^{3+} iontů ve sloučenině. Lanthanoidy indukovaný posun (Δ) sestává ze tří příspěvků: diamagnetického (Δ_d), kontaktního (Δ_c) a pseudokontaktního (Δ_p), rovnice (3).

$$\Delta = \Delta_d + \Delta_c + \Delta_p \quad (3)$$

Po odečtení diamagnetického získáme čistý paramagnetický příspěvek k LIS (Δ'). Oba zbylé příspěvky, Δ_c a Δ_p , mohou být vyjádřeny součinem členu charakteristického pro každý daný Ln^{3+} ion a nezávislého na ligandu ($\langle S_z \rangle$ – očekávaná hodnota spinu a C^D – magnetická konstanta, pro Δ_c , resp. Δ_p ; hodnoty C^D a $\langle S_z \rangle$ pro všechny lanthanoidy jsou uvedeny v *Tabulce 1*) a členu druhého, který charakterizuje studované jádro a je nezávislý na kationtu (F a G , pro Δ_c , resp. Δ_p). Δ' tak může být vyjádřen následujícím způsobem (4):

$$\Delta' = \langle S_z \rangle F + C^D G \quad (4)$$

Tabulka 1. Hodnoty konstant $\langle S_z \rangle$ a relativních hodnot C^D charakteristických pro Ln^{3+} kation

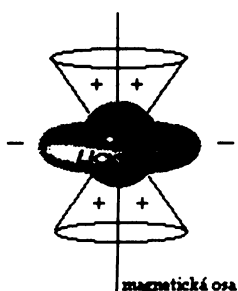
	$\langle S_z \rangle$	C^D
Ce	-0.974	-6.3
Pr	-2.956	-11.0
Nd	-4.452	-4.2
Sm	0.224	-0.7
Eu	7.569	4.0
Gd	31.500	0
Tb	31.853	-86
Dy	28.565	-100
Ho	22.642	-39
Er	15.382	33
Tm	8.210	53
Yb	2.589	22

Rovnice (4) může být dále převedena do dvou lineárních forem (5, 6), čímž ve formě směrnice separujeme buď kontaktní (6), nebo pseudokontaktní (5) příspěvek.

$$\Delta'/\langle S_z \rangle = F + (C^D/\langle S_z \rangle) G \quad (5)$$

$$\Delta'/C^D = (\langle S_z \rangle/C^D)F + G \quad (6)$$

Bylo ukázáno, že pokud jsou všechny komplexy Ln^{3+} pro studovaný ligand izostrukturální, leží body vynesené do grafu dle rovnic (5, 6) v přímce. Nejčastěji se tímto způsobem vyhodnocují chemické posuny v ^{17}O NMR spektrech, zejména při studiu struktury hydratační sféry komplexů. V případě izostrukturálních komplexů pak znaménko směrnice přímky z předchozích výnosů závisí na umístění molekuly vody vzhledem k McConnelovu kuželu vymezenému Ln^{3+} kationtem (Obrázek 13).



Obrázek 13. Znárodnění McConnellova kuželu; znaménko LIS závisí na poloze molekuly vody (nad a pod Ln^{3+} kladné, po stranách záporné)

V případě, že NMR spektrometr není frekvenčně zalokován (například na jádro deuteria) a není ani použit interní standard, musíme při zjišťování LIS brát v úvahu i příspěvek tzv. **BMS** (BMS = Bulk Magnetic Susceptibility) posunu Δ_χ . Kvantifikovat jej můžeme pomocí rovnice (7),

$$\Delta_\chi = \frac{4\pi c s}{T} \left(\frac{\mu_{\text{eff}}}{2.84} \right)^2 \times 10^3 \quad (7)$$

kde c je koncentrace paramagnetického Ln^{3+} komplexu v roztoku vyjádřená v mol dm^{-3} , s vyjadřuje závislost na tvaru vzorku a jeho pozici v magnetickém poli (např. pro sférický tvar $s=0$, pro paralelní cylindrické $s=1/3$, a pro antiparalelní cylindrické $s=-1/6$), T je termodynamická teplota a μ_{eff} je efektivní magnetický moment pro daný Ln^{3+} ion (*Tabulka 2*).

Efektu BMS se využívá i při stanovení koncentrace Ln^{3+} komplexu ve vzorku, kdy se z rovnice (7) vyjádří koncentrace c a za Δ_χ se dosadí absolutní hodnota rozdílu posunů *t*-BuOH ve vzorku a v insertu (referenční kveta ve vzorku).

Tabulka 2. Hodnoty efektivních magnetických momentů μ_{eff} Ln³⁺ iontů

	μ_{eff}
Ce	2.56
Pr	3.62
Nd	3.68
Sm	1.55–1.65
Eu	3.40–3.51
Gd	7.94
Tb	9.7
Dy	10.6
Ho	10.6
Er	9.6
Tm	7.6
Yb	4.5

II.–3. Použití komplexů makrocyclických ligandů

II.–3.1. Posuvová činidla, činidla pro NMR termometrii a pH-metrii *in vivo*

I komplex samotný jakožto anion může indukovat posun resonance určitého kationtu (${}^6\text{Li}^+$, ${}^7\text{Li}^+$, ${}^{23}\text{Na}^+$, ${}^{133}\text{Cs}^+$), se kterým interaguje. Tyto komplexy se nazývají tzv. **posuvová činidla** (SR = Shift Reagents) a využívají se zejména v oboru biologických aplikací.

Membránový gradient Na^+ řídí řadu důležitých buněčných procesů jako například regulaci buněčného objemu, transport ostatních iontů a metabolitů přes buněčnou membránu proti koncentračnímu gradientu, nebo přenos nervových impulsů.⁹ k pochopení role Na^+ gradientu v různých patofyziologických stavech je však třeba rozlišit intra- a extracelulární sodné ionty. To nám právě umožňuje NMR spektroskopie ve spojení s použitím posuvových činidel.

SR jsou jednoduché paramagnetické komplexy, které jsou schopny vázat například právě zmiňované Na^+ ionty a způsobit tak změnu jejich resonance ve spektru.¹⁰ Protože aniontové komplexy jsou membránami neprostupné (z důvodu jejich vysokého negativního náboje nejsou rozpustné v lipofilní membráně a jsou odpuzovány negativně nabitými skupinami fosfolipidů), zdržuje se SR během NMR experimentu pouze v extracelulárním prostoru a způsobuje posun resonance pouze extracelulárního Na^+ ve spektru.

Výsledný posun je u některých komplexů závislý i na pH. Tyto látky mohou pak být využity pro **NMR pH-metrii *in vivo***. Přesné měření pH reprezentuje významnou kapitolu od té doby, kdy bylo zjištěno, že patologie, jako tumor či ischemická choroba mohou být doprovázeny právě změnami v tomto parametru.¹¹ Paramagnetické komplexy mohou představovat excelentní NMR pH indikátory v případě, že nesou funkční skupiny, jejichž $\text{p}K_{\text{A}}$ hodnoty spadají do oblasti, o kterou se zajímáme.

Krom pH jsou ${}^1\text{H}$ a ${}^{31}\text{P}$ posuny některých komplexů silně závislé na teplotě, což může být využito v **NMR termometrii *in vivo***.

II.-3.2. Kontrastní látky pro MRI



Efektu zvýšení relaxačních rychlostí protonů vody způsobené přítomností komplexu paramagnetického iontu v roztoku využívají zejména kontrastní látky (CA = Contrast Agent) pro MRI (MRI = Magnetic Resonance Imaging).¹²

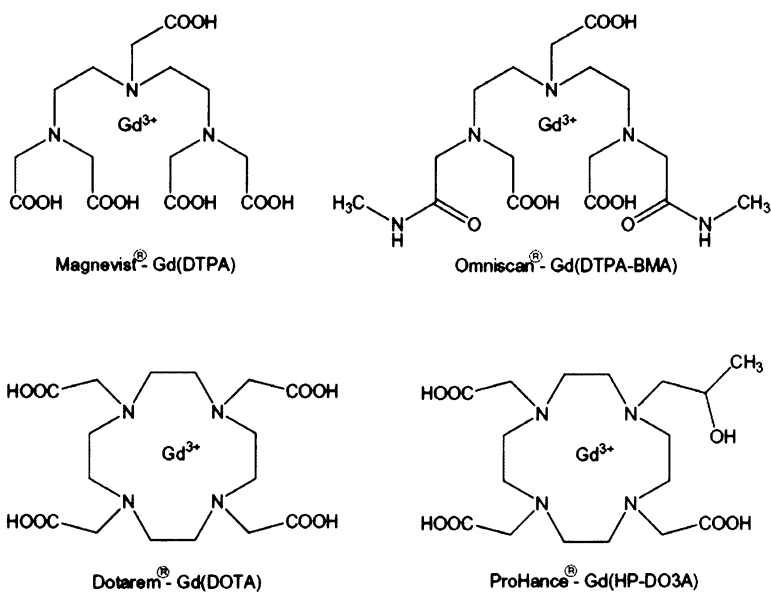


Principem MRI tomografie je měření mikromagnetických vlastností NMR aktivních jader analogicky jako u klasické NMR spektroskopie¹³. Vzhledem k tomu, že lidské tělo obsahuje v závislosti na pohlaví a stáří 55–65 % vody, ukázalo se jako nejvýhodnější měřit jádra vodíku (^1H) molekul vody obsažené v tkáni.

Velký význam MRI jako velice důležité klinické metody podněcuje vývoj látek zlepšujících rozlišení tkání, označovaných jako látky kontrastní (CA = Contrast Agents). Přirozený kontrast v MR obrazu je výsledkem komplexní souhry řady faktorů, jako je longitudinální (podélný, T_1) a transversální (příčný, T_2) relaxační čas, protonová hustota v zobrazované oblasti a instrumentální parametry. CA, zejména komplexy gadolinité (Gd^{3+}) a manganaté (Mn^{2+}), ovšem mají schopnost uměle zkracovat relaxační časy (T_1 a T_2) protonů vody. Na rozdíl od CA například pro rentgenové snímky, nejsou samy přímo zobrazovány, ale jejich efekt na kontrast je výsledkem právě jejich schopnosti redukovat relaxační časy protonů vody v tkáních. Mapování T_1 a T_2 relaxačních časů protonů molekul vody je pak základem pro vznik tzv. T_1 a T_2 vážených snímků. Vznik T_1 a T_2 snímků umožňuje nejen odlišnost těchto parametrů pro různé typy tkání (např. podle koncentrace biogenních iontů nebo nepolárních složek), ale i rozdílnost relaxačních časů zdravé a nemocné tkáně v rámci jednoho orgánu, což umožňuje například diagnostikování nádorů.

V současnosti používané CA tvoří paramagnetické substance, které lze rozdělit do dvou hlavních skupin.¹³ První tvoří suspenze malých částic oxidů železa, které ovlivňují především T_2 relaxační časy.

Druhou skupinou kontrastních látek, ovlivňující především T_1 relaxační čas, tvoří komplexy paramagnetických kovových iontů. Do té spadají převážně nízkomolekulární cheláty Gd^{3+} ; konkrétně se jedná o látky Gd–DTPA (Magnevist), Gd–DOTA (Dotarem), Gd–(DTPA–BMA) (Omniscan) a Gd–(HP–DO3A) (Prohance) (Obrázek 14). Právě o těchto T_1 kontrastních bude pojednávat tato kapitola.



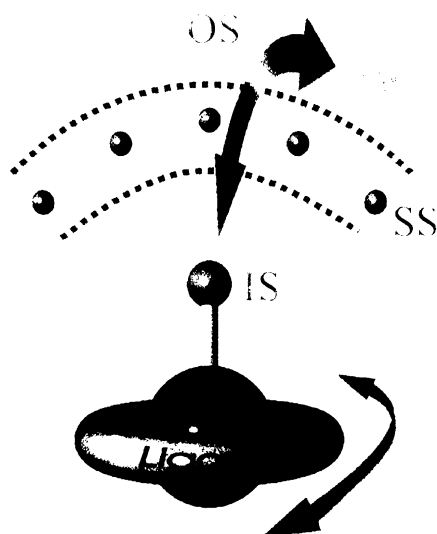
Obrázek 14. Struktury používaných kontrastních látek pro MRI

Schopnost kontrastních látek urychlovat relaxaci protonů se numericky vyjadřuje veličinou zvanou *relaxivita*. Je definována vztahem (8) a značí se r_1 .

$$\frac{1}{T_{\text{obs}}} = \frac{1}{T_{\text{id}}} + r_1[Gd^{3+}] \quad (8)$$

T_{obs} vyjadřuje celkovou měřitelnou rychlost relaxace protonů, T_{id} je diamagnetický příspěvek k relaxaci a $[Gd^{3+}]$ představuje koncentraci gadolinových iontů v roztoku.

V roztoku gadolinitého komplexu lze rozlišit tři typy molekul vody, které jsou ovlivňovány přítomností paramagnetické látky a přispívají tak k zvýšení relaxivity.¹⁴ Jsou to molekuly vnitřní sféry (IS), která je tvořena q molekulami vody přímo koordinovanými ke Gd^{3+} iontu, vnější sféry (OS), která zahrnuje všechny molekuly rozpouštědla difundované do blízkosti komplexu, a druhé sféry (SS), kterou tvoří molekuly vody vázané vodíkovými můstky k ligandu (Obrázek 15).



Obrázek 15. Znáornění tří typů molekul vody vyskytující se v okolí paramagnetického komplexu; (IS –vnitřní sféra, OS – vnější sféra, SS druhá sféra), rotačního korelačního času (τ_R) a residenčního času molekuly vody ve vnitřní sféře (τ_M)

Celková relaxivita je pak definovaná rovnicí (9),

$$r_1^{\text{obs}} = r_{1p}^{\text{IS}} + r_{1p}^{\text{OS}} + r_{1p}^{\text{SS}} + r_{1w} \quad (9)$$

kde r_1^{obs} je měřená relaxivita a r_{1w} je relaxivita čistého rozpouštědla (tj. v nepřítomnosti paramagnetického komplexu).

Vnitřní sféra

Tento člen reprezentuje nejdůležitější příspěvek k r_{1p} a tak se snahy po zlepšení účinnosti CA ubírají právě směrem k optimalizaci tohoto parametru.

Obecně mechanismy magnetické relaxace ve vodných roztocích paramagnetických látek popisuje Bloembergenova–Solomonova–Morganova (BSM) teorie. Je to soubor principů a rovnic, které pracují se sadou fyzikálně-chemických parametrů charakterizující jednak danou paramagnetickou látku, a zároveň fyzikální podmínky v roztoku. Pro vnitřní sféru platí následující rovnice (10), (11) a (12),

$$R_{1p}^{IS} = \frac{Mq}{55.6} \frac{1}{T_{1M} + \tau_M} \quad (10)$$

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_H^2 g_L^2 S(S+1) \beta^2}{r_H^6} \left[\frac{3\tau_{C1}}{1 + \omega_H^2 \tau_{C1}^2} + \frac{7\tau_2}{1 + \omega_S^2 \tau_{C2}^2} \right] \quad (11)$$

$$\frac{1}{\tau_{Ci}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{T_{ie}} \quad (12)$$

kde M je koncentrace CA, q je počet přímo koordinovaných molekul vody, T_{1M} je longitudinální relaxační čas protonů vázané vody, s je spinové kvantové číslo ($7/2$ pro Gd^{3+}), γ_H protonový gyromagnetický poměr, β Bohrov magneton, g_L Landého faktor pro volný elektron, r vzdálenost mezi iontem kovu a protony vázané vody, ω_H a ω_S protonová resp. elektronová Larmorova frekvence a τ_{Ci} ($i = 1,2$) celkové korelační časy. Tyto celkové korelační časy zahrnují 3 příspěvky, a to rotační korelační čas molekuly τ_R , residenční čas koordinované molekuly vody τ_M a elektronový relaxační čas T_{ie} .

Vnější sféra

Tento příspěvek činí asi okolo 40 % relaxivity Gd^{3+} komplexů s jednou přímo koordinovanou molekulou vody a je popsán rovnicemi (13) a (14),

$$R_{ip}^{OS} = C^{OS} \left(\frac{1}{aD} \right) [7J(\omega_s) + 3J(\omega_H)] \quad (13)$$

$$J(\omega)R_{ip}^{OS} = R_c \left[\frac{1 + 1/4(i\omega\tau_d + \frac{\tau_d}{\tau_{Si}})^{1/2}}{1 + (i\omega\tau_d + \frac{\tau_d}{\tau_{Sj}})^{1/2} + 4/9(i\omega\tau_d + \frac{\tau_d}{\tau_{Sj}}) + 1/9(i\omega\tau_d + \frac{\tau_d}{\tau_{Si}})^{3/2}} \right] \quad (14)$$

$$j=1,2; \tau_d = a^2/D$$

kde C^{OS} je konstanta ($5.8 \cdot 10^{-13} s^{-2} M^{-1}$); a vzdálenost související s molekulovou velikostí a distribucí náboje komplexu; D relativní distribuční koeficient rozpuštěné látky a rozpouštědla.

Druhá sféra

Zvýšení relaxivity způsobené vnější sférou může mít v principu ještě další příspěvek způsobený přítomností molekul vody vázaných ve druhé koordinační sféře paramagnetického iontu prostřednictvím vodíkových vazeb s polárními skupinami ligandu. Tento člen (SS) může být separován od příspěvku vnější sféry pouze v případě, je-li residenční čas vody ve druhé sféře delší než difúzní korelační čas τ_D . V tomto případě pak kvantitativní popis efektů na relaxivitu je analogický tomu pro vodu ve vnitřní sféře.

Experimentální svědectví o přítomnosti této interakce je obtížné obdržet a v mnoha případech může jeho uvažování pouze reprezentovat nepatrnou korekci k relaxivitě vnější či vnitřní sféry v tradičním modelu. Nicméně, v mnoha případech pečlivá analýza relaxačních časů rozpouštědla jako funkce síly magnetického pole, pH a teploty ukazuje, že zahrnutí tohoto příspěvku a jeho separace od příspěvků vnější a vnitřní sféry je oprávněné.

Některé **parametry** ovlivňujících relaxivitu, které vystupují v rovnicích výše uvedených, mohou být různým způsobem **optimalizovány**, aby zvyšovaly účinnost paramagnetických CA a tak současně minimalizovaly efektivní podávanou dávku CA pacientovi.

V následujícím odstavci budou zmíněny nejdůležitější z nich, případně bude i uvedena cesta k jejich optimalizaci.

První dva parametry,

- r ... vzdálenost mezi protonem vody a paramagnetickým iontem,
- q ... počet koordinovaných molekul vody,

se týkají síly dipolární interakce mezi elektronem a jádrem, přičemž s rostoucím q a s klesající hodnotou r relaxivita výrazně stoupá.

- τ_R ... rotační korelační čas molekuly,

představuje v podstatě rychlost, kterou se komplex v roztoku otáčí kolem své osy. Z hlediska BSM teorie by měl být tento korelační čas co nejdelší, tj. rotace velmi pomalá. Zpomalení rotace lze dosáhnout zvýšením efektivního objemu molekuly například připojením molekuly komplexu na vhodný makromolekulární nosič.¹³ Konkrétně se může jednat například o vytvoření kovalentního konjugátu mezi paramagnetickým komplexem a pomalu rotujícími makromolekulárními substráty jakými jsou například dendrimery, nebo tvorbou nekovalentního aduktu mezi vhodně funkcionalizovaným komplexem a endogenním (např. HSA) nebo exogenním (např. poly- β -cyklodextrin) substrátem.

Dalším parametrem ovlivňujícím relaxivitu je

- T_{1e} ... elektronový relaxační čas,¹⁵

který lze optimalizovat volbou paramagnetického kationtu, přičemž Gd^{3+} , Mn^{2+} a Fe^{3+} se jeví být (co se tohoto parametru týče) ideální pro jejich dlouhý T_{1e} a velký magnetický moment.

- τ_M ... residenční čas koordinované molekuly vody

má vliv na celkový korelační čas, přičemž vyšší relaxivity je dosaženo u molekul s rychlou výměnou vody, neboť právě u těch je v důsledku rychlé výměny více molekul vody v roztoku ovlivněno přítomností paramagnetického iontu. Výměna ale nesmí být příliš rychlá, aby došlo k efektivnímu přenosu magnetické informace z centrálního atomu.

Při porovnání obvyklých hodnot korelačních časů vyplyne, že pro relaxivitu je ve výše uvedených vztazích určující pouze τ_R a T_{1e} (neboť τ_M je u běžných ligandů o tři řády větší).

Oddělení vlivu τ_R a T_{1e} na relaxivitu vychází z toho, že zatímco τ_R není nijak závislý na magnetické indukci, T_{1e} tuto závislost vykazuje. Technikou, která se používá pro rozlišení těchto parametrů, je měření relaxivity při proměnné síle magnetického pole neboli nukleární magnetická relaxační disperze ($^1\text{H NMRD}$ = Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion).

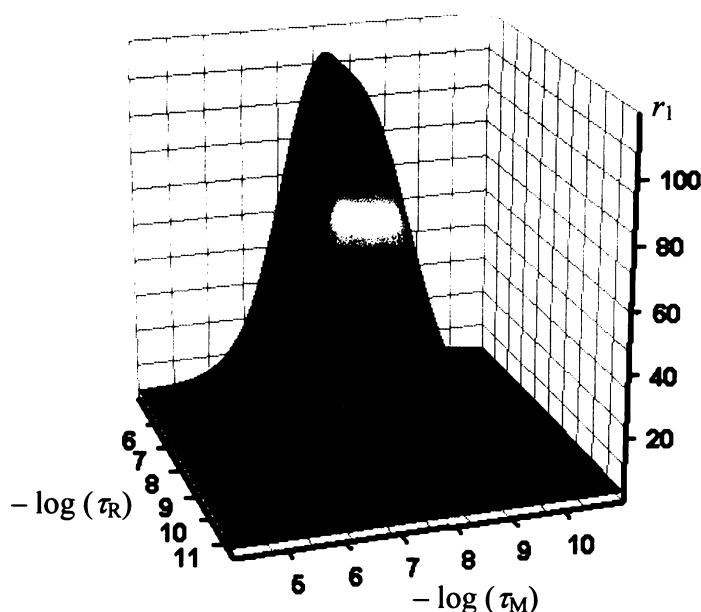
Zatímco v oblasti slabších polí má nad relaxivitou „kontrolu“ parametr T_{1e} , tak v oblasti magnetických polí vyšších než 0.2 T je to τ_R . Podle charakteru $^1\text{H NMRD}$ profilu v této oblasti lze rotační korelační čas odhadnout.

Kromě vysoké relaxivity musí CA splňovat i **další podmínky**,¹⁴ jako je

- Vysoká stabilita, neboť injekce gramového množství gadolinia představuje problém s potenciální toxicitou, což vyžaduje silnou komplexaci kovu ligandem. Toxické mohou být však jak Gd^{3+} ionty, tak volný ligand. Ion Gd^{3+} totiž může tvořit s řadou běžných biogenních iontů jako jsou fosforečnanové nebo uhličitanové anionty nerozpustné soli, zatímco ligand může komplexovat kationty krevní plazmy, například Ca^{2+} či Mg^{2+} .
- Dobrá rozpustnost ve vodě je třeba z důvodu nutnosti používat relativně vysokých koncentrací CA.
- Nízká osmolalita klinicky používaných roztoků, která je zárukou méně bolestivých injekcí, neboť se zabrání osmotickému šoku v místě aplikace vlivem vysokého náboje komplexu. (Jejího snížení lze dosáhnout například vhodnou volbou ligandu nebo vytvořením stabilního iontového páru mezi kontrastní látkou a vhodným komplementárním iontem.)

Vzhledem k tomu, že je třeba zobrazovat různé tkáně, je nutné komplex chemicky „naladit“ tak, abychom dosáhli požadované biodistribuce. V tomto ohledu je důležitý nejen celkový náboj komplexu, který ovlivňuje způsob vylučování z organismu, ale i přítomnost různých hydrofobních a hydrofilních skupin. Poslední generace kontrastních látek obsahuje navíc ve své struktuře část (např. krátký peptidový řetězec), která je schopná látku cíleně dopravit pouze do jednoho typu tkáně, což umožňuje jednak zvýšit rozlišení snímku v klinicky důležité oblasti a zároveň významně snížit aplikační dávku kontrastní látky před měřením.

Je patrné, že výsledná relaxivita závisí na velkém množství vzájemně propojených parametrů, které je pro dosažení maximální účinnosti kontrastní látky nutno optimalizovat. Maximální teoreticky dosažitelná relaxivita dosahuje hodnoty přes $100 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, přitom všechny nízkomolekulární kontrastní látky používané v praxi vykazují hodnoty relaxivity kolem $5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (Obrázek 16).



Obrázek 16. Simulace teoreticky dosažitelné relaxivity v závislosti na τ_M a τ_R . Simulace byla provedena při 0.5 T a 37 °C. Čtvereček označuje oblast klinicky používaných kontrastních látek

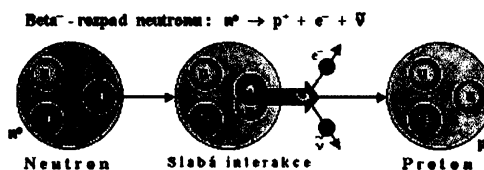
Za hlavní příčiny nízké relaxivity používaných kontrastních látek je považována pomalá výměna molekul vody (tedy příliš dlouhý residenční čas τ_M) a příliš krátký rotační korelační čas τ_R .

II.-3.3. Radiofarmaka¹⁶

Léčení nádorových onemocnění se v současné době opírá o tři hlavní metody: chirurgie, chemoterapie a radioterapie, přičemž tyto tři hlavní terapeutické postupy se často kombinují. Radioterapie nádorových onemocnění je založena na účincích ionizujícího záření na živou tkáň, kdy dostatečně vysoké dávky záření jsou schopny inaktivovat a usmrctvat buňky. Lze očekávat, že v budoucnu se bude výrazněji uplatňovat i imunoterapie či genová terapie nádorů. Strategickým cílem radioterapie je selektivní likvidace nádorového ložiska při co nejmenším poškození okolních zdravých tkání. Ozáření okolních tkání se přitom nikdy nedá zcela vyhnout

(což je problémem zejména u vnějšího ozařování záření γ a X (^{173}Cs , ^{60}Co). Do cílové oblasti je třeba zavést dostatečně vysokou dávku záření (pro nádorové buňky letální) takovým způsobem, aby okolní zdravé tkáně nebyly enormně poškozeny. Úkolem radioterapie v klinické praxi je najít optimální kompromis mezi těmito dvěma protichůdnými požadavky. Alternativní metodou je tzv. **radioizotopová terapie otevřenými zářiči**. Ta je založena na následujícím principu. Aplikujeme-li do organismu radioaktivní látku, vstoupí do metabolického procesu způsobem, který je dán chemickou formou látky – její farmakokinetikou. Podaří-li se nám označit vhodným radionuklidem látku, která se selektivně vychytává a akumuluje v nádorové tkáni, můžeme dostat velmi efektivní způsob radiační likvidace tumoru „zevnitř“. Pro většinu nádorových procesů bohužel takovou vhodnou látku nemáme.

Pro terapii otevřenými radionuklidy je vhodné pouze záření s malou pronikavostí, především záření β^- (Obrázek 17) (jehož dosah v tkáni je zpravidla menší než 4 mm). Krátký dolet tohoto záření v tkáni zajišťuje, že účinek záření je lokalizován na orgán či oblast tkáně, v níž se radioaktivní látka vychytala. Záření γ má u této metody jen malý terapeutický účinek a jeho přítomnost naopak způsobuje nežádoucí ozáření i jiných orgánů a tkání než cílové tkáně. U smíšených zářičů beta-gama však záření gama může být s výhodou využito pro scintigrafické zobrazení distribuce radiofarmaka v organismu a monitorování průběhu terapie.



Obrázek 17. Znázornění vzniku záření β^-

Stojí za povšimnutí, že základní požadavek „co nejvíce beta, co nejméně gama“ na radionuklidy pro terapii je opačný než na radionuklidy pro diagnostiku (scintigrafii), kde hlavní složkou musí být záření gama a záření beta by mělo být zastoupeno co nejméně, nebo vůbec (jak je tomu ideálně u ^{99m}Tc).

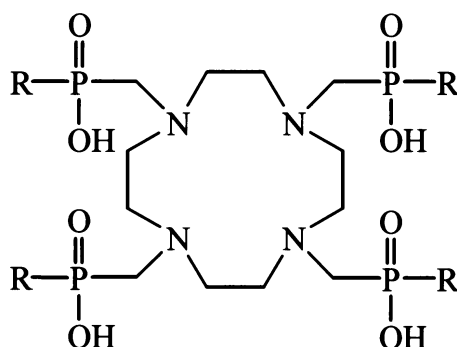
Tato terapie je ve spojení s transplantací kostní dřeně vhodná například pro pacienty s mnohočetným myelomem, neboli zhoubným nádorovým onemocněním krve. Jedná se prakticky o nevléčitelnou chorobu, ale terapie jako například chemoterapie, transplantace kostní dřeně, celotělové ozařování nebo právě radioizotopová terapie otevřenými zářiči poskytuje pacientům s touto chorobou značnou úlevu hlavně od silné bolesti kostí, které tuto nemoc provázejí.

III. Tetrafosforová analoga DOTA

III.–1a. Makrocyclické ligandy

Před několika lety byly započaty studie tetrafosforových analogů ligandu DOTA za účelem nalezení nových ligandů s potenciálně lepšími vlastnostmi než má rodičovská sloučenina se čtyřmi acetátovými pendantními skupinami. Konkrétně byly syntetizovány ligandy uvedené v *Tabulce 3*.

Tabulka 3. Struktury již připravených ligandů; R může být jedna z níže uvedených skupin



		ref.
	-H	DOTP ^H 17
	-CH ₃	DOTP ^{Me} 18
	-CH ₂ CH ₃	DOTP ^{Et} 19
	-C ₆ H ₅	DOTP ^{Ph} 20,21
	-CH ₂ C ₆ H ₅	DOTP ^{Bn} 22
	-OH	DOTP ^{OH} 23–25
R =	-OCH ₂ CH ₃	DOTP ^{OEt} 19
	-O(CH ₂) ₂ CH ₃	DOTP ^{OPr}
	-O(CH ₂) ₃ CH ₃	DOTP ^{OBu} 19,26
	-OCH ₂ CF ₃	DOTP ^F 27
	-2-CH ₃ OC ₆ H ₄ CH ₂	DOTP ^o 28
	-3-CH ₃ OC ₆ H ₄ CH ₂	DOTP ^m 28
	-4-CH ₃ OC ₆ H ₄ CH ₂	DOTP ^p 28

Jedná se tedy o aminoalkylfosfonové a aminoalkylfosfinové kyseliny.

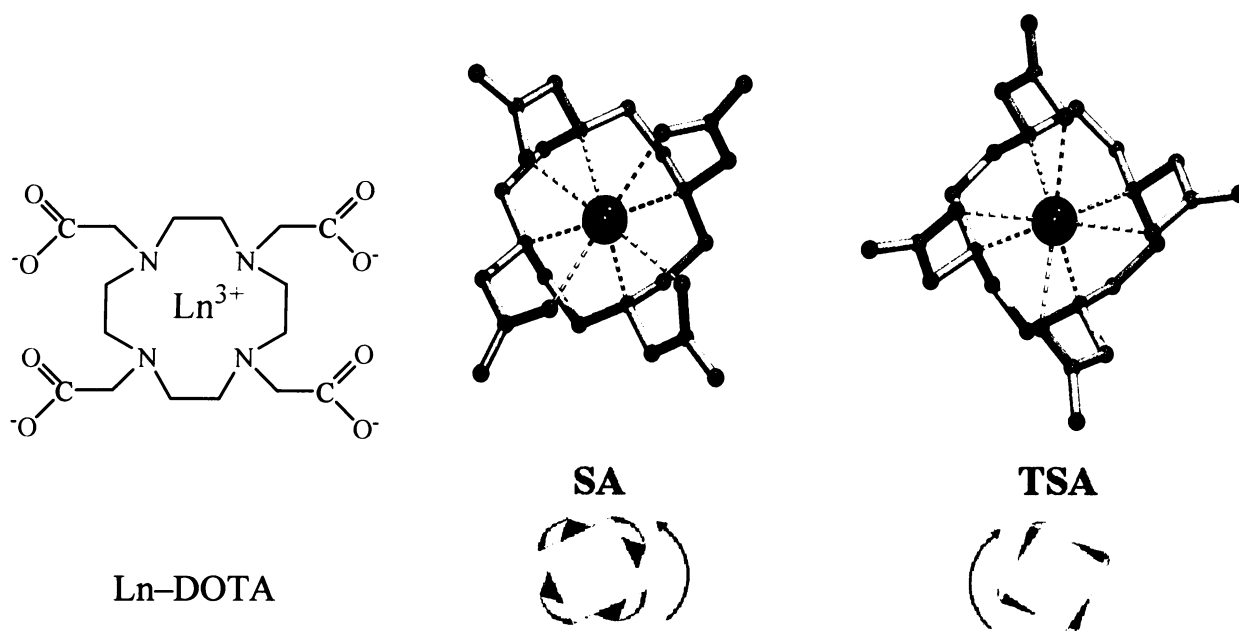
(Fosfonové kyseliny jsou odvozeny od kyseliny fosforečné nahrazením jedné hydroxylové skupiny organickým substituentem. Jejich obecný vzorec je R-PO₃H₂. Fosfinové pak nahrazením jedné hydroxylové skupiny organickým substituentem a druhé buď atomem vodíku – monosubstituované mající vzorec R-PO₂H₂, nebo druhým organickým zbytkem, kdy hovoříme o disubstituovaných kyselinách o vzorci R¹R²PO₂H.)

Struktura všech ligandů byla studována zejména NMR spektroskopií. U ligandů DOTP,²⁴ DOTP^{Ph} (ref.²⁰), DOTP^{Bn} (ref.²⁹) se podařilo změřit i jejich struktury krystalové.

III.–1b. Izomerie komplexů v roztocích

V případě, že si představíme, jak bude vypadat sterické uspořádání komplexů typu uvedeného na *Obrázku 18* (Ln^{3+} ion leží mezi dvěma koplanárními rovinami tvořenými jednak atomy dusíku ve spodní rovině a jednak atomy kyslíků v rovině horní) je patrné, že se zřejmě budou tyto komplexy vyskytovat v roztoku v různých izomerních formách. Jedním typem izomerie je konformace ethylenových můstků makrocyclu, která se označuje λ nebo δ , a druhým typem je natočení pendantních skupin, respektive vzájemné natočení rovin proložených kyslíkovými a dusíkovými atomy.¹³ Tento typ izomerie se označuje jako Λ nebo Δ . Ve výsledku tedy vznikají dva enantiomerní páry diastereoizomerů, které se vyskytují v roztoku v dynamické rovnováze. Protože jednotlivé enantiomery nejsou v rámci NMR spektroskopie rozlišitelné, jsou z těchto čtyř izomerů pozorovány pouze dvě sady signálů, které vždy reprezentují jeden enantiomerní pár. Enantiomerní pár $\Lambda(\delta\delta\delta\delta)$ a $\Delta(\lambda\lambda\lambda\lambda)$ se souhrnně označuje jako izomer SA (Square Antiprism) a pár enantiomerů $\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)$ a $\Delta(\delta\delta\delta\delta)$ je nazýván izomerem TSA (Twisted Square Antiprism) (*Obrázek 18*). Izomery SA a TSA jsou také někdy označovány písmeny M (odpovídá izomeru SA) a m (TSA), což původně značilo jejich relativní zastoupení v komplexu Gd–DOTA (m = minority, M = majority).

Izomery SA a TSA se liší zejména velikostí dutiny mezi rovinami kyslíkových a dusíkových atomů. Tato skutečnost vysvětluje změnu zastoupení obou izomerů v roztocích v závislosti na iontovém poloměru lanthanoidového iontu. Izomer TSA, který je prostornější, převažuje v začátku lanthanoidové řady, zatímco izomer SA u jejího konce. Další odlišností ve struktuře izomerů je vzájemná vzdálenost koordinovaných kyslíkových atomů pendantních ramen. V izomerech typu TSA je tento prostor těsnější, což destabilizuje vazbu koordinované molekuly vody a komplexy tohoto typu vykazují až 50× vyšší rychlost výměny vody.



Obrázek 18. Strukturální model izomerů SA a TSA komplexů Ln-DOTA (vpravo nahoře) a schéma vzájemné orientace rovin dusíkových a kyslíkových atomů (vpravo dole)

Jedním ze současných přístupů vedoucích ke zdokonalení kontrastních látek je syntéza takových ligandů, které v případě komplexů s iontem Gd^{3+} preferují izomer TSA. Těmi jsou právě tetrasubstituované deriváty cyklenu s fosfonovou či fosfinovou pendantní skupinou.

U těchto komplexů se setkáváme ovšem i s izomerií *R/S* na chirálním atomu fosforu. V důsledku toho, že u těchto Ln^{3+} komplexů tetrafosfinátů či monoesterů tetrafosfonátů je zastoupen pouze izomer *m* a *R* a *S* orientace každé skupiny je nezávislá na konformaci ostatních fosfonátů, můžeme se u nich setkat se 6 diastereomery (*RRRR*, *RRRS*, *RRSS*, *RSRS*, *SSSR* a *SSSS*), poskytujícími často velice komplikovaná NMR spektra. *R/S* izomerie byla u některých z těchto tetrafosforových analogů DOTA do detailů studována.^{27,30}

III.–2. Metody studia ligandů a komplexů

III.–2.1. Potenciometrické titrace (Acidobazické vlastnosti ligandů, stabilita komplexů)^{17,19,20,21,23,25,27,31–36}

Srovnáme-li hodnoty disociačních konstant aminových skupin tetrafosforových ligandů s výše zmiňovaným DOTA se čtyřmi acetátovými rameny, zjistíme, že bazicita klesá v pořadí aminofosfonová > aminokarboxylová > aminofosfinová kyselina.³⁷ Vyšší bazicita aminové skupiny aminofosfonátové kyseliny je vysvětlována slabším odtahováním elektronů a delokalizací záporného náboje skupiny $-\text{PO}_3^{2-}$. Na bazicitu aminových skupin ve fosfinátech má vliv i substituent na atomu fosforu.

Hodnoty konstanty stability komplexu pak korelují s bazicitou koordinujících se donorových skupin. Čím je donorová skupina bazičtější, tím je výsledná hodnota konstanty stability větší.

Tyto azacykly tvoří termodynamicky stabilní komplexy s dvojmocnými a trojmocnými ionty. Zejména komplexy s Ln^{3+} ionty jsou kineticky stabilní a jejich disociace je díky jejich rigidní struktuře velice pomalá.

III.–2.2. Studium struktury ligandů a komplexů v pevné fázi

Kromě komplexů v roztoku, kde je struktura poněkud „volnější“, byla u řady z nich provedena i rentgenostrukturní analýza. Konkrétně se podařilo naměřit krystalové struktury u komplexů uvedených v *Tabulce 4*.

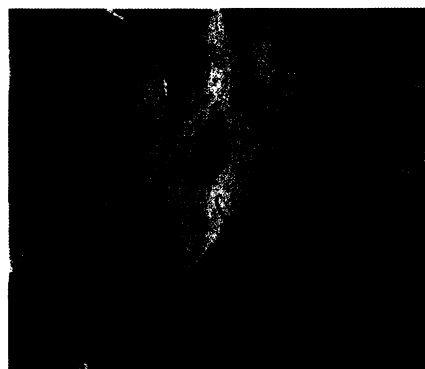
Tabulka 4. Komplexy studované RTG

DOTP Bi^{3+31} , Gd^{3+38} , Mn^{2+39} , Ni^{2+39}

DOTP^{Ph} Ce^{3+40} , La^{3+40}

DOTP^{Bn} Dy^{3+41} , Eu^{3+28} , Gd^{3+28} , La^{3+28} , Y^{3+20} , Yb^{3+}

U komplexů Mn–DOTP³⁹ (*Obrázek 19*) a Ni–DOTP³⁹ byla struktura pevné fáze zkoumána i SEM (SEM = Scanning Electron Microscopy).



Obrázek 19. SEM snímek Mn–DOTP

Naměřeny byly i rentgenové struktury některých ligandů. Konkrétně se jednalo o ligandy DOTP^{Ph} (ref.²⁰), DOTP (ref.²⁴) a DOTP^{Bn} (ref.²⁹).

III.–2.3. EPR

Komplexy Cu–DOTP⁴² a Cu–DOTP^{Ph} (ref.²¹), byly charakterizovány rovněž elektronovou paramagnetickou rezonanční spektroskopií, čímž byla získána další sada informací o jejich struktuře.

III.–2.4. NMR (LIS)

Hlavní metodou studia komplexů těchto ligandů je ale bezpochyby nukleární magnetická rezonanční spektroskopie. Jak již bylo zmíněno v kapitole týkající se LIS, jsou roztoky komplexů s paramagnetickými Ln³⁺ ionty schopné indukovat ve spektru posun rezonance měřeného jádra (nejčastěji ¹⁷O nebo ³¹P). Hodnoty LIS byly měřeny u řady z nich, přičemž z naměřených závislostí byla určována hydratace komplexů v roztoku.^{28,31,43–46}

III.–3. Použití komplexů

III.–3.1. Posuvová činidla, činidla pro NMR termometrii a pH-metrii *in vivo*

Komplexy byly dále studovány z pohledu jejich potenciálního využití jako posuvových činidel zejména pro tzv. „biologické kationty“ (⁶Li, ⁷Li, ²³Na, ¹³³Cs). Nejvhodnější kombinace vlastností testovaných NMR posuvových činidel byly nalezeny u komplexů Tm–DOTP^{9,10,47–70} a Dy–DOTP.^{71,72} Výhodami těchto komplexů jsou zejména nízká toxicita, která je pro jejich využití *in vivo* nezbytná, dále pak hydrolytická stabilita C–P vazeb vůči fosfatázám, vysoká afinita ke kationtům alkalických kovů, vysoká stabilita v roztoku či absence srážení v přítomnosti vápenatých iontů. Byl zkoumán i vznik iontových párů mezi Co(en)³⁺ a Tm–DOTP za účelem dosažení nízkoosmolaltní formy posuvového činidla.⁷³

Paramagnetické komplexy mohou dále představovat excelentní NMR pH indikátory v případě, že nesou funkční skupiny, jejichž pK_A hodnoty spadají do oblasti, o kterou se zajímáme.

Konkrétním příkladem tohoto komplexu je Yb–DOTP, který vykazuje závislost chemického posunu ^1H resonancí v oblasti pH 5.0–7.0 při teplotě 39 °C a může tak být použit jako NMR sonda pro měření pH *in vivo*.¹¹

Kromě pH jsou ^1H a ^{31}P posuny komplexu Tm–DOTP silně závislé na teplotě, což může být využito v NMR termometrii *in vivo*.^{74–77} Na rozdíl od méně citlivých dříve používaných termometrických materiálů jako je voda (měření ^1H posunů) či fluorouhlíku (měření ^{19}F posunů), vykazují posuny jaderných spinů blízko paramagnetického centra komplexu Tm–DOTP přibližně o dva řády vyšší citlivost vůči teplotě. V teplotní oblasti 25–47 °C a při fyziologicky relevantním pH jsou ^1H a ^{31}P posuny dokonce lineární funkcí teploty. Teplotu i pH lze s pomocí Tm–DOTP měřit i simultánně.⁷⁸

Podobná teplotní závislost byla pozorována i u ^1H a ^{31}P posunů Ln^{3+} komplexů cyklenu tetrasubstituovaného fenylfosfinátovými skupinami (DOTP^{Ph}).³⁰ Díky relativně velké hydrofobicitě ligandu mohou tyto komplexy vykazovat odlišnou biodistribuci v těle.

III.–3.2. Kontrastní látky pro MRI

Relaxivní data (T_1 , T_2 , NMRD profily)^{19,27–29,31,38,79–84} byla také studována u řady převážně Gd^{3+} komplexů s těmito ligandy za účelem jejich využití jako CA pro MRI. S tím jsou spojeny i studie zaměřené na biodistribuci těchto komplexů v těle, jež je především závislá na hydrofilicitě ligandu komplexu.^{85,86} Jedná se ale ve většině případů o komplexy bez vody ve vnitřní koordinační sféře, jejíž přítomnost je pro praktické využití v této oblasti prakticky nezbytná. Mnoho komplexů ale vykazuje přesto vysokou relaxivitu díky velkému příspěvku vnější případně druhé koordinační sféry. Zejména se jedná o komplex Gd–DOTP.^{38,84}

III.–3.3. Radiofarmaka

V neposlední řadě byly komplexy ligandů tetrasubstituovaných fosfonátovou skupinou s některými radioaktivními izotopy testovány jako potenciální otevřené zářiče pro léčení různých forem rakovinného bujení. Jako radionuklid bylo testováno ^{166}Ho , neboť se jedná o smíšený beta – gama zářič, kde záření beta jasně převažuje, což je – jak bylo výše uvedeno – ideální případ pro tento druh terapie. Jeho beta záření má také menší pronikavost než u dříve testovaných látek (např. ^{153}Sm). Dobrým chelatačním činidlem pro tento izotop, které s ^{166}Ho vytvoří stabilní

komplex a dopraví jej do místa účinku, je ligand DOTP (právě z důvodu stability komplexu a afinitě DOTP ke kostem).^{87–96}

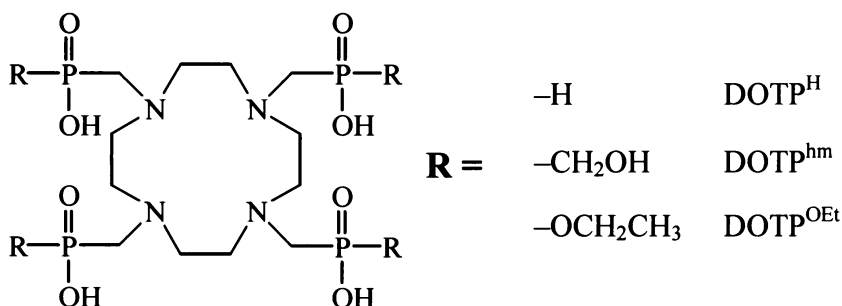
Dalšími radioizotopy, využívajícími se ve spojení s ligandem DOTP je alfa zářič ^{212}Bi (ref.^{32,93,97}) a ^{64}Cu (ref.^{98,99}). Měď se ukázala být všestranným radionuklidem z důvodu potenciální aplikace v zobrazovacích metodách i terapii a možnosti připravit požadovaný izotop na biomedicinském cyklotronu.

III.–4. Další výzkum a aplikace těchto komplexů

Komplexy uvedených ligandů byly zkoumány z řady dalších pohledů a mají i spoustu jiných aplikací, které zde nebudou pro jejich menší vztah k diplomové práci rozebrány do podrobností. Jsou jimi například studium luminiscenčních vlastností na řadě komplexů zejména tetrafosfínátových (DOTP^{Me} (ref.^{79,100,101}), DOTP^{Bn} (ref.^{41,43,79,100,101,102–104}), DOTP^o (ref.²⁸), DOTP^m (ref.²⁸), DOTP^p (ref.²⁸)), ale i tetrafosfonátových (DOTP³⁸) ligandů s ionty Eu^{3+} , Nd^{3+} , Tb^{3+} a Yb^{3+} , molekulární rozlišení R- a T-stavu lidského hemoglobinu právě pomocí paramagnetického Gd^{3+} komplexu¹⁰⁵ a potažmo i stabilizace T-stavu,¹⁰⁶ NMR studie interakcí mezi γ -cyklodextrinem a Tm–DOTP¹⁰⁷ nebo interakcí mezi kationtovými a aniontovými komplexy,¹⁰⁸ spektrální rozlišení chirálních makrocyclických paramagnetických komplexů NMR technikami¹⁰⁹ a podobně.^{110–112}

IV. Cíl práce

Cílem této práce bylo syntetizovat 3 makrocyclické ligandy, jejichž struktura je uvedena na obrázku (Obrázek 20). Jedná se o tetrafosforová analoga známého a hojně využívaného ligandu DOTA, které se od sebe liší pouze jednou skupinou na atomu fosforu.



Obrázek 20. Struktury studovaných ligandů

Dále jsme se chtěli pokusit o syntézu jejich komplexů s Ln^{3+} ionty, které by byly studovány jak v pevné fázi rentgenostrukturní analýzou, tak ve fázi kapalné, a to v první řadě NMR spektroskopii. Pomocí NMR spektroskopie bychom se dále pokusili naměřit rovněž set relaxometrických dat pro Gd^{3+} komplexy studovaných ligandů, i když se (na rozdíl od DOTA) nejedná o komplexy s molekulou vody v první koordinační sféře. Může být u nich uvažována tzv. druhá hydratační sféra, jejíž molekuly vody mohou být rovněž ovlivněny přítomností paramagnetického komplexu. Komplexy bychom dále chtěli studovat i jinými, spíše doplňkovými, metodami, které by nám pomohly objasnit další skutečnosti důležité zejména pro zpracování informací obdržených z NMR studií. Jedná se o EPR spektroskopii, která poskytne důležitá data použitelná při zpracování NMR relaxometrických dat, a potenciometrické studie, ze kterých bychom získali informace o bazicitě ligandů a stabilitě některých komplexů.

V. Experimentální část

V.-1.a. Seznam použitých chemikálií

➤ *Chemikálie a zásobní roztoky pro potenciometrické titrace*

Voda použitá pro titrace byla čištěna systémem Milli-Q (Millipore). Zásobní roztoky kyseliny chlorovodíkové (~0.03 M) byly připraveny z vodných roztoků 35% kyseliny (puriss., Fluka). Komerční NMe₄Cl (99%, Fluka) byl rekrystalizován z horkého *i*-PrOH a pevná sůl byla sušena nad P₂O₅ ve vakuu do konstantní hmotnosti. Roztok CO₂-prostého NMe₄OH (~0.2 M) byl připraven iontovou výměnou na kolonce naplněné iontoměničem Dowex 1 (OH⁻-forma, pod argonem, s použitím CO₂-prosté vody) z NMe₄Cl. Roztok hydroxidu byl standardizován hydrogenftalátem draselným a roztok HCl ~0.2 M roztokem NMe₄OH. Zásobní roztoky jednotlivých kovů (~0.05 M) byly připraveny rozpuštěním hydrátů MCl₂ a MCl₃ o potřebné čistotě. Obsah iontu kovu v roztoku byl určen titrací se standardním roztokem Na₂H₂edta. Analytická koncentrace roztoku ligandu (~0.014) byla určena společně s vypřesňováním protonizačních konstant programem OPIUM.¹¹⁴

➤ *Chemikálie pro syntézu ligandů a komplexů*

Pro syntézu ligandů a komplexů (reagencie, rozpouštědla, roztoky na úpravu pH) byly použity komerčně dostupné chemikálie (Lachner, Strem, Aldrich, Fluka) o běžné čistotě, které nebyly dále dočišťovány. Při syntézách použitý paraformaldehyd byl odfiltrován ze starých vodných roztoků formaldehydu (Lachema).

V.-1.b. Metody charakterizace připravených látek

➤ *NMR spektroskopie*

Charakterizační spektra byla měřena na NMR spektrometru Varian^{UNITY} INOVA 400, s rezonanční frekvencí 400 MHz pro jádro ^1H , 162 MHz pro jádro ^{31}P a 101 MHz pro jádro ^{13}C . Spektra byla měřena v rozpouštědlech D_2O a CDCl_3 . ^1H a ^{13}C NMR spektra byla referencována na chemické posuny vnitřních standardů: SiMe_4 ($\delta_{\text{H}} = 0$, $\delta_{\text{C}} = 0$ nebo $t\text{-BuOH}$ ($\delta_{\text{H}} = 1.25$, $\delta_{\text{C}} = 32.6$ a 72.77) nebo vůči signálu rozpouštědla HDO ($\delta_{\text{H}} = 4.70$), CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.21$) a CDCl_3 ($\delta_{\text{C}} = 77.00$). Pro referenci v ^{31}P NMR spektrech byl jako vnější standard používán 85% vodný roztok kyseliny fosforečné ($\delta_{\text{P}} = 0$). Při měření většiny ^{31}P a ^{13}C NMR spekter byl použit „decoupling“ jader ^1H . Hodnoty chemických posunů jsou uvedeny v ppm. Hodnoty interakčních konstant v Hz.

➤ *Tenkovrstvá chromatografie (TLC = Thin Layer Chromatography)*

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na destičkách Silufol (Kavalier) s hliníkovou fólií, sorbentem Silpearl (širokoporézní silikagel podle Pitry) a škrobem jako pojídlem.

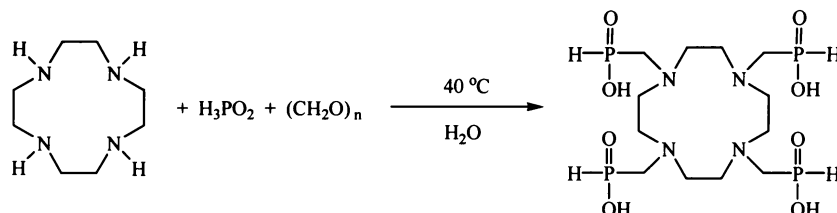
➤ *Elementární analýza*

Elementární analýza byla provedena na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze. Stanoveny byly hmotnostní obsahy prvků uhlíku, vodíku a dusíku. Hodnoty obsahů jednotlivých prvků jsou uvedeny v procentech a jsou zaokrouhleny na jedno desetinné místo.

V.-1.c. Syntéza ligandů a komplexů

Příprava ligandů

DOTP^H

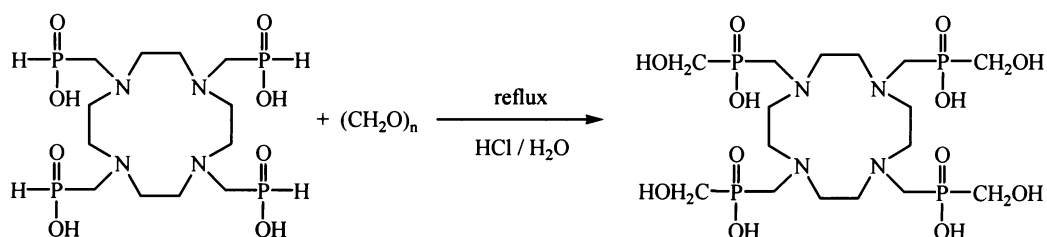


V 50 ml baňce byl asi ve 20 ml vody rozpuštěn 1 g cyklenu a přidáno 7.23 ml (12 ekvivalentů) 50% vodného roztoku H₃PO₂. Za míchání a při teplotě 40 °C bylo během jedné hodiny po malých dávkách přidáváno 0.78 g (4.5 ekvivalentu) paraformaldehydu. Směs se nechala míchat při téže teplotě přes noc. Nerozpuštěný paraformaldehyd byl odfiltrován na fritě č. 4, rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce (RVO) a provedena chromatografie směsi na silném katexu (Dowex 50, H⁺-forma, 300 ml, eluce vodou). Pro dostatečné oddělení přebytku kyseliny fosforené a produktu byly jímány frakce po 25 ml a chromatografie byla několikrát opakována. Čistota frakcí byla kontrolována TLC a následně i NMR spektroskopií. Rozpouštědlo bylo důkladně odpařeno na RVO a získaný produkt ve formě oleje po několika dnech ztuhl v pevnou látku. Výtěžek reakce byl 0.56 g (tj. 20 %).

Charakterizace:

- TLC: Silufol; isopropanol : amoniak (25%) : voda (10:2:7); detekce ninhydrin, R_f 0.5
- NMR:
 - ¹H NMR (D₂O): 2.5 m, 24 H, ²J(H-P) = 8.8 (CH₂-P, NCH₂CH₂N); 7.0 d, 4 H, ¹J(H-P) = 504 (PH)
 - ³¹P NMR (D₂O): 22.5 d, ¹J(P-H) = 499
 - ³¹P {¹H} NMR (D₂O): 22.5 s
- Elementární analýza: C₁₂H₃₂N₄O₈P₄·0.5H₂O
 - nalezeno: C 29.29; H 6.62; N 11.38
 - vypočteno: C 29.22; H 6.74; N 11.36

DOTP^{hm}



Ve 20 ml azeotropické kyseliny chlorovodíkové byl v 50 ml baňce rozpuštěn 1 g ligandu DOTP^H. Za míchání a za refluxu pod zpětným chladičem bylo přidáno 2.61 g (15 ekvivalentů) paraformaldehydu. Směs byla po jednom dni zahřívání chromatografována na silném katexu (Dowex 50, H⁺-forma, 300 ml, eluce vodou). Čistota jednotlivých frakcí byla kontrolována NMR spektroskopii. Rozpouštědlo z frakcí obsahujících produkt bylo odpařeno na RVO a produkt ve formě prášku byl získán triturací oleje acetonem, odsát na fritě č. 4 a dosušen pod vakuem na RVO. Ligand byl uchováván v exsikátoru nad P₂O₅ z důvodu jeho poměrně velké hygroskopicity. Výtěžek reakce byl asi 0.75 g (tj. 60 %).

Charakterizace:

➤ NMR:

¹H NMR (D₂O): 2.9 m; 24 H (CH₂OH, NCH₂CH₂N); 3.5 d, 8 H, ²J(H-P) = 5.6 (NCH₂P)

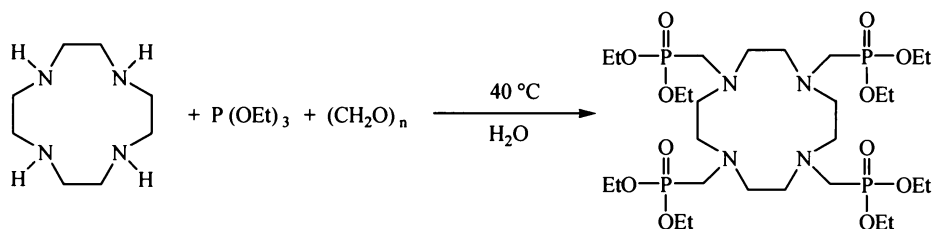
³¹P {¹H} NMR (D₂O): 38.2 s

➤ Elementární analýza: C₁₆H₄₀N₄O₁₂P₄·1.5H₂O

nalezeno: C 30.50; H 6.68; N 8.66

vypočteno: C 30.43; H 6.86; N 8.87

DOTP^{OE}Et



V 50 ml baňce byl rozpuštěn 1 g cyklenu v 9.8 g (10 ekvivalentů) triethylfosfitu. Bylo přidáno 0.89 g (5 ekvivalentů) paraformaldehydu a směs byla zahřívána za míchání na 40 °C po dobu 3 dní. Přebytný paraformaldehyd byl poté odsátý na fritě č. 4 a promyt ethanolem. Produkt byl čištěn chromatografií na silném katexu (Dowex 50, H⁺-forma, 300 ml). Ethanol (2×250 ml) byly eluovány vedlejší produkty reakce a produkt poté 2×200 ml roztoku amoniaku v ethanolu (25% roztok NH₃ : ethanol; 1:3). Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Čistota produktu byla zkontrolována NMR spektroskopií.

Charakterizace:

➤ NMR:

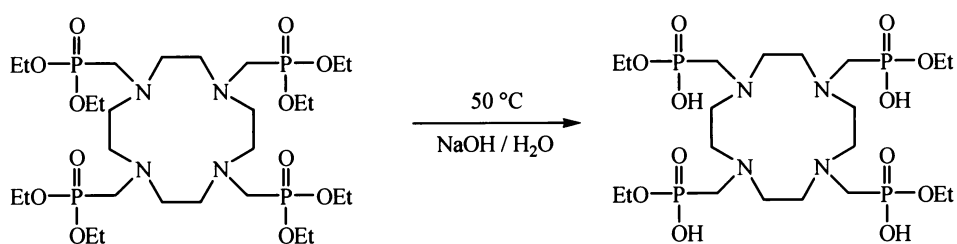
¹H NMR (CDCl₃): 1.3 t, 24 H, ³J(H-H) = 7.2 (CH₃); 2.9 s, 16 H (NCH₂CH₂N); 3.0 d, 8 H,

²J(H-P) = 9.2 (NCH₂P); 4.1 m, 16 H (OCH₂)

¹³C NMR (CDCl₃): 16.5 s (CH₃); 50.6 d, ¹J(C-P) = 151.5 (NCH₂P); 53.4 s (NCH₂CH₂N);

61.5 s (OCH₂)

³¹P {¹H} NMR (CDCl₃): 38.2 s



Produkt z předchozí reakce byl rozpuštěn ve 20 ml 14% vodného roztoku hydroxidu sodného a směs se nechala míchat při teplotě 50 °C po dobu 2 dní. Produkt byl čištěn chromatografií na silném katexu (Dowex 50, 300 ml) a eluován 2×250 ml vody. Ta byla odpařena na RVO. Produkt ve formě prášku byl získán triturací odparku acetonem, odsát na fritě č. 4 a dosušen pod vakuem na RVO. Ligand byl uchováván v exsikátoru nad P₂O₅ z důvodu jeho poměrně velké hygroskopicity. Čistota produktu byla opět zkontrolována NMR spektroskopií. Výtěžek reakce byl 3.19 g (tj. 83 %).

Charakterizace:

➤ NMR:

¹H NMR (D₂O): 1.2 t, 12 H, ³J(H-H) = 6.8 (CH₃); 3.3 m, 24 H (NCH₂P, NCH₂CH₂N); 4.0 m, 8 H (OCH₂)

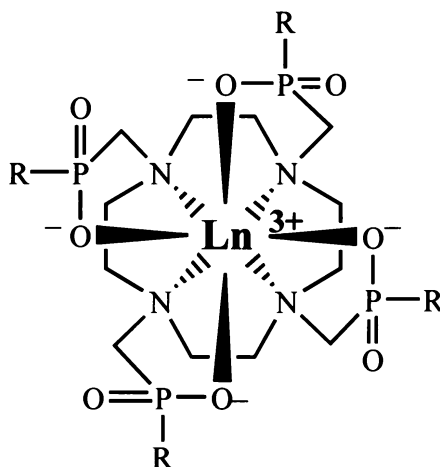
³¹P {¹H} NMR (D₂O): 26.7 s

➤ Elementární analýza: C₂₀H₄₈N₄O₁₂P₄·4H₂O

nalezeno: C 32.65; H 6.94; N 7.63

vypočteno: C 32.79; H 7.70; N 7.65

Příprava komplexů



Příprava Gd³⁺ komplexů ke krystalizaci

0.1 g ligandu bylo rozpuštěno 10 ml baňce v asi 5 ml vody s jedním ekvivalentem hexahydrátu chloridu gadolinitého. pH bylo upraveno vodným roztokem hydroxidu lithného na hodnotu 7–8. Roztok byl ponechán stát asi hodinu při laboratorní teplotě. Rozpouštědlo bylo poté odpařeno na vakuové odparce, produkt byl přemístěn do malé vialky, rozpuštěn v malém množství vody a bylo přidáno pár kapek ethanolu. Malá vialka se umístila do větší s acetonem, který se nechal difundovat do roztoku komplexu.

Příprava komplexů pro NMR studie

➤ *Komplexy pro studium izomerie v roztocích*

Hexahydrát chloridu lanthanoidu a ligand v 5% nadbytku byly rozpuštěny v D₂O do jejich celkové koncentrace 0.1 M. pD bylo upraveno roztokem KOD v D₂O na hodnotu 7 a po hodině byl přebytečný kov odstraněn promytím malou kolonkou sorbentu Chelex 20. Roztok byl testován na přítomnost volného kovu pomocí xylenolové oranže v acetátovém pufru (5.7). Kapka roztoku komplexu byla přidána do roztoku indikátoru, oranžové zbarvení indikuje nepřítomnost volného Ln³⁺ iontu, červenofialová barva by pak indikovala jeho přítomnost.

Komplexy pro ostatní NMR studie

–měření T_1 , T_2 , LIS, ^{31}P EXSY spektra, teplotní závislost ^{31}P NMR spekter

Ligand byl v 10% nadbytku smíchán s hexahdrátem chloridu lathanoidu do celkové koncentrace komplexu 0.1 M, směs byla rozpuštěna ve vodě a pH upraveno roztokem hydroxidu draselného na hodnotu 6. Po hodině byla ověřena nepřítomnost volného kovu roztokem xylenolové oranže (viz. výše). V případě měření ^{17}O LIS, T_1 , T_2 a ω byla do roztoku přidána H_2^{17}O (0.5 %) a *t*-BuOH (0.5 %).

– ^1H NMRD

Roztoky pro měření ^1H NMRD profilů byly připraveny zředěním roztoků použitých pro měření ^{17}O relaxometrických dat na koncentraci 8 mM.

V.–2. Metody studia ligandů a komplexů

V.–2.1. Potenciometrické titrace

Všechny potenciometrické titrace byly prováděny v redestilované vodě při teplotě 25.0 ± 0.1 °C a iontové síle 0.1 M NMe_4Cl , v rozmezí $-\log[\text{H}^+] = 1.8\text{--}12$ (pokud se začal vylučovat hydroxid kovu již při nižším pH, byla titrace okamžitě ukončena) za použití pH-metru PHM 240, MeterLab™, automatické byrety ABU 900 s výtlačným objemem 2 ml a kombinované elektrody GK 2401B (vše Radiometer, Dánsko). Počáteční objem titrovaného roztoku byl vždy přibližně 5 ml, inertní atmosféra byla udržována stálým proudem dusíku. Těsně před vstupem do titrační nádoby byl dusík ještě nasycen vodní parou průchodem přes 0.1 M vodný roztok chloridu tetramethylamonného. V průběhu každé titrace byla sledována aktuální koncentrace iontů H^+ článkem skleněná– Ag^+/AgCl elektroda (viz. uvedená kombinovaná elektroda GK 2401B), jehož napětí bylo odečítáno s přesností 0.1 mV pomocí pH-metru používaného jako voltmetr. Titračním roztokem byl ve všech případech odměrný roztok NMe_4OH (0.2 M) a jeho přidaný objem byl odečítán s přesností na tisíce mililitru (automatická byreta ABU 900) s relativní přesností 0.35 % (dle údajů výrobce). Do titrační nádoby byly pomocí byret s mikrometrickým šroubem (o objemech okolo ~0.5 ml, ~1.25 ml a ~2.5 ml přesně, VŠCHT Pardubice) odměřovány objemy zásobních roztoků (roztok ligandu (~0.014 M), kovu (~0.05 M), $\text{HCl}/\text{NMe}_4\text{Cl}$) a vody s přesností

na ± 0.002 ml (dle údajů výrobce). Přesné objemy byret byly před použitím zjištěny kalibrací redestilovanou vodou při teplotě 25 °C.

Byla použita technika externí kalibrace: každé vlastní titraci předcházela jedna titrace kalibrační, kde titrovaným roztokem byl roztok připravený smícháním ~ 2.5 ml (přesně) HCl/NMe₄Cl s ~ 2.5 ml (přesně) redestilované vody. Bylo titrováno odměrným roztokem NMe₄OH za stejných podmínek jako u vlastních titrací v rozmezí 1.8–12 jednotek $-\log[\text{H}^+]$. Po kalibrační titraci následovala titrace samotného ligandu nebo systému ligand+kov.

Přidávání titračního roztoku KOH pomocí automatické byrety bylo řízeno počítačovým programem (viz. Programové vybavení). Hadička pro přívod NMe₄OH byla ponořena těsně pod hladinu titrovaného roztoku, ale v případech, kdy se na ní mohl vylučovat nerozpustný hydroxid kovu, byla zavedena níže (t.j. blíže k míchadlu). Před začátkem měření byla elektroda pro urychlení odezvy střídavě po 5–15 minutách po celkovou dobu asi dvou hodin ponořena ve dvou pufrech: vínanovém (nasycený vodný roztok hydrogenvínanu draselného, pH \sim 5.6) a boraxovém (0.1 M vodný roztok Na₂B₄O₇·10H₂O, pH \sim 9.2). Poté byla elektroda ponechána několik minut v destilované vodě (pH 7.0), kde se také dlouhodobě uchovává.

Po přípravě měřící aparatury (důkladné odstranění bublin z hadic byret, vymytí a vysušení měřící nádoby, nastavení proudu inertního plynu, temperování aparatury) byly provedeny nejméně dvě kalibrační titrace. Výsledky první kalibrace obvykle nebyly použitelné, protože elektroda reagovala na změny pH příliš pomalu (k ustálení potenciálu kombinované elektrody na konstantní hodnotě je potřebný určitý čas). Postupně byly prováděny titrace jednotlivých systémů ligand+kov, kterým vždy předcházela nová titrace kalibrační. Vždy po ukončení titrace byl obsah titrační nádoby odsát pomocí vodní vývěvy, promyt 2× destilovanou vodou a 2× acetonem a vysušen. Pro každý titrovaný systém ligand/kov bylo získáno přibližně 12 dvojic kalibrace+titrace, po čtyřech dvojicích kalibrace+titrace ve třech různých poměrech koncentrací ligandu ke kovu: 1:1, 2:1 a 4:1. Z kalibračních titrací byly pomocí použitého počítačového programu určeny parametry elektrody E_0' , S , j_a a j_b pro kalibrační funkci (15):

$$E = E_0' + S(\log[\text{H}^+]) + j_a[\text{H}^+] + j_b(K_w/[\text{H}^+]) \quad (15)$$

Parametr E_0' zahrnuje kromě referentního elektrodového potenciálu skleněné elektrody také potenciál referentní argentochloridové elektrody a konstantní příspěvek inertních iontů (NMe₄Cl, $I = 0.1$ M) k potenciálu rozhraní. Parametr S je tzv. Nernstova směrnice, která je pro teplotu

25 °C teoreticky rovna hodnotě $2,303RT/F = 0,0591$. V praxi však hodnota parametru S kolísá mezi 95–99 % teoretické hodnoty. Parametry j_a a j_b jsou empirickou mírou vlivu iontů H^+ a OH^- na potenciál rozhraní. Určují odchylku od lineární závislosti E na $-\log[H^+]$ v silně kyselé a silně zásadité oblasti.

K_w je konstanta autoprotolýzy vody, $pK_w=13,78$. Hodnota K_w je závislá na iontové síle použité při měření a silně koreluje s parametrem S , proto byla zvolena jako konstantní a hodnota S pak byla vypočtena.

Z kalibrací získané parametry E_0' , S , j_a a j_b byly použity k interpretaci závislosti E na objemu NMe_4OH u následné titrace.

Provedení vlastních titrací

Nejdříve byla provedena poloautomatická titrace, při které byla sledována rychlost ustalování rovnovážného napětí E na kombinované elektrodě. Z pozorování změn titrovaného roztoku byl určen pravděpodobný konec titrace (počátek vylučování pevné fáze – hydroxidu příslušného kovu). Změny ve složení titrovaného roztoku se projevily i kolísáním rovnovážného napětí elektrody. Podle této titrace byl pak sestaven dávkový soubor pro řídicí program, který obsahoval mimo jiné příkazy určující: přidavek NMe_4OH (min. 0.004 ml, běžně 0.01–0.02 ml), čekací dobu mezi přidavkem a odečítáním hodnoty E a dobu ukončení titrace. Příkazy pro odlišné části titrační křivky byly sdruženy do cyklů. Při titraci byly vynechávány ekvivalenční body zvětšením přidavku NMe_4OH za současného prodloužení čekací doby v bodě bezprostředně po ekvivalenci, aby se dostatečně ustálilo rovnovážné napětí elektrody. Celková doba titrace nepřevýšila 1 hodinu a maximální čekací doba na ustálení rovnovážného napětí činila 80 sekund.

Programové vybavení

Pro výpočty rovnovážných konstant (disociačních konstant fosfinových kyselin a konstant stability jejich komplexů s ionty kovů) byl používán program OPIUM[®].¹¹⁴

Jedná se o obecně použitelný program určený pro analýzu rovnovážných stavů v roztocích, používající zobecněné metody nejmenších čtverců. Pro účely potenciometrie byla použita jedna z mnoha kalibračních funkcí, popisující chování kombinované elektrody při titraci, implementovaná do programu.

V.-2.2. Rentgenostrukturní analýza

Struktura krystalů byla měřena při teplotě 150 K na čtyřkruhovém difraktometru NONIUS KAPPA CCD se zářením Mo- $K\alpha$. Zpracování bylo provedeno v programu Supergui¹¹⁵ a vypřesňování struktury v programu SHELXL 97.¹¹⁶ Experimentální data jsou pro stanovené krystalové struktury uvedena v *Tabulce 5*.

Tabulka 5. Experimentální data pro RTG difrakční analýzu studovaných sloučenin

	DOTP ^{OEt} ·H ₂ O	Li[Gd(DOTP ^{OEt})]· 0.5aceton·8H ₂ O	Li[Gd(DOTP ^H)]·6H ₂ O
vzorec	C ₂₀ H ₅₀ N ₄ O ₁₃ P ₄	C _{21.5} H ₅₅ GdLiN ₄ O _{20.5} P ₄	C ₁₂ H ₄₁ GdLiN ₄ O ₁₄ P ₄
<i>M</i>	678.52	993.83	753.56
barva krystalu	bílá	bílá	bílá
krystalová soustava	čtverečná	čtverečná	jednoklonná
prostorová grupa	<i>Pca</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>C</i> 2/ <i>c</i>
<i>a</i> / Å	19.4095(2)	14.2862(1)	17.5713(3)
<i>b</i> / Å	13.4920(2)	24.263(1)	6.93360(10)
<i>c</i> / Å	24.5857(3)	25.054(1)	22.3551(4)
β / °	90	90	101.1767(10)
<i>U</i> / Å ³	6438.33(14)	8684.25(12)	2671.92(8)
<i>Z</i>	8	8	4
<i>D</i> _{calc} / g cm ⁻³	1.400	1.520	1.873
μ / mm ⁻¹	0.298	1.748	2.790
<i>F</i> (000)	2896	4088	1520
rozsah θ / °	1.84–26.01	1.64–27.48	3.24–27.48
rozsah indexů <i>h</i> ; <i>k</i> ; <i>l</i>	–23,23; –16,16; –30,30	–18,18; –31,31; –32,32	–22,22; –8,8; –28,28
celkový počet difrakcí	12202	19855	3055
počet intenzivních difrakcí [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	10094	17493	2965
data; omezení; parametry	12200; 1; 986	19855; 0; 935	3055; 0; 193
goodness-of-fit	1.020	1.057	1.120
<i>R</i> ₁ , <i>R</i> ₂ [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	0.0703; 0.0538	0.0509; 0.0401	0.0252; 0.0241
<i>wR</i> ₁ , <i>wR</i> ₂ [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	0.1502; 0.1370	0.1014; 0.0951	0.0601; 0.0594
maximální shift / e.s.d.	0.001	0.005	0.001
největší diferenční maximum a minimum / e Å ⁻³	0.584, –0.402	1.440; –1.148	1.177, –0.603

V.–2.3. EPR experimenty

Měření EPR spekter bylo provedeno na Univerzitě v Coimbre (Portugalsko) na spektrometru Bruker ESP-300E pracujícím při frekvenci 9.43 GHz (0.34 T, X-band). Studovány byly roztoky o koncentracích 5 mM, pH = 7 a teplotě 298 K, přičemž byla odečítána hodnota pološířek linií, ΔH_{pp} .

V.–2.4. NMR experimenty

Následující NMR experimenty byly provedeny na NMR spektrometru Varian *INOVA* 300 na Technické univerzitě v Delftu. Resonanční frekvence měřených jader byly 300 MHz pro jádro ^1H , 122 MHz pro jádro ^{31}P a 41 MHz pro jádro ^{17}O .

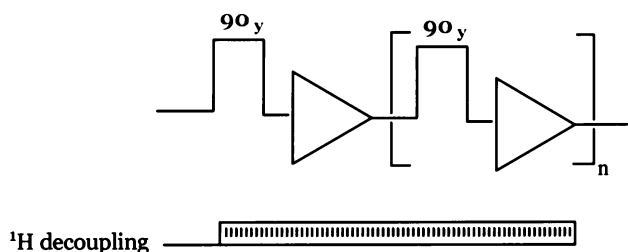
NMRD profily byly měřeny na relaxometru StelarMaster FFC-2000 s proměnným polem $4.7 \cdot 10^{-4}$ –0.35 T, resp. 0.02–15 MHz, a Bruker Minispec 20 a Bruker Minispec mq-60 s konstantním polem 0.47 a 1.41 T, resp. 20 a 60 MHz. Měření závislostí relaxivity na pH potom na přístroji Minispec 20. Tato měření byla provedena na Univerzitě v Monsu.

pH všech měřených roztoků (pokud není uvedeno jinak) bylo před měřením samotným upraveno na hodnotu 6. Teplota při měření byla 25 °C (opět pokud není uvedeno jinak).

Přesná koncentrace všech roztoků (pokud není uvedeno, že ji není třeba měřit) byla stanovena pomocí BMS efektu, jehož princip je popsán v teoretickém úvodu (kapitola II.–2.4.2.2.).

V.–2.4.1. Studium izomerie komplexů v roztocích (^1H a ^{31}P NMR spektroskopie)

Pro tato měření byly použity roztoky, jejichž příprava byla popsána výše. Izomerie komplexů byla zkoumána měřením ^1H a ^{31}P dekaplovaných spekter. Pro obě jádra byla použita základní pulzní sekvence (*Obrázek 21*).



Obrázek 21. Základní NMR pulzní sekvence

Pozn. tzv. fáze pulzu udává směr, odkud je aplikováno radiofrekvenční pole. Vektor makroskopické magnetizace se okolo této osy otáčí. Pulzy se tedy označují 90, nebo 90_x, což znamená sklopení vektoru magnetizace o 90° z osy y (x), viz. též Obrázek 8.

V.-2.4.2. Studium termodynamických vlastností komplexů (Teplotní závislost ³¹P NMR spekter; ³¹P EXSY spektra)

K měření byly použity asi 0.1 M roztoky komplexů v D₂O, jejichž příprava je popsána výše. Měřena byla nejprve klasická fosforová spektra při různé teplotě. Pulzní sekvence byla shodná s tou pro měření klasických ³¹P spekter. Spektra se měřila v teplotním rozmezí 25–85 °C s krokem 10 až 15 °C.

Pro doplnění informací o termodynamickém chování byla změřena i fosforová EXSY spektra. Ta byla v případě komplexu Yb-DOTP^H měřena při různé hodnotě směšovacího času t_m ($t_m = 0, 0.002, 0.02, 0.04, 0.08, 0.15$ s) a v případě komplexů Yb-DOTP^{hm} a Yb-DOTP^{OEt} pouze při jedné hodnotě t_m ($t_m = 0.04$). Přesnou koncentraci není nutné v tomto případě měřit.

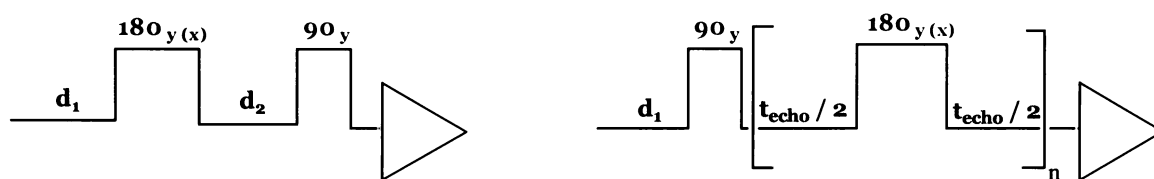
V.-2.4.3. Studium ¹⁷O a ³¹P LIS

Pro tato měření byly použity roztoky, jejichž příprava byla rovněž popsána výše. Koncentrace komplexu v roztoku byla 0.1 M a každý byl obohacen H₂¹⁷O (0.5 %) a *t*-BuOH (0.5 %). Měřena byla spektra jádra ¹⁷O, přičemž byl pro jednotlivé roztoky zapisován chemický posun vody. Pulzní sekvence pro měření je základní, tj. shodná jako u měření ¹H a ³¹P spekter.

V.-2.4.4. Relaxometrické studie komplexů (^1H , ^{17}O a ^{31}P relaxometrie)

Měření závislosti T_1 a T_2 relaxačních časů a ^{17}O posunů Gd^{3+} komplexů na teplotě

K měření byly použity roztoky gadolinitých komplexů ligandů o koncentraci asi 0.1 M s přídavkem H_2^{17}O (0.5 %) a $t\text{-BuOH}$ (0.5 %). Popis použité pulzní sekvence pro měření T_1 (Inversion recovery = návrat po inverzi) a T_2 (CPMG = Carr, Purcell, Meiboom a Gill, mnohonásobné spinové echo s konstantním echočasem a proměnným počtem cyklů n) je uveden na *Obrázku 22*.



Obrázek 22. Schéma pulzní sekvence pro měření T_1 (vlevo) a T_2 (vpravo) relaxačních časů

U měření posunů je sekvence základní a tedy shodná jako například u měření ^1H a ^{31}P spekter nebo LIS a je uvedena výše. Měření všech závislostí se provádělo v teplotním rozsahu 10–85 °C s krokem 5 až 10 °C.

^1H NMRD profily

Pro měření NMRD profilů byly použity gadolinité komplexy ligandů o koncentraci 8 mM. Roztoky byly získány naředěním roztoků pro měření relaxačních časů a posunů.

^{31}P T_1 relaxační časy

Fosforové relaxační časy byly měřeny pro 0.1 M roztoky komplexů neodymitých a thulitých. Jako referentní byl použit vzorek roztoku komplexu yttritého. Pulzní sekvence byla shodná jako u měření ^{17}O T_1 relaxačních časů.

V.-2.5. Vyhodnocení dat

- Vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Microcal TMOrigin[®] 6.0.
- Data získaná ze ¹⁷O teplotních závislostí a ¹H NMRD profilů byla zpracována v programu Micromath Scientist. V soustavě rovnic založených na Bloembergenově–Solomonově–Morganově teorii byly zjišťované parametry programem vypřesňovány podle experimentálních dat metodou nejmenších čtverců. Některé parametry získané nezávisle byly dosazeny jako fixní.
- Zpracování dat získaných z EXSY spekter bylo provedeno v programu Mestrec *EXSY CALC*.¹¹⁷ Rychlosti výměny byly spočteny pro komplex Yb–DOTP^H. Použita byla spektra měřená při směšovacím čase $t_m = 0, 0.02$ a 0.04 s. Získány byly hodnoty rychlostních konstant k_1 a k_{-1} . Podrobnosti o výpočtu lze nalézt v programu samotném.

VI. Výsledky a diskuze

VI.–1. Syntéza ligandů a komplexů

Syntéza ligandů

DOTP^H

Ligand DOTP^H byl připraven dle dříve publikované syntézy,¹⁷ Mannichovou kondenzací paraformaldehydu, kyseliny fosforové a cyklenu. Směs byla zahřívána ve vodě za míchání přes noc při 40 °C. Vyšší teploty či použití azeotropické kyseliny chlorovodíkové jako rozpouštědla vede k vedlejším produktům reakce, jakými jsou například sloučeniny s různým počtem pendantních ramen, kde na atom fosforu je místo vodíku navázána hydroxomethylová skupina. Nadbytečný paraformaldehyd byl odsát na fritě č. 4 a přebytečná kyselina fosforová odstraněna chromatografií na silném katexu. Při chromatografii je dobré jímat frakce menšího objemu, čímž se rychleji docílí oddělení H₃PO₂ od produktu, který vytéká pomaleji. Opakovanou chromatografií lze dosáhnout dočištění frakcí, ve kterých se nalézá ještě jak produkt, tak kyselina fosforová, a zvýšit tak výtěžek reakce. Ten ovšem ani tak většinou nepřesáhne 25 %. Zřejmě z důvodu toho, že vzniká relativně velké procento produktů vedlejších, které se ovšem NMR spektroskopii nepodařilo přesně identifikovat. Po dočištění bylo rozpouštědlo co nejlépe odpařeno na RVO, přičemž byl získán produkt ve formě oleje, který po několika dnech ztuhl na pevnou látku. Krystalizace z vodného roztoku nebyly v našem případě úspěšné.

DOTP^{hm}

Ligand DOTP^{hm} se nám prvně podařilo připravit právě při pokusu o syntézu výše uvedeného ligandu. Tato reakce, tzn. reakce kyseliny fosforové, paraformaldehydu a cyklenu za vyšších teplot (kolem 60 °C) a v azeotropické kyselině chlorovodíkové, však dávala směs mnoha produktů. Lepším způsobem přípravy byla syntéza přímo z čistého ligandu DOTP^H, přebytku paraformaldehydu v prostředí refluxující azeotropické kyseliny chlorovodíkové. Po jednom dni byla reakce zastavena a produkt opět dočištěn na silném katexu. Opět vzniká řada vedlejších produktů, kterých ovšem není ani zdaleka tolik, jako při přímé syntéze z cyklenu. Z čistých frakcí

bylo odpařeno na RVO rozpouštědlo a produkt ve formě hustého oleje byl triturován acetonem. Ligand v podobě hygroskopického prášku byl odsát na fritě a ponechán několik dní v exsikátoru nad P_2O_5 . Poté už se s ním dalo na vzduchu relativně dobře manipulovat. Vialky s produktem je i přes to lepší skladovat zatažené parafilmem.

DOTP^{OEt}

Ligand DOTP^{OEt} byl připraven dvoukrokovou syntézou. Prvním krokem byla jednodenní reakce cyklenu, paraformaldehydu a triethylfosfitu, kdy vznikl produkt ve formě diethylesteru. Nadbytečný paraformaldehyd byl odsát na fritě č. 4 a směs byla dále chromatografována na silném katexu. Směsí voda:ethanol byl eluován vznikající diethylfosfit a směsí amoniaku s lihem pak produkt. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno a produkt rozpuštěn ve vodném roztoku hydroxidu sodného, čímž byla započata selektivní bazická hydrolyza diesteru na monoester. Po dvou dnech míchání a zahřívání na 50 °C bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO a nadbytečné sodné ionty odstraněny na silném katexu. Po odpaření rozpouštědla byl opět získán produkt ve formě hustého oleje, který byl triturován acetonem. Reakce probíhá reprodukovatelně s celkovým výtěžkem kolem 85 %.

Příprava komplexů

Rychlosti komplexace jsou u těchto ligandů relativně vysoké, proto stačí pouze smíchat ekvivalentní množství chloridu lanthanoidu s ligandem, rozpustit směs ve vodě, pH roztoku upravit na hodnotu kolem 7 a po půl hodině je veškerý kov zakomplexován. U roztoků, které se připravovaly ke krystalizaci, se do roztoku nechalo difundovat rozpouštědlo, ve kterém se komplex nerozpouští. Testován byl aceton, tetrahydrofuran a isopropanol. V případě prvně jmenovaného rozpouštědla byly připraveny monokrystaly vhodné kvality pro stanovení krystalové struktury pomocí RTG difrakce.

VI.–2. Metody studia ligandů a jejich komplexů

VI.–2.1. Potenciometrické titrace

Polyazamakrocykly s pendantními rameny vykazují specifické protonizační a komplexační vlastnosti. Protonizační rovnováha dusíkatého cyklu a kyslíkových donorů pendantních ramen pokrývají širokou oblast pH. U těchto sloučenin platí, že nejvíce bazickými jsou 2 dusíkové atomy kruhu. Jedná se o obecný trend, který následují i námi studované ligandy DOTP^H a DOTP^{OEt} (Tabulka 6).

Tabulka 6. Hodnoty protonizačních konstant a konstant stability komplexů $\log\beta_{011}$ (komplex M:L; 1:1) s vybranými ionty. Tučně jsou uvedeny hodnoty pro studované ligandy. Pro srovnání jsou uvedeny i hodnoty publikované pro strukturně podobné ligandy a komplexy (DOTP, DOTP^{Et}, DOTP^{OBu}, DOTA) či ligandy a komplexy stejné, ale měřené dříve (DOTP^H)

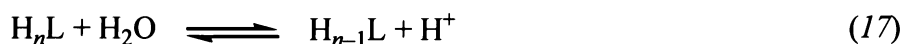
	DOTP^H	DOTP^{OEt}	DOTP (ref. ²³)	DOTP ^H (ref. ¹⁷)	DOTP ^{Et} (ref. ¹¹⁸)*	DOTP ^{OBu} (ref. ²⁶)	DOTA (ref. ¹¹⁹)
	pK_A	pK_A	pK _A	pK _A	pK _A	pK _A	pK _A
H ⁺	10.58 ± 0.02	11.57 ± 0.03	12.6	10.413 [*]	10.94	10.34	11.9
	6.93 ± 0.03	7.94 ± 0.06	9.3	6.83 [*]	8.24	7.72	9.72
	1.90 ± 0.03	1.81 ± 0.08	8.0	1.97 [*]	3.71	2.42	4.6
	logβ₀₁₁	logβ₀₁₁	logβ ₀₁₁	logβ ₀₁₁	logβ ₀₁₁	logβ ₀₁₁	logβ ₀₁₁
Cu ²⁺	–	20.74 ± 0.05	25.4 ^{**}	18.03 [*]	19.57	–	22.3
Cd ²⁺	–	18.22 ± 0.02	22.9 ^{**}	17.34 [*]	16.65	–	21.3
La ³⁺	14.1 ± 0.2	15.5 ± 0.1	27.6	–	–	–	22.9 ¹²⁰
Gd ³⁺	14.0 ± 0.1	14.4 ± 0.2	28.8	–	16.5	12.19	25.0
Y ³⁺	13.7 ± 0.2	13.5 ± 0.1	–	–	–	–	24.6

^{*}Měřeno v 0.1 M KNO₃, ^{**}Měřeno v 1 M KNO₃

Hodnota pK_A je definována následující rovnicí (16),

$$pK_A = -\log K_A \quad (16)$$

kde K_A je rovnovážná konstanta charakterizující rovnováhu uvedenou níže



$$K_A = \frac{[H_{n-1}L][H^+]}{[H_nL]} \quad (18)$$

Rovnovážná celková konstanta stability pro komplex $H_hL_lM_m$, (kde H značí proton, L plně deprotonizovanou formu ligandu a M volný kation, a indexy h , l a m jsou stechiometrické koeficienty) je definována následovně (náboje nejsou pro přehlednost uvedeny) (19)

$$\beta_{hlm} = \frac{[H_hL_lM_m]}{[H]^h[L]^l[M]^m} \quad (19)$$

Definice konstanty popisující protonizaci ligandu je analogická (20)

$$\beta_h = \frac{[H_hL]}{[H]^h[L]} \quad (20)$$

Pro ligandy odvozené od cyklenu obecně platí, že ligandy s fosfinátovými pendantními rameny jsou méně bazické než s acetátovými a ty zase méně než ligandy s fosfonátovými skupinami. To je dobře patrné z *Tabulky 6* při porovnání hodnot protonizačních konstant pro „fosfinát“ DOTP^H, „fosfonát“ DOTP a „acetát“ DOTA.

Bazicita ligandů úzce souvisí s hodnotami konstant stability výsledných komplexů. Obecně platí, že čím je ligand bazičtější, tím je hodnota konstanty stability jeho komplexů s kationty vyšší (viz. *Tabulka 6*). Krom chemické povahy a bazicity koordinujících donorů řídí u těchto ligandů schopnost navázání kovu i velikost makrocyclického kruhu. Jako příklad lze uvést srovnání konstant stability Ca²⁺ a Mg²⁺ iontů s ligandy DOTP a NOTP (*Tabulka 7*).

Tabulka 7. Srovnání konstant stability DOTP a NOTP s ionty Ca^{2+} a Mg^{2+}

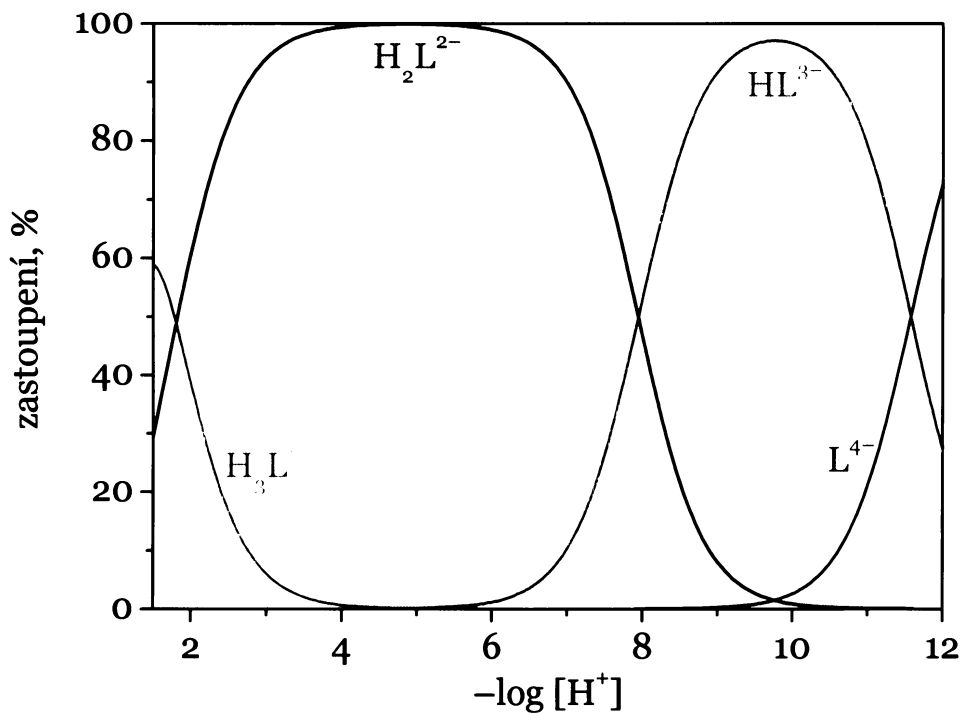
	DOTP ¹²¹	NOTP ¹²¹
	$\log\beta_{011}$	$\log\beta_{011}$
Ca^{2+}	10.3	6.38
Mg^{2+}	7.3	11.01

Z tabulky je patrné, že konstanty stability ligandu DOTP s větším kationtem Ca^{2+} jsou vyšší než v případě analogického komplexu s menším iontem Mg^{2+} . U ligandu s menší klečí, NOTP, je tomu opačně. Konstanty stability nemusí však ovlivňovat jen velikost makrocyclického kruhu, ale i velikost dutiny pro kation kovu tvořené pendantními rameny. Právě tato skutečnost může být jedním z důvodů vyšší nalezené hodnoty konstanty stability komplexu $\text{La-DOTP}^{\text{OEt}}$ oproti komplexu s menším kationtem $\text{Gd-DOTP}^{\text{OEt}}$. U komplexu s ligandem DOTP^{H} je tomu podobně, ale efekt již není tak velký, neboť jeho fosforová pendantní ramena se lépe přizpůsobí velikosti iontu kovu a hodnotu konstanty stability tak ovlivňuje více větší afinita kationtu La^{3+} k dusíkům kruhu. Tato zvýšená afinita je dána měkčím charakterem La^{3+} kationtu oproti tvrdšímu kationtu gadolinitému (podle Pearsonovy teorie měkkých a tvrdých kyselin a bází¹²²). Tato teorie vysvětluje i větší hodnotu konstanty stability komplexů s relativně měkkým dvojmocným iontem Cu^{2+} ve srovnání s trojmocnými Ln^{3+} ionty. U komplexu ligandu DOTA, který má dutinu menší než jeho tetrafosforová analoga, se hodnota konstanty stability zvyšuje s klesajícím iontovým poloměrem lanthanoidu a konstanta stability La-DOTA je tedy nižší, než v případě komplexu s gadolinitým iontem, což je rovněž patrné z *Tabulky 6*.

Dalším obecným trendem, který by měl být v souvislosti s diskutovanými sloučeninami uveden, je snižování konstant stability komplexů s ligandy s monoesterovou fosfonátovou skupinou se vzrůstající délkou esterové alkylové skupiny fosfonátu. To je zřejmě důsledek vzrůstajících prostorových požadavků pendantních ramen. Jako příklad tohoto jevu lze uvést srovnání konstant stability gadolinitých komplexů ligandů DOTP^{OEt} a DOTP^{OBu} (viz. *Tabulka 6*).

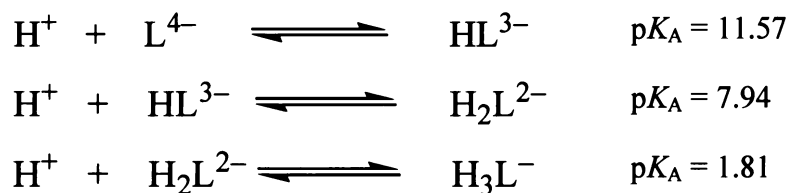
Z *Tabulky 6* je dále patrné, že hodnoty protonizačních konstant získané pro ligand DOTP^{H} jsou v relativně dobré shodě s hodnotami naměřenými dříve na tomtéž ligandu. Ligand DOTP^{hm} titrován zatím nebyl, ale předpokládá se, že bude mít hodnoty pK_A také nízké a konstanty stability s kovy tak budou srovnatelné s oběma studovanými ligandy.

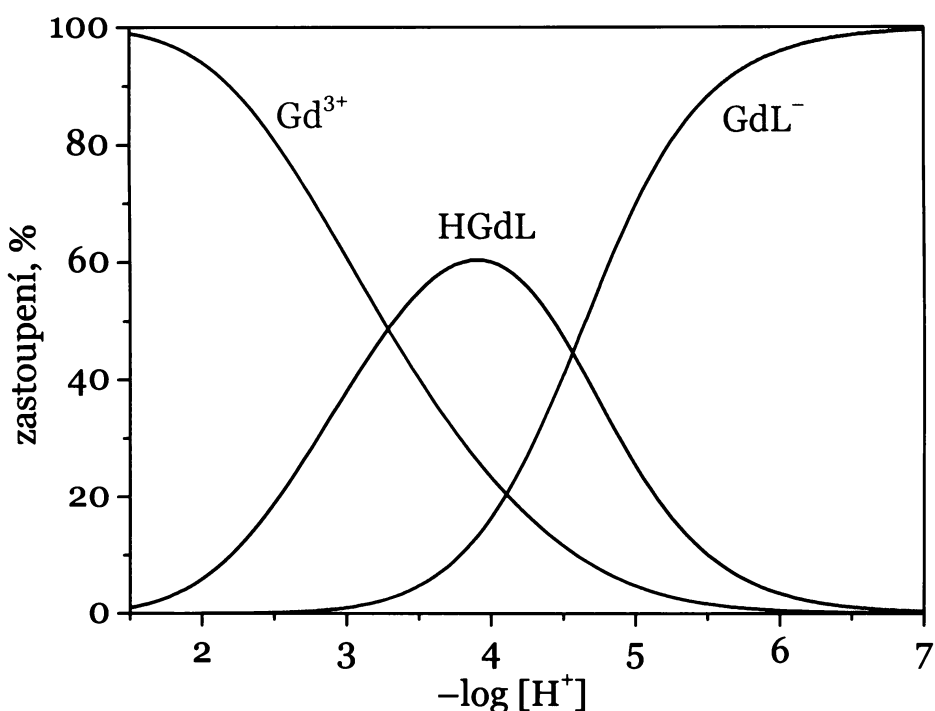
Níže jsou na *Obrázcích 23–25* uvedeny vybrané distribuční diagramy DOTP^{OEt} s H⁺, Gd³⁺ a Cd²⁺.



Obrázek 23. Distribuční diagram ligandu DOTP^{OEt} v závislosti na pH

Na distribučním diagramu volného ligandu můžeme nalézt čtyři formy ligandu, L⁴⁻, HL³⁻, H₂L²⁻ a H₃L⁻. V *Tabulce 6* uvedené protonizační konstanty odpovídají následujícím rovnováhám.

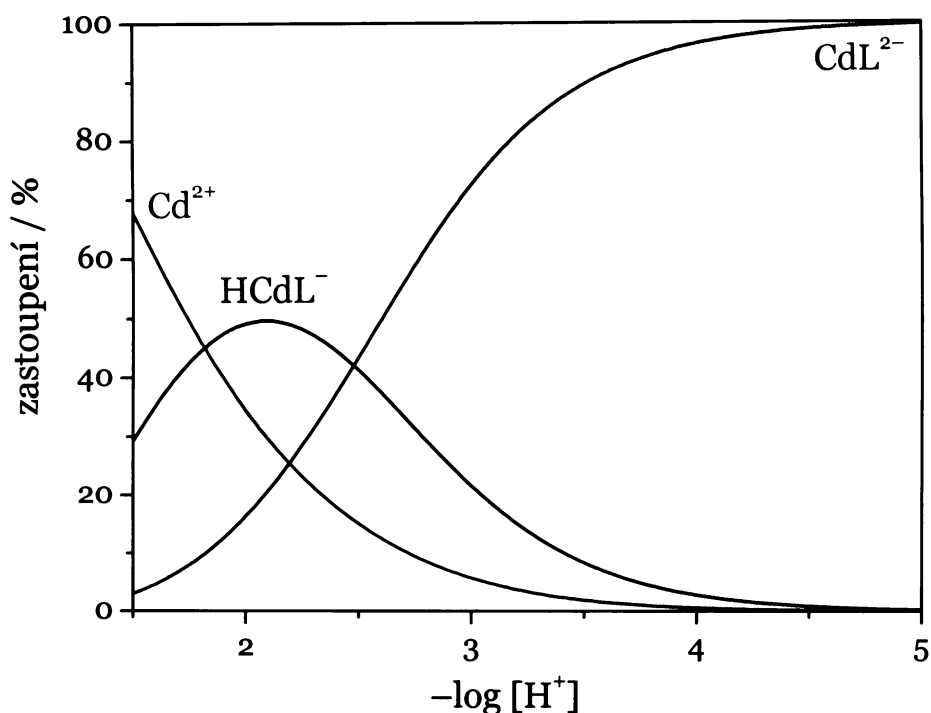




Obrázek 24. Distribuční diagram dle kovu pro systém $\text{H}^+ - \text{DOTP}^{\text{OEt}} - \text{Gd}^{3+}$ v poměru M:L = 1:1

Z distribučního diagramu systému $\text{DOTP}^{\text{OEt}} - \text{Gd}^{3+}$ je zřejmé, že při hodnotě pH kolem 6 je již všechno gadolinium zakomplexováno. Tato informace je důležitá například pro přípravu komplexů s tímto kationtem. Pokud se tedy při přípravě komplexů upraví pH roztoku na hodnotu kolem sedmi a případně se kinetice komplexace pomůže zahřátím budoucího roztoku komplexu, nemělo bychom se již v oblasti tohoto pH v roztoku s volným kovem setkat. Gadolinium by se nemělo uvolňovat ani při mírném snížení pH například na hodnotu 3–4, kdy dekomplexace není z kinetického hlediska příliš pravděpodobná.

Pro ilustraci je zde uveden i distribuční diagram dle kovu pro systém $\text{H}^+ - \text{DOTP}^{\text{OEt}} - \text{Cd}^{2+}$ v poměru M:L 1:1 (Obrázek 25).



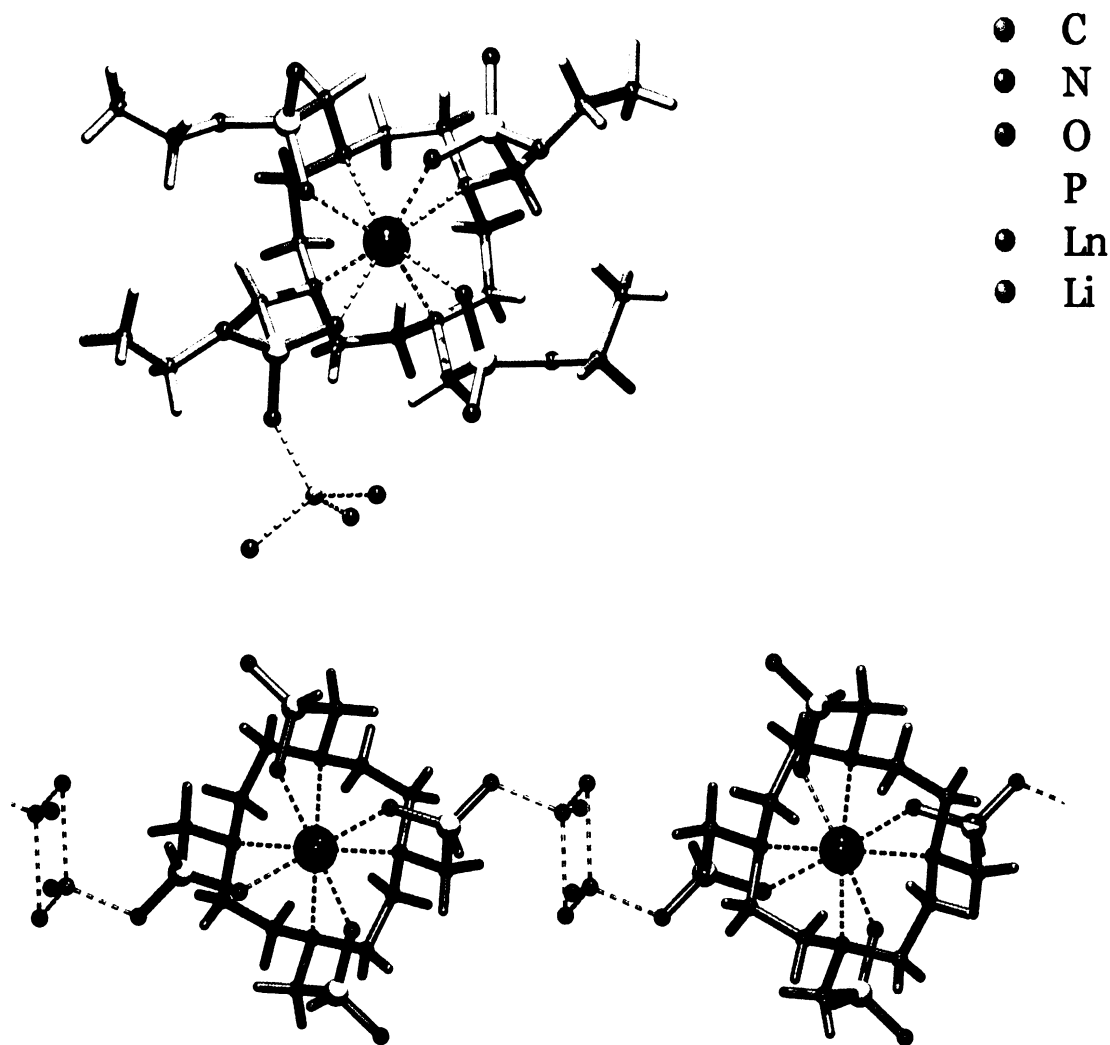
Obrázek 25. Distribuční diagram dle kovu pro systém $\text{H}^+ \text{-DOTP}^{\text{OEt}} \text{-Cd}^{2+}$ v poměru $\text{M:L} = 1:1$

Distribuční diagramy pro ligand a komplexy DOTP^{H} jsou velice podobné těm pro ligand DOTP^{OEt} .

VI.-2.2. Rentgenostrukturní analýza

Absence přímo koordinované molekuly vody v případě komplexů s těžšími Ln^{3+} ionty (již dříve ověřená luminiscenčními studii na europitých komplexech všech ligandů¹²³) byla částečně potvrzena i rentgenovými strukturami gadolinitých komplexů, uvedenými na obrázku níže (Obrázek 26). U obou struktur nacházíme typ struktury TSA, již odpovídá i absolutní konfigurace uvedená v Tabulce 8, která byla u komplexů těchto ligandů předpokládána. Izomerie na atomech fosforu je v případě komplexu $\text{Gd-DOTP}^{\text{OEt}}$ RSRS, stejně jako u dříve studovaných komplexů $\text{Ce-DOTP}^{\text{Ph}}$ a $\text{La-DOTP}^{\text{Ph}}$ (ref.⁴⁰). U komplexu $\text{Gd-DOTP}^{\text{H}}$ se jedná o statistickou směs izomerů. V případě komplexu $\text{Gd-DOTP}^{\text{H}}$ byl ve struktuře nalezen řetězec jednoho typu molekul s dvojitou osou symetrie, které jsou spojeny přes čtyři molekuly vody (u těchto molekul vody

byly nalezeny pouze kyslíkové atomy) a dva lithné ionty. Komplex $\text{Gd-DOTP}^{\text{OEt}}$ se ve struktuře nachází ve formě dvou nezávislých jednotek, jejichž součástí jsou rovněž lithné kationty. V obou případech je to z důvodu úpravy pH roztoku (při komplexaci) hydroxidem lithným.



Obrázek 26. Krystalové struktury komplexů $\text{Gd-DOTP}^{\text{OEt}}$ (nahore) a $\text{Gd-DOTP}^{\text{H}}$ (dole)

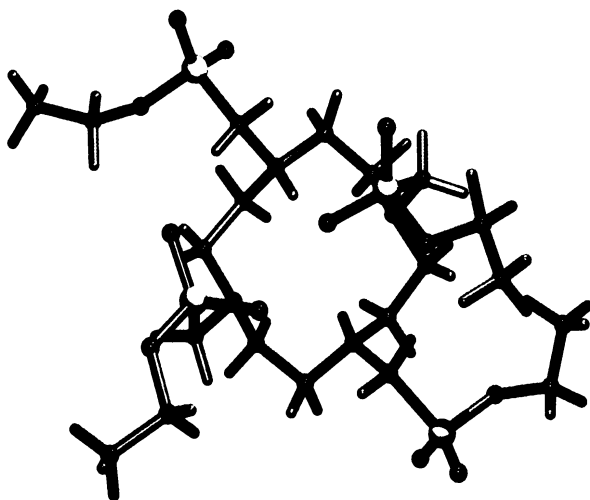
V *Tabulce 8* jsou uvedeny parametry získané při rentgenostrukturní analýze. Absolutní konfigurace komplexů již byla zmiňována a odpovídá ve všech případech izomerům TSA. Uvedené vzdálenosti dusíků od kationtu gadolinia se pohybují v očekávaných mezích. Krom vzdáleností jsou v tabulce uvedeny tzv. „opening angles“, tj. úhly, které svírají dva protilehlé atomy kyslíků s centrálním atomem, a „twist angles“, neboli úhly pootočení dusíkaté roviny oproti kyslíkaté.

Tabulka 8. Parametry získané při rentgenostrukturní analýze

	Li[Gd(DOTP ^{OEt})]·0.5aceton·8H ₂ O		Li[Gd(DOTP ^H)]·6H ₂ O
	molekula 1	molekula 2	
konfigurace	Λλ	Δδ	Δδ
vzdálenosti / Å			
Gd–N1	2.664(5)	2.690(5)	2.636(2)
Gd–N4	2.664(5)	2.674(5)	2.635(2)
Gd–N7	2.658(4)	2.648(5)	2.636(2)
Gd–N10	2.667(5)	2.673(5)	2.635(2)
Gd–O11	2.313(4)	2.322(4)	2.310(2)
Gd–O21	2.332(4)	2.309(4)	2.318(2)
Gd–O31	2.322(4)	2.313(4)	2.310(2)
Gd–O41	2.309(4)	2.310(4)	2.318(2)
QN–QO	2.688	2.701	2.656
Gd–QN	1.639	1.652	1.605
Gd–QO	1.050	1.049	1.050
úhly / °			
open1	124.7(1)	127.3(1)	124.6(1)
open2	127.6(1)	124.9(1)	127.4(1)
twist1	26.7(1)	27.7(1)	29.2(1)
twist2	27.4(1)	26.1(1)	30.5(1)
twist3	27.0(1)	28.2(1)	29.2(1)
twist4	28.6(1)	26.3(1)	30.5(1)
průměrný twist	27.4	27.1	29.9

Krystal komplexu Gd–DOTP^{hm} vhodný k rentgenostrukturní analýze se nám bohužel připravit nepodařilo.

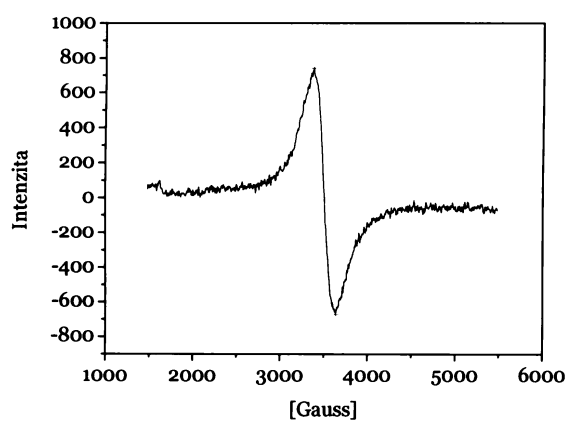
Podařilo se ale naměřit rentgenovou strukturu ligandu DOTP^{OEt}, která je rovněž uvedena na obrázku níže (Obrázek 27).



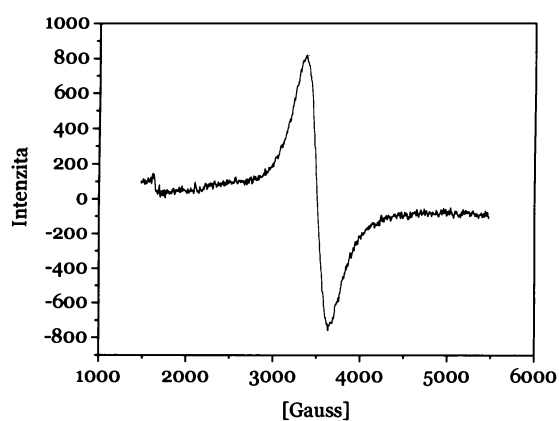
Obrázek 27. Krystalová struktura ligandu DOTP^{OEt}

VI.-2.3. EPR

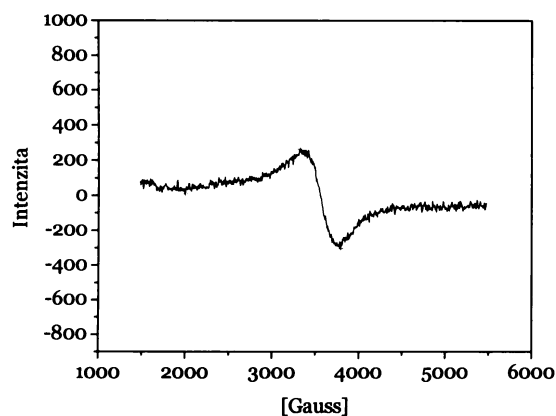
EPR spektroskopii byly zkoumány roztoky komplexů s gadolinitými ionty. Účelem bylo nalézt další parametry pro zpracování relaxometrických dat. Naměřená data byla pak simultánně matematicky zpracována s ^1H NMRD profily (viz níže), se kterými jsou ve velice dobré korelaci. Spektra jsou uvedena na *Obrázku 28*, naměřené pološířky linií v *Tabulce 9*.



a



b



c

Obrázek 28. EPR spektra komplexů

Gd-DOTP^H (*a*),

Gd-DOTP^{hm} (*b*),

Gd-DOTP^{OEt} (*c*)

Tabulka 9. Pološířky linií (ΔH_{pp}) EPR spekter Gd^{3+} komplexů studovaných ligandů (tučně). V tabulce je rovněž uvedeno srovnání s hodnotami pro strukturně podobné komplexy, Gd-DOTP^{OBu}, Gd-DOTP (komplexy bez vody v IS) a Gd-DOTA (komplex s jednou molekulou vody v IS). (X-band, 25 °C, H₂O, pH 7, c = 5 mM)

GdL	ΔH_{pp} /Gauss
Gd-DOTP^H	275 ± 5
Gd-DOTP^{hm}	280 ± 5
Gd-DOTP^{OEt}	425 ± 5
Gd-DOTP ^{OBu}	360 ¹²⁴
Gd-DOTP	531 ¹²⁵
Gd-DOTA	91 ¹²⁵

Pro srovnání jsou v tabulce uvedeny i hodnoty pro strukturně podobné komplexy Gd-DOTP^{OBu}, Gd-DOTP (komplexy bez vody v IS) a Gd-DOTA (komplex s jednou molekulou vody v IS). Pološířky pro Gd-DOTP a Gd-DOTP^{OBu} jsou podobné a všechny pak několikanásobně vyšší než pro komplex Gd-DOTA. Naměřené pološířky linií ΔH_{pp} byly použity pro spočtení transversálních elektronických relaxačních časů. K výpočtu byla použita rovnice (21),¹²⁶

$$T_{2e} = \frac{h}{\pi g_L \beta \Delta H_{pp} \sqrt{3}} \quad (21)$$

kde g_L je Landého faktor.

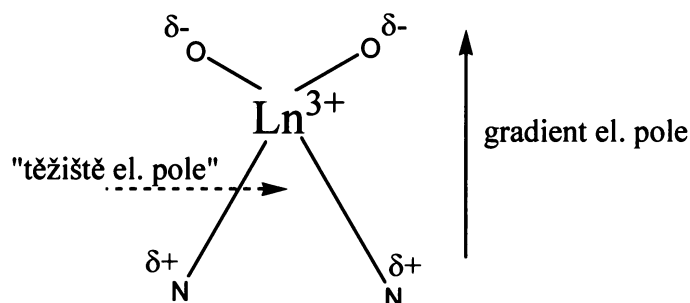
Spočtené hodnoty $T_{2e,calc}$ pro námi studované komplexy jsou ve velice dobré shodě s hodnotami nalezenými při simultánním zpracování ¹H NMRD a EPR dat, $T_{2e,fit}$ (Tabulka 10).

Tabulka 10. Srovnání hodnot elektronických transversálních relaxačních časů $T_{2e,calc}$ a $T_{2e,fit}$ pro komplexy Gd-DOTP^H, Gd-DOTP^{hm} a Gd-DOTP^{OEt}. Pro srovnání jsou uvedeny i hodnoty publikované pro komplexy Gd-DOTP^{OBu}, Gd-DOTP a Gd-DOTA

	$1/T_{2e,calc} (10^9 s^{-1})$	$1/T_{2e,fit} (10^9 s^{-1})$
Gd-DOTP ^H	4.19	4.19
Gd-DOTP ^{hm}	4.27	4.26
Gd-DOTP ^{OEt}	6.40	6.40
Gd-DOTP ^{OBu}	5.49^{124}	5.49^{124}
Gd-DOTP	8.10^{125}	–
Gd-DOTA	1.40^{125}	–

Při srovnání hodnot pro námi studované komplexy (Gd-DOTP^H, Gd-DOTP^{hm}, Gd-DOTP^{OEt}), Gd-DOTP^{OBu} a Gd-DOTP s Gd-DOTA je patrné, že transversální elektronické relaxační rychlosti $1/T_{2e}$ jsou v případě komplexu Gd-DOTA výrazně nižší.

Hodnoty elektronických relaxačních časů jsou zejména závislé na symetrii elektrického pole ligandu okolo centrálního atomu, v našem případě Ln³⁺, a vypovídají nám prakticky o tom, jak dlouho je spin centrálního atomu orientován určitým směrem. Symetrie obou komplexů Ln-DOTA i jeho tetrafosforových analogů, Ln-DOTPR, je vysoká (oba typy komplexů mají C₄ osu symetrie). Důležitou roli ovšem může hrát i poloha Ln³⁺ kationtu v gradientu elektrického pole mezi rovinou dusíků a kyslíků komplexu. Tento gradient je tvořen různými elektronegativitami a potažmo i různými parciálními náboji těchto atomů.



Čím bude Ln³⁺ kation vzdálenější od „těžiště“ tohoto elektrického pole, tím bude symetrie elektrického pole kolem tohoto iontu menší a elektronický relaxační čas kratší. V důsledku toho,

že námi studované komplexy se vyskytují pouze ve formě izomeru TSA, u kterých je centrální ion kovu Ln^{3+} blízko rovině kyslíkové, je nesymetrie pole kolem tohoto lanthanoidu velická a elektronické relaxační časy kratší, než v případě komplexu Gd-DOTA. U fosfonátů je pak gradient elektrického pole vzhledem vyššímu náboji fosfonátové skupiny (2-) ještě větší, což vede k dalšímu zkrácení elektronických relaxačních časů oproti námi studovaným komplexům.

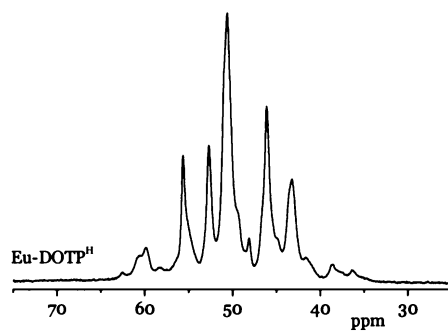
Při designu kontrastních látek zpravidla požadujeme, aby se elektronická relaxace co nejvíce zpomalila a přiblížila se tak rychlosti výměny vody, jejíž hodnotu se také snažíme designem kontrastních látek zvyšovat. Tím se zefektivní přenos magnetické informace od Gd^{3+} komplexu do roztoku. Proto námi pozorované zvýšení rychlosti elektronické relaxace není příliš žádoucí.

VI.–2.4. NMR

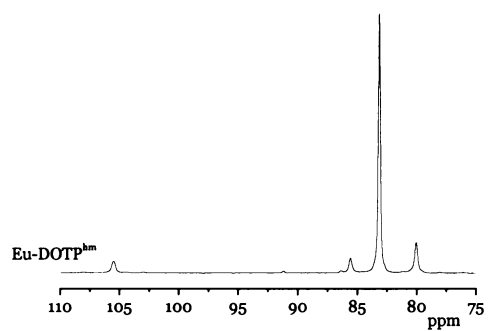
VI.–2.4.1. Studium struktury komplexů v roztocích

(^1H a ^{31}P NMR spektroskopie)

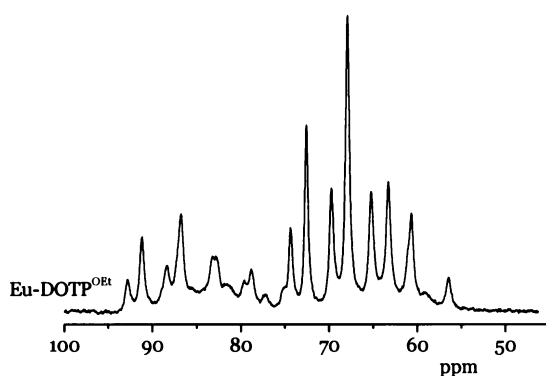
Za účelem získání více informací o struktuře v roztoku byla měřena ^1H a ^{31}P NMR spektra komplexů s vybranými Ln^{3+} ionty. Konkrétně se jednalo o europité, ytterbité a neodymité komplexy studovaných ligandů. Na rozdíl od komplexů DOTA, u kterých většinou nalézáme směs 2 izomerů SA a TSA, vyskytují se tyto sloučeniny pouze ve formě TSA.⁴⁵ Ovšem z důvodu možné *R/S* izomerie na chirálním atomu fosforu se u nich můžeme setkat se směsí až šesti různých diastereoizomerů (*RRRR*, *RRRS*, *RRSS*, *RSRS*, *SSSR* a *SSSS*), což v mnoha případech dává vzniknout velice komplikovaným NMR spektrům, zejména pak vodíkovým. O něco lepší informace lze v tomto případě získat ze spekter fosforových. Pro ukázkou byla vybrána spektra europitých komplexů, která jsou uvedena na *Obrázcích 29–31*.



Obrázek 29. ^{31}P NMR spektrum komplexu $\text{Eu-DOTP}^{\text{H}}$ (300 MHz, $T = 301.25$ K, pH = 6)

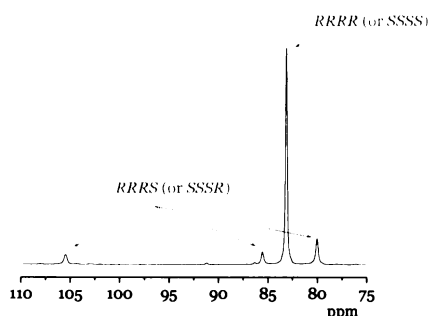


Obrázek 30. ^{31}P NMR spektrum komplexu $\text{Eu-DOTP}^{\text{hm}}$ (300 MHz, $T = 301.25$ K, pH = 6)



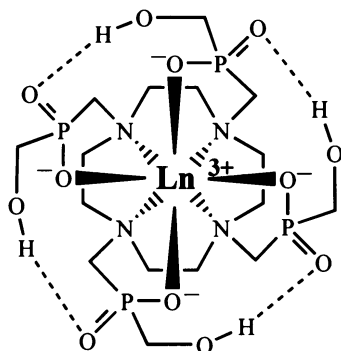
Obrázek 31. ^{31}P NMR spektrum komplexu $\text{Eu-DOTP}^{\text{OEt}}$ (300 MHz, $T = 301.25$ K, pH = 6)

Fosforová NMR spektra komplexů $\text{Eu-DOTP}^{\text{OEt}}$ a $\text{Eu-DOTP}^{\text{H}}$ jsou také dosti komplikovaná a nepodařilo se u nich zatím jednotlivé píky přiřadit daným izomerům. Zřejmě u nich půjde o plný set všech izomerů, podobně jako bylo pozorováno ve ^{31}P NMR spektrech u komplexů $\text{Ln-DOTP}^{\text{Ph}}$ (ref.⁴⁰) a v ^{19}F NMR spektrech komplexů $\text{Ln-DOTP}^{\text{F}}$ (ref.²⁷). Ve spektru komplexu ligandu DOTP^{hm} nalézáme pouze signály od dvou izomerů a to majoritní signál odpovídající plně symetrickému izomeru $RRRR$ (nebo $SSSS$) a 4 minoritní signály v integrálním poměru 1:1:1:1 pro izomer $RRRS$ (či $SSSR$) (Obrázek 32).



Obrázek 32. Přiřazení píků izomerům v ^{31}P NMR spektru komplexu $\text{Eu-DOTP}^{\text{hm}}$ (300 MHz, $T = 301.25$ K, $\text{pH} = 6$)

Všechny komplexy lanthanoidů tohoto ligandu přitom vykazují překvapivě velice podobná spektra (což v případě komplexů dalších dvou ligandů zcela neplatí). Toto pozorování poukazuje na velice silnou preferenci pro jeden typ uspořádání na fosforovém atomu, tj. R nebo S . Důvod není zcela jasný, ale může to mít spojitost s tvorbou vodíkových vazeb mezi hydroxylovou skupinou na jednom fosforovém rameni a kyslíkovým atomem na sousední fosfinátové skupině (Obrázek 33).



Obrázek 33. Znárodnění vodíkových vazeb mezi fosforovými rameny komplexů ligandu DOTP^{hm}

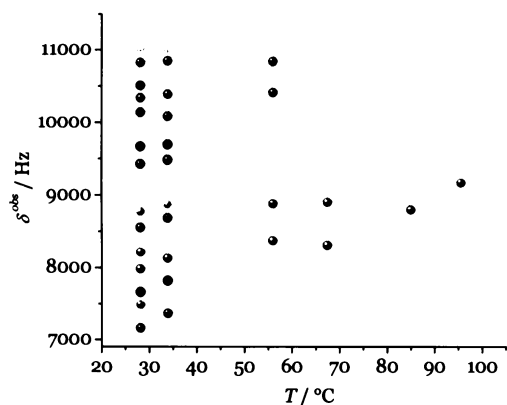
Zkoumána byla rovněž pH závislost ^{31}P NMR spekter u komplexu $\text{Yb-DOTP}^{\text{hm}}$. Důvodem měření bylo dřívější nalezení zvláštní pH závislosti relaxivity u gadolinitého komplexu téhož ligandu (viz níže). Domnívali jsme se, že by změna relaxivity mohla souviset s preferencí pro tvorbu určitých izomerů. V oblasti pH 3–10 jsme ale žádnou změnu v zastoupení izomerů nezaznamenali.

VI.–2.4.2. Studium termodynamiky komplexů

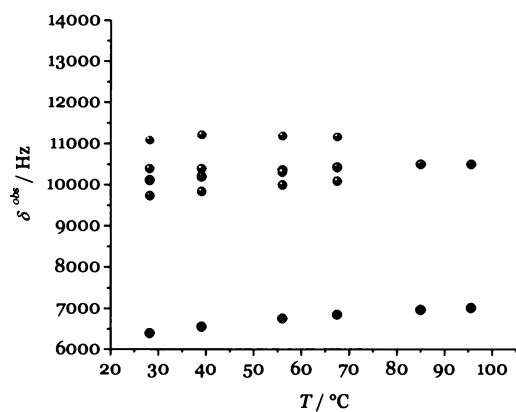
(Teplotní závislost ^{31}P NMR spekter; ^{31}P EXSY spektra)

Za účelem zkoumání termodynamických vlastností komplexů v roztoku byla měřena ^{31}P NMR spektra ytterbitých a europitých komplexů všech tří ligandů při různých teplotách. Zatímco u komplexů $\text{Yb-DOTP}^{\text{H}}$, $\text{Yb-DOTP}^{\text{hm}}$ a $\text{Eu-DOTP}^{\text{hm}}$ nebyla téměř žádná teplotní závislost spekter pozorována, signály ve spektrech komplexů $\text{Yb-DOTP}^{\text{OEt}}$, $\text{Eu-DOTP}^{\text{OEt}}$ a $\text{Eu-DOTP}^{\text{H}}$ při teplotách okolo 95 °C téměř zkoaleskují do jednoho neostrého signálu. (Spektra při vyšších teplotách nemohla být vzhledem k teplotě varu rozpouštědla změřena). Nejvyšší teplotu koalescence vykazují komplexy ligandu DOTP^{hm} , z čehož můžeme usuzovat na nejvyšší energii $\text{R} \leftrightarrow \text{S}$ epimerizace ze studovaných komplexů a tudíž i na nejrigidnější uspořádání pendantních ramen kolem Ln^{3+} iontu. Nejflexibilnějšími se zdají býti komplexy ligandu DOTP^{OEt} . Komplexy ligandu DOTP^{H} jsou v tomto ohledu někde mezi těmito dvěma extrémy. Ytterbitý komplex je ve flexibilitě podobný spíše rigidním komplexům ligandu DOTP^{hm} , kdežto europitý pak komplexům s ligandem DOTP^{OEt} . Tato velká flexibilita zejména u komplexů s DOTP^{OEt} ligandem může být způsobena absencí druhé sféry u jeho komplexů, což bylo indikováno i relaxometrickými studiemi diskutovanými níže.

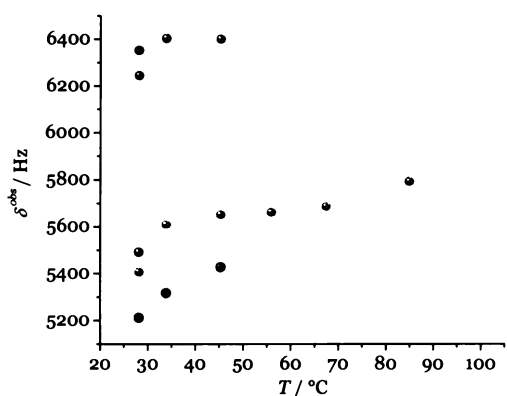
Pro ilustraci jsou zde uvedeny závislosti chemických posunů signálů v ^{31}P spektrech na teplotě pro europité komplexy ligandů (Obrázky 34–36).



Obrázek 34. ^{31}P chemické posuny pík komplexu $\text{Eu-DOTP}^{\text{H}}$ v závislosti na teplotě (pH = 6)



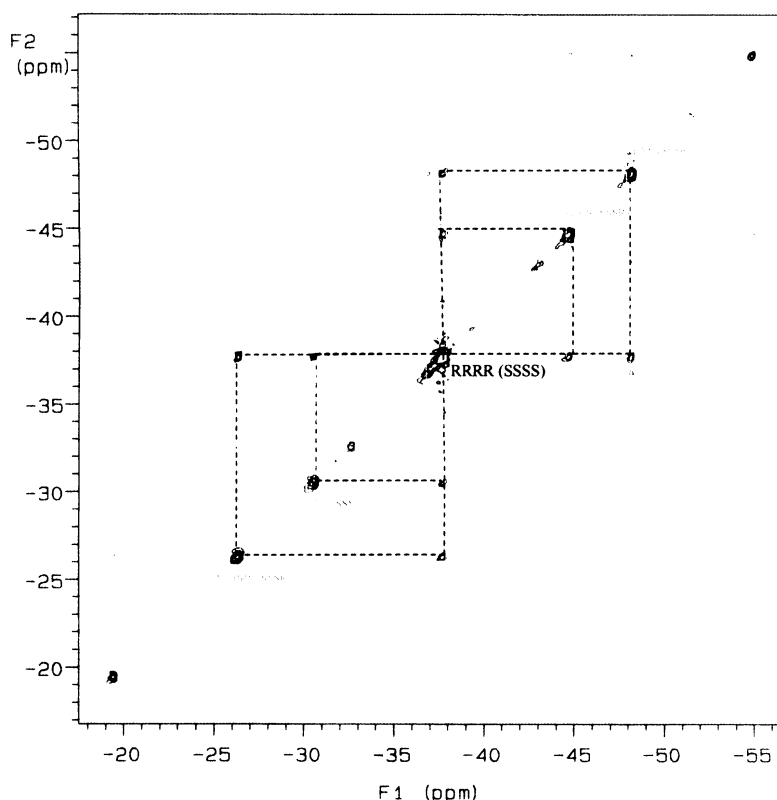
Obrázek 35. ^{31}P chemické posuny pík komplexu $\text{Eu-DOTP}^{\text{hm}}$ v závislosti na teplotě (pH = 6)



Obrázek 36. ^{31}P chemické posuny pík komplexu $\text{Eu-DOTP}^{\text{OEt}}$ v závislosti na teplotě (pH = 6)

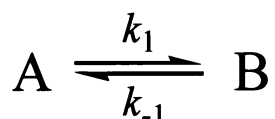
Vzhledem k tomu, že jsou komplexy těchto sloučenin relativně rigidní (jak je vidět z teplotních závislostí ^{31}P NMR spekter), bylo lepší studovat výměnné procesy probíhající mezi jednotlivými formami měřením ^{31}P EXSY spekter, pomocí kterých je právě možné sledovat výměnné procesy relativně pomalé a běžnou NMR spektroskopii neměřitelné.

Jak bylo řečeno v kapitole o izomerii komplexů v roztocích (kapitola III.–1.b.), jsou u komplexů tohoto typu možné tři typy vnitřního pohybu a to překlápění pendantních ramen ($\Lambda \leftrightarrow \Delta$), inverze makrocyclického kruhu ($\lambda \leftrightarrow \delta$)¹²⁷ a změna izomerie na chirálním atomu fosforu ($R \leftrightarrow S$). Tyto pohyby jsou obecně považovány za nezávislé. Každý z prvních dvou jmenovaných zvlášť vede k přeměně jednoho diastereomeru v jiný. Přítomnost pouze jednoho diastereomeru (TSA) u námi studovaných komplexů vyžaduje, aby oba tyto procesy probíhaly buď současně, nebo vůbec. To je první možnost vnitřní přeměny. Druhou možností je změna izomerie na atomu fosforu. Teplotní změny v ^{31}P NMR spektrech naznačily, že k této změně skutečně dochází, ale energie tohoto procesu je relativně vysoká. Tento předpoklad byl definitivně potvrzen právě pomocí ^{31}P EXSY spekter ytterbitých komplexů (Obrázek 37).



Obrázek 37. ^{31}P EXSY spektrum komplexu $\text{Yb-DOTPH}^{\text{H}}$ měřené při směšovací době $t_m = 0.04$ s

Naměřená data z EXSY spekter byla zpracována programem Mestrec *EXSY CALC*.¹¹⁷ Tento program je zamýšlen pro NMR studium molekulárních systémů podléhajících chemické výměně. Dovoluje kvantitativně analyzovat experimentální intenzity NMR píků obdržených z EXSY experimentů ke spočtení rychlosti výměny mezi jednotlivými formami (např. A a B) dané výměnné rovnováhy, jejíž rychlostní konstanty jsou k_1 a k_{-1} (Obrázek 38).



Obrázek 38. Příklad chemické výměnné rovnováhy mezi dvěma formami A a B probíhající rychlostmi danými rychlostními konstantami k_1 a k_{-1}

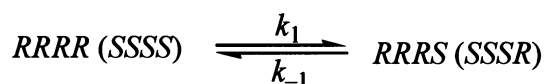
Program umožňuje spočtení rychlostních konstant u systémů s libovolným počtem míst, na kterých k výměnným procesům dochází, s libovolnými longitudinálními relaxačními časy, spiny a populacemi. Výpočty se provádějí v souladu s úplnou relaxační formou analýzy intenzit. Oblast aplikací tohoto přístupu vyžaduje, aby signály různých částic byly v NMR spektru separovány od signálů částic ostatních (pomalá chemická výměna).

Pro spočtení rychlostních konstant program požaduje dodání experimentální amplitudy určitých píků obdržených ze dvou různých EXSY experimentů. Jeden EXSY experiment by měl být měřen při daném směšovací čas (t_m) a druhý při t_m nulovém nebo alespoň blízkým nule, ten je použit jako tzv. referentní experiment. Ve dříve jmenovaném experimentu musí být směšovací čas dostatečně velký, aby výměnný proces proběhl docela. V tomto experimentu intenzity signálů ve výměně, $A(t_m)$, musí být kvantifikovány pro diagonální píky i krosníky. Ve druhém referentním experimentu by pak neměly být pozorovány žádné krosníky způsobené magnetizační výměnou a měly by být naměřeny pouze amplitudy $A(0)$ diagonálních píků, kterých se výměna týká. Je důležité poznamenat, že oba experimenty musí být provedeny za stejných podmínek (teplota, počet přechodů a podobně).

EXSY spektra byla v našem případě měřena pro ytterbité komplexy všech tří ligandů. Pouze ale v případě komplexu Yb-DOTP^H bylo měření prováděno při různých směšovacích časech a mohl tak být pro výpočet rychlostních konstant výměny mezi dvěma hlavními izomery použit tento program. K výpočtu byla použita spektra měřená při směšovacím čase 0.02 a 0.04 s.

Jako referenční vzorek bylo použito spektrum měřené při $t_m = 0$. Krospíky v 2D EXSY spektrech byly pozorovány právě mezi píky odpovídajícími izomerům, mezi kterými dochází k dynamické chemické výměně (*Obrázek 37*).

Z jejich intenzit potom mohly být dle výše uvedeného postupu spočteny rychlostní konstanty přeměny izomerů



u komplexu Yb-DOTP^H. Jejich hodnoty jsou uvedeny v *Tabulce 11*.

Tabulka 11. Rychlosti výměny u Yb-DOTP^H (pH = 6, T = 301.25 K)

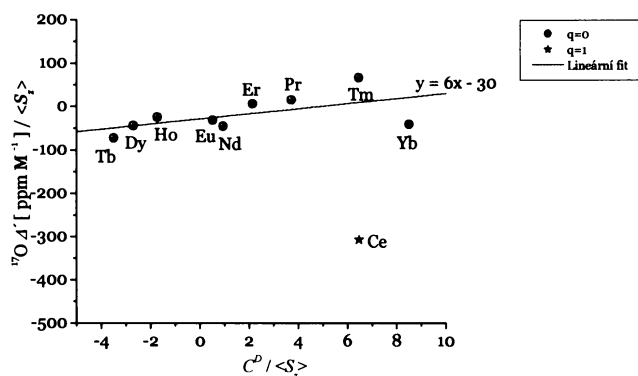
k_1 / s^{-1}	k_{-1} / s^{-1}
2.4 ± 0.5	0.5 ± 0.2

VI.–2.4.3. Studium ¹⁷O a ³¹P LIS

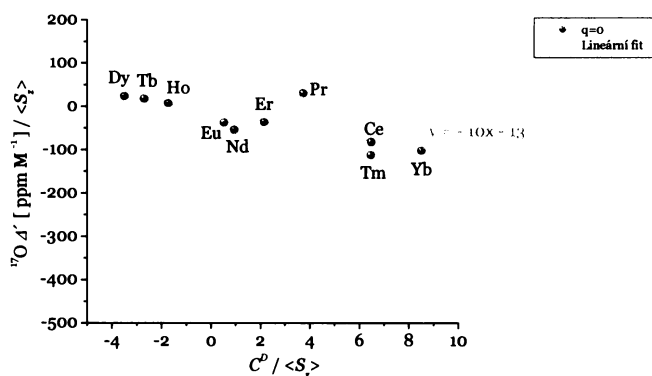
Krom jiných metod, může být pro studium struktury komplexů v roztoku, co se hydratace týče, využito měření lanthanoidy indukovaných posunů (LIS = Lanthanide Induced Shifts).

Protože všechny studované komplexy zahrnují ve struktuře i atom fosforu, mohly být kromě rutinních ¹⁷O měřeny i ³¹P LIS.

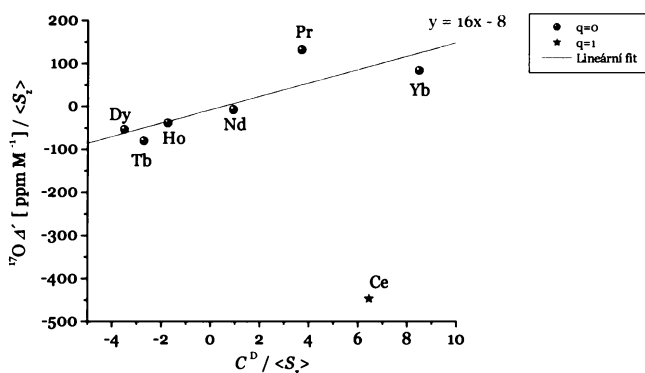
Jako referenční vzorek byl ve všech případech použit odpovídající komplex s diamagnetickým Y³⁺ či La³⁺. Výnos do grafu byl proveden v první řadě dle rovnice (5), odpovídající pseudokontaktnímu (dipolárnímu; přes prostor) příspěvku k posunu, neboť právě ten má větší smysl u studovaných komplexů bez přímo koordinované molekuly vody. Odpovídající grafy jsou uvedeny na *Obrázcích 39–41*. Výnosy jsou sestaveny po extrapolaci Ln:H₂O 1:1.



Obrázek 39. Pseudokontaktní příspěvek k ^{17}O LIS Ln-DOTP^H (pH = 6, $T = 301.25$ K)

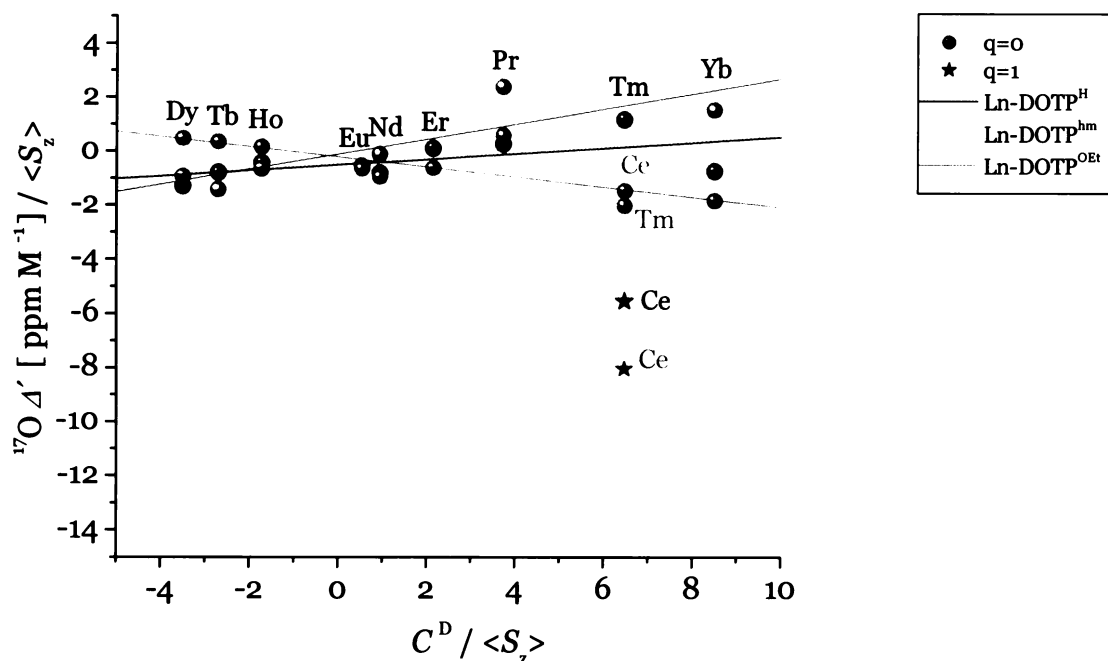


Obrázek 40. Pseudokontaktní příspěvek k ^{17}O LIS Ln-DOTP^{hm} (pH = 6, $T = 301.25$ K)



Obrázek 41. Pseudokontaktní příspěvek k ^{17}O LIS Ln-DOTP^{OEt} (pH = 6, $T = 301.25$ K)

Na následujícím *Obrázku 42* je pak uvedeno srovnání ^{17}O LIS pro všechny studované komplexy, ze kterého lze leccos vyčíst.



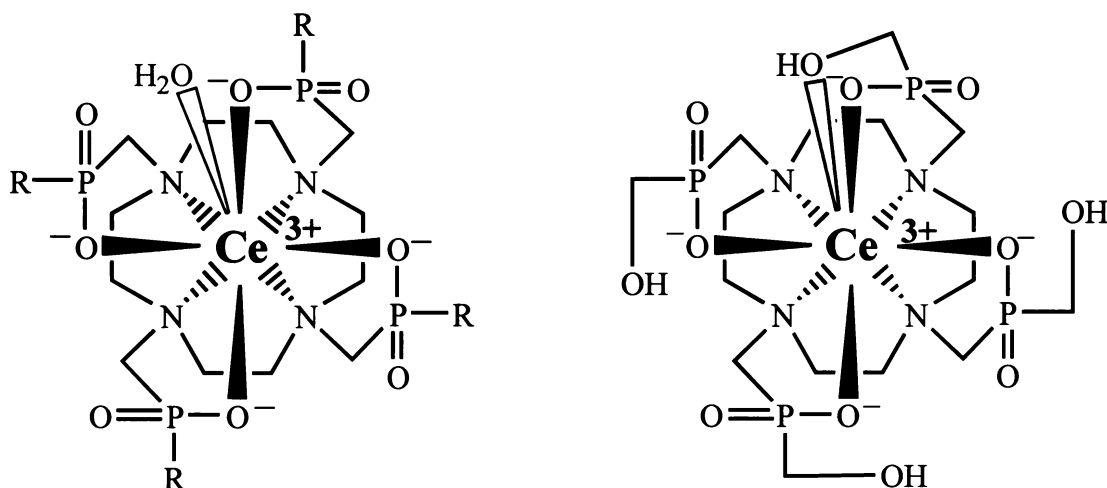
Obrázek 42. Srovnání ^{17}O LIS pro Ln^{3+} komplexy všech studovaných ligandů

Za situace, kdy by série Ln^{3+} komplexů pro daný ligand byla izostrukturní, by byly závislosti vynesené dle rovnice (5), tedy závislost $\Delta' / \langle S_z \rangle$ na $C^D / \langle S_z \rangle$, lineární. V případě těchto sloučenin s velmi objemnými fosforovými pendantními rameny by se mělo jednat o komplexy bez molekuly vody přímo koordinované, v případě komplexů s největšími lanthanoidy se pak může jednat o komplexy s jednou přímo koordinovanou molekulou vody.

To dle grafu přibližně odpovídá. V případě všech komplexů se jedná zřejmě o sloučeniny bez vody ve vnitřní hydratační sféře, až na komplexy DOTP^H a DOTP^{OEt} s největším kationtem Ce^{3+} , u kterých má tedy zřejmě ještě jedna molekula vody dostatek prostoru k přímé koordinaci k tomuto kationtu. Podobně tomu zřejmě je i v případě komplexů La-DOTP^{Ph} a Ce-DOTP^{Ph}, u kterých byla rovněž nalezena molekula vody v první koordinační sféře.⁴⁰

U komplexu Ce-DOTP^{hm} se však molekula vody ve vnitřní sféře dle výnosu nevyskytuje (bod pro komplex s Ce^{3+} leží v přímce s ostatními bezvodými komplexy a je tedy s nimi izostrukturní

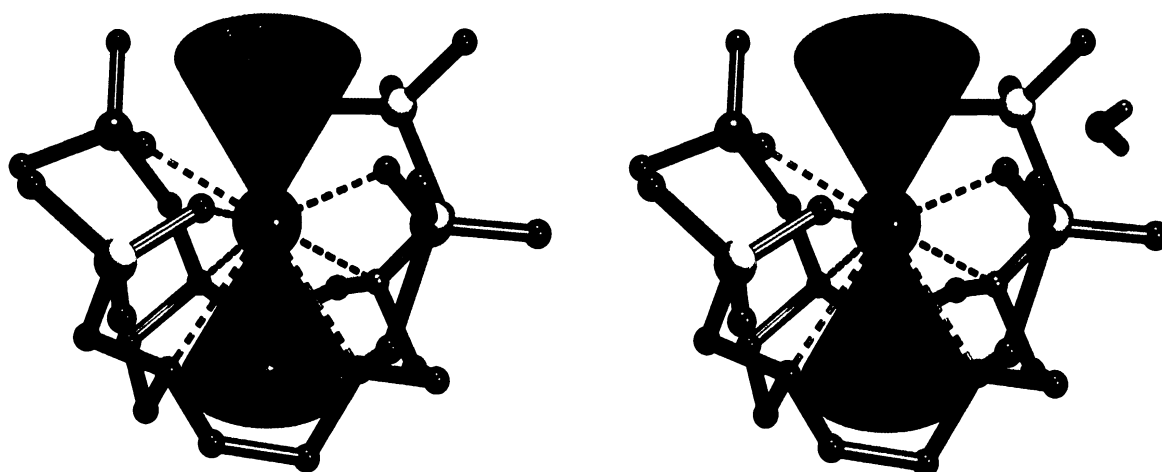
a tedy také bezvodý). To může být způsobeno tím, že se místo molekuly vody koordinuje ke kationtu jedna hydroxomethylová skupina pendantního ramene ligandu (Obrázek 43).



Obrázek 43. Znárodnění možných struktur ceritých komplexů ligandů. Ln-DOTP^H a Ln-DOTP^{OEt}, s jednou koordinovanou molekulou vody k ceritému iontu, vlevo; Ln-DOTP^{hm}, s jedním koordinovaným pendantním ramenem, vpravo

Druhou možností však může být i to, že pendantní ramena ligandu DOTP^{hm} v komplexech směřují směrem nahoru a stericky znemožní koordinaci molekuly vody.

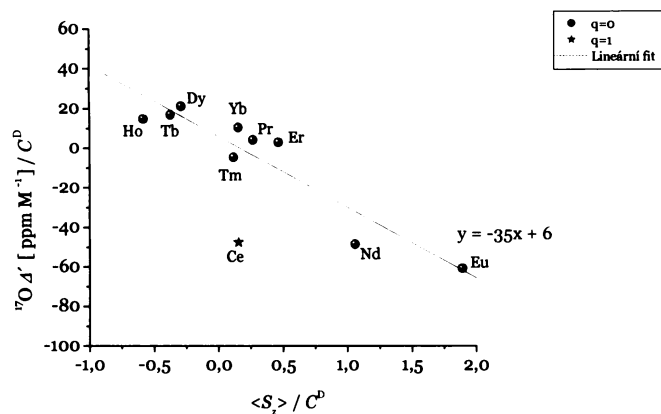
Co je dále nápadné je negativní znaménko směrnice přímky u grafu odpovídající Ln-DOTP^{hm}. To může být způsobeno jinou orientací hydratační sféry ve srovnání s Ln³⁺ komplexy ostatních dvou ligandů. Všechny tři ligandy jsou totiž symetrické a magnetická osa jejich Ln³⁺ iontů tak může procházet pseudo-C₄ osou symetrie komplexu. Znaménko ¹⁷O chemického posunu indukovaného Ln³⁺ iontem přitom závisí na prostorových souřadnicích molekuly vody vzhledem k tzv. McConnelovu kuželu (vymezenému tímto Ln³⁺ iontem), u kterého je magnetická osa komplexu rotační osou tohoto kužele (Obrázek 44).



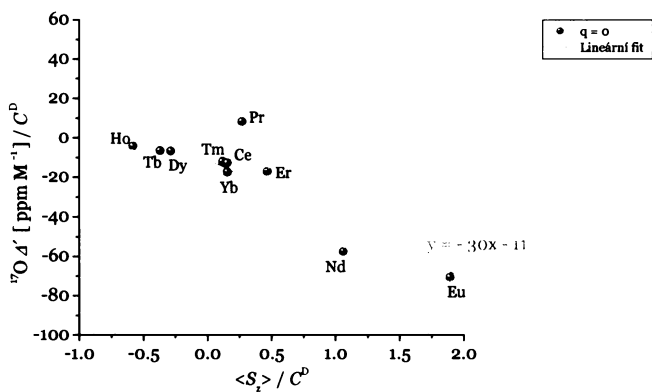
Obrázek 44. Znárodnění dvou možností přístupu molekuly vody vzhledem k McConnelovu kuželu vymezenému Ln^{3+} iontem. Přibližují-li se molekuly vody spíše prostorem vymezeným tímto kuželem, je znaménko LIS kladné, v opačném případě je znaménko LIS záporné. Velikost vrcholového úhlu kuželu je 54.7°

Prochází-li totiž molekula vody pláštěm tohoto kužele (z vnějšku dovnitř či naopak), mění se znaménko jejího chemického posunu. V případě komplexů ligandu DOTP^{hm} se tedy zdá, že molekula vody přistupuje ke komplexu z prostoru mimo McConnelův kužel. Tím se zřejmě liší od komplexů ostatních dvou ligandů, kde molekuly vody přistupují ke komplexu právě oblastí McConnelova kužele. Může se tedy zdát pravděpodobné, v případě komplexů $\text{Ln-DOTP}^{\text{hm}}$ je jeho odlišné chování v tomto směru spojeno se zamezením přístupu molekuly vody McConnelovým kuželem buď orientací pendantních ramen směrem nahoru, či přímo koordinací jednoho ramene k Ln^{3+} kationtu.

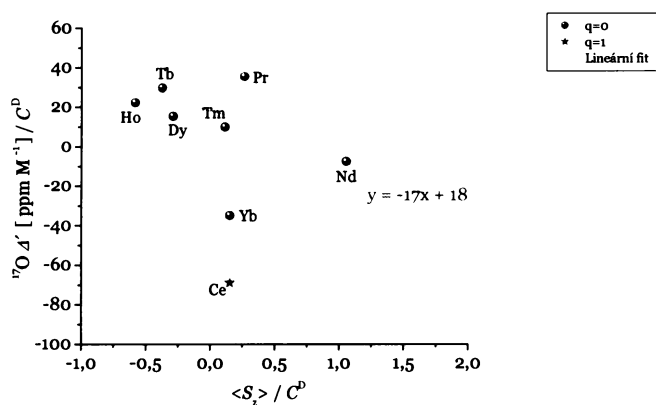
Pro úplnost byly vyneseny i ^{17}O LIS odpovídající kontaktnímu příspěvku k posuvu (Obrázky 45–47), tj. výnos dle rovnice (6). Výnosy jsou sestaveny po extrapolaci $\text{Ln}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1.



Obrázek 45. Kontaktní příspěvek ^{17}O LIS Ln-DOTPH^H (pH = 6, $T = 301.25$ K)



Obrázek 46. Kontaktní příspěvek ^{17}O LIS Ln-DOTPH^{hm} (pH = 6, $T = 301.25$ K)

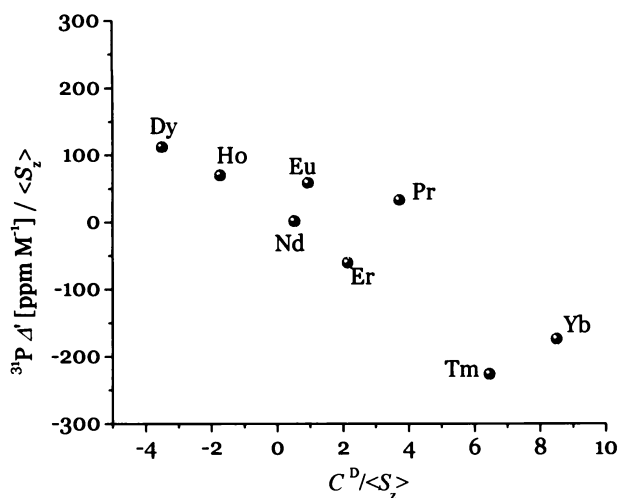


Obrázek 47. Kontaktní příspěvek ^{17}O LIS Ln-DOTP^{OEt} (pH = 6, $T = 301.25$ K)

Kontaktní příspěvek by měl být z důvodu absence vody v první koordinační nulový. Oproti očekávání jsou ale kontaktní příspěvky k LIS rovny nule nejsou a ve všech případech je můžeme hůře či lépe proložit přímkou, jejíž směrnice téměř třetinová až poloviční ve srovnání s komplexy s přímo koordinovanou molekulou vody. Směrnice těchto přímk je ve všech případech záporná, což je v případě tohoto výnosu zcela dle očekávání. Body odpovídající komplexům Ce-DOTP^H a Ce-DOTP^{OEt} (zřejmě komplexy s jednou molekulou vody ve vnitřní koordinační sféře) opět neleží v přímce, což je v souladu s výnosem pro pseudokontaktní příspěvek k ¹⁷O LIS.

Hodnoty směrnic pro „pseudokontaktní“ i „kontaktní výnos“ pro komplexy Ln-DOTP byly také pro kontrolu zjišťovány a jsou velice blízké těm, nalezeným pro námi studované komplexy. Znaménko směrnice pro „pseudokontaktní výnos“ je přitom kladné, tj. stejně jako v případě komplexů Ln-DOTP^H a Ln-DOTP^{OEt}. U komplexů s jednou molekulou v první koordinační sféře se hodnota směrnice pro přímkou odpovídající kontaktnímu posunu vyskytuje ve velice úzkém rozmezí a pohybuje se kolem hodnoty -70 ± 11 .⁸ Kontaktní příspěvek k posunu tvoří přes 85 % posunu celkového a směrnice přímkou pro pseudokontaktní příspěvek je tak znatelně nižší. Nepohybuje se však v tak úzké oblasti, jak je tomu v případě příspěvku kontaktního.

Zkoumány byly rovněž ³¹P lanthanoidy indukované posuny pro všechny ligandy. Zpracovány mohly být ovšem jen ³¹P LIS pro komplexy ligandu DOTP^{hm} a to vzhledem k tomu, že pouze u těchto komplexů se nám podařilo přiřadit píky ve spektru jednotlivým izomerům a mohli jsme tak sledovat ³¹P LIS pro daný určitý izomer. V našem případě to byl plně symetrický izomer *RRRR* (nebo *SSSS*). Závislost pseudokontaktního příspěvku k ³¹P LIS na $C^D/\langle S_z \rangle$ je uvedena na obrázku níže (*Obrázek 48*). Výnos je opět v souladu s výše uvedenými, tzn., že všechny komplexy Ln-DOTP^{hm} jsou izostrukturální.



Obrázek 48. Pseudoskaltovní přispěvek k ${}^{31}\text{P}$ LIS Ln–DOTP^{hm} pro izomer RRRR/SSSS (pH = 6, $T = 301.25$ K)

VI.–2.4.4. Relaxometrické studie

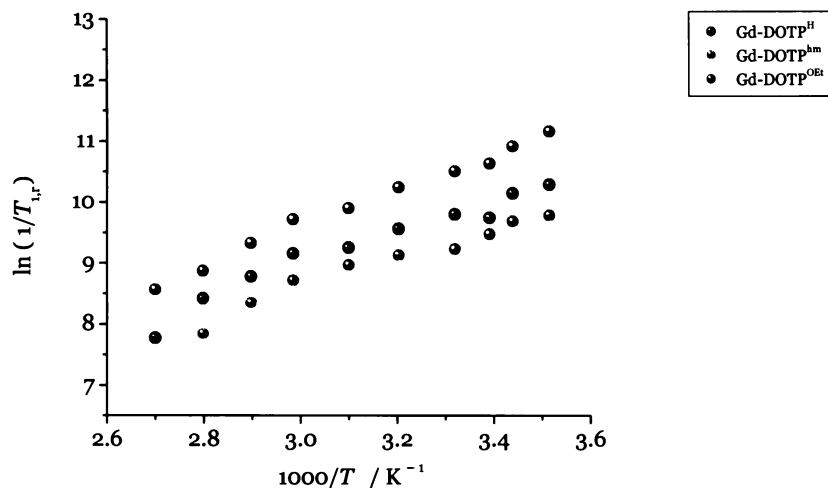
${}^1\text{H}$ a ${}^{17}\text{O}$ relaxometrie

Strukturně podobné gadolinité komplexy (například Gd–DOTA) se používají jako kontrastní látky pro MRI. Optimalizace účinnosti zavedených kontrastních látek je důležitou otázkou posledních několika let. Jednou z kritických vlastností potenciální kontrastní látky je efektivita přenosu magnetické informace od Gd^{3+} iontu vázaného v komplexu do okolního roztoku. Bylo dokázáno, že přítomnost přímo koordinované molekuly vody není nezbytná v případě, když je u studovaných komplexů dostatečně vyvinutá druhá a vnější koordinační sféra. Proto je možné studovat vliv struktury na relaxivitu i u těchto gadolinitých komplexů bez vody ve vnitřní koordinační sféře.

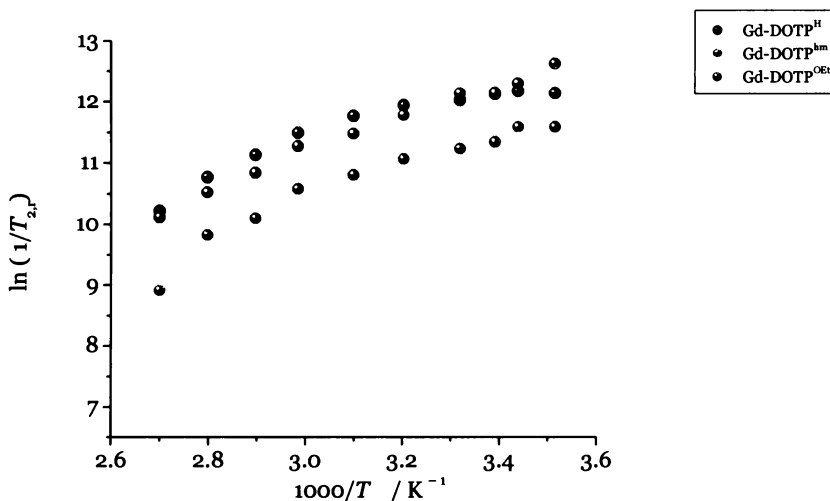
Z tohoto důvodu bylo i na studovaných komplexech Gd–DOTP^H, Gd–DOTP^{hm}, Gd–DOTP^{OEt} provedeno naměření kompletního setu ${}^{17}\text{O}$ NMR dat v závislosti na teplotě (T_1 a T_2 relaxační časy a ${}^{17}\text{O}$ angulární frekvence ω), a také ${}^1\text{H}$ NMRD profilů při teplotách 5, 25 a 37 °C.

Jako referentní vzorek byla měřena voda i odpovídající Y^{3+} komplex. Závislosti redukovaných ${}^{17}\text{O}$ $1/T_{1,r}$, $1/T_{2,r}$ relaxačních rychlostí a ${}^{17}\text{O}$ redukovaných angulárních frekvencí ω_r na teplotě jsou uvedeny na obrázcích níže (Obrázky 49–51). Faktor P_m , nezbytný pro redukci T_1 a T_2

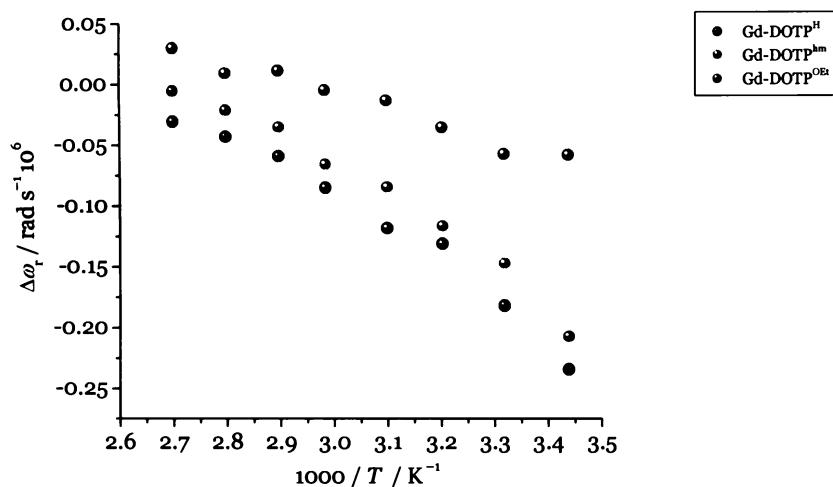
relaxačních časů, byl spočten z extrapolací poměru Ln:H₂O 1:1. Zde vynesené experimentální body byly získány po odečtení vody jako reference.



Obrázek 49. Závislost redukovaných ¹⁷O 1/T₁ relaxačních rychlostí na teplotě pro komplexy Gd-DOTP^H, Gd-DOTP^{hm} a Gd-DOTP^{OEt} (300 MHz, pH = 6)

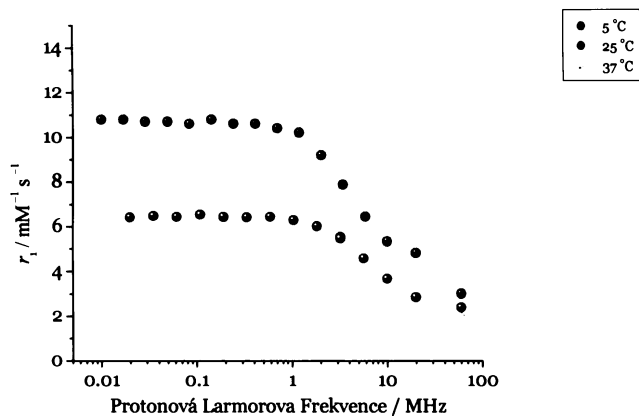


Obrázek 50. Závislost redukovaných ¹⁷O 1/T₂ relaxačních rychlostí na teplotě pro komplexy Gd-DOTP^H, Gd-DOTP^{hm} a Gd-DOTP^{OEt} (300 MHz, pH = 6)

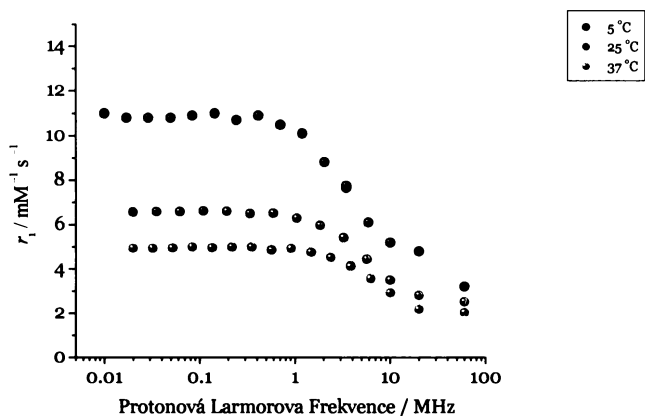


Obrázek 51. Závislost ^{17}O redukované angulární frekvence ω_r na teplotě pro komplexy $\text{Gd-DOTP}^{\text{H}}$, $\text{Gd-DOTP}^{\text{hm}}$ a $\text{Gd-DOTP}^{\text{OEt}}$ (300 MHz, pH = 6)

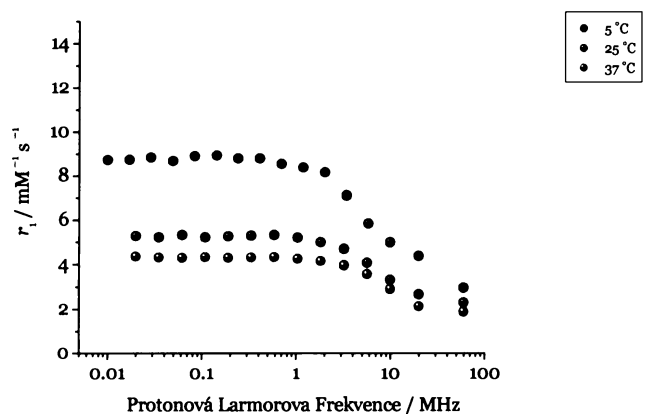
Na první pohled je ze závislostí T_1 a T_2 zřejmé, že komplexy skutečně nemají přímo koordinovanou molekulu vody. Hodnoty jsou totiž asi dvakrát menší, než u komplexu Gd-DOTA^{128} s jednou molekulou vody ve vnitřní koordinační sféře. Také ^1H NMRD profily, uvedené na obrázku níže pro všechny Gd^{3+} komplexy a tři různé teploty, jsou poloviční ve srovnání s profily komplexu Gd-DOTA (Obrázky 52–54).



Obrázek 52. ^1H NMRD profily komplexu $\text{Gd-DOTP}^{\text{H}}$ při 5, 25 a 37°C ($\text{pH} = 6$)

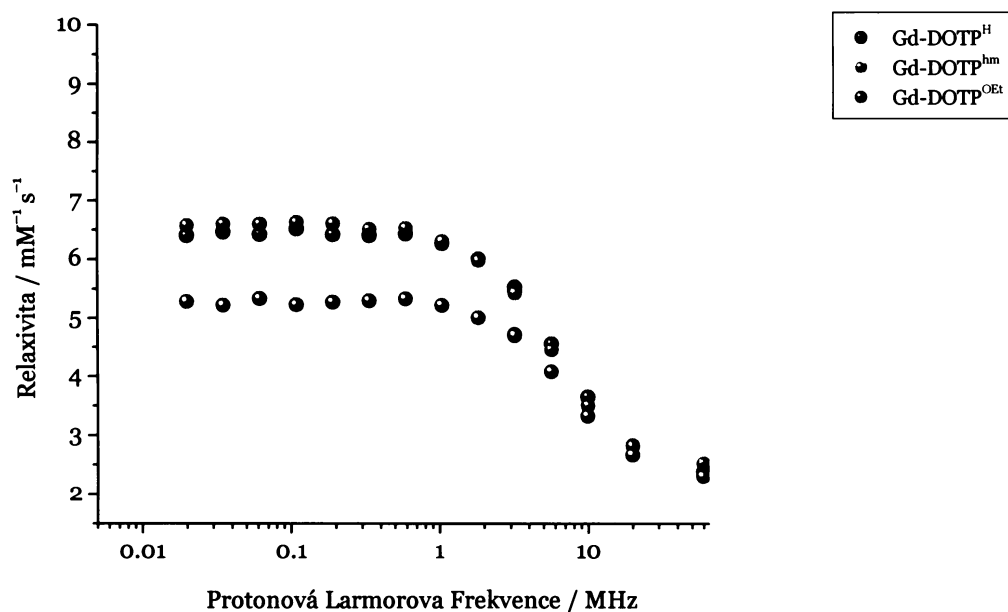


Obrázek 53. ^1H NMRD profily komplexu $\text{Gd-DOTP}^{\text{hm}}$ při 5, 25 a 37°C ($\text{pH} = 6$)



Obrázek 54. ^1H NMRD profily komplexu $\text{Gd-DOTP}^{\text{OEt}}$ při 5, 25 a 37°C ($\text{pH} = 6$)

Ze srovnání na *Obrázku 55* je vidět, že profily komplexů Gd-DOTP^H a Gd-DOTP^{hm} jsou si velice podobné a liší se zejména v oblasti nízkých polí od profilu komplexu třetího, Gd-DOTP^{OEt}.



Obrázek 55. Srovnání ¹H NMRD profilů pro Gd³⁺ komplexy studovaných ligandů (T = 298 K, pH = 6)

Vzhledem k tomu, že molekulární velikosti komplexů ligandů jsou podobné, může být tento fakt připisován poněkud vyšší polaritě obou fosfinátů, která může způsobovat větší hydrataci komplexů. (Ta samá podobnost byla pozorována pro výnosy ¹⁷O angulárních frekvencí jako funkcí teploty.) Relaxivita při 20 MHz se pohybuje kolem 2.1 s⁻¹ mM⁻¹, což je asi 50 % hodnoty publikované pro komplex Gd-DOTA.

Dále jsme se pokusili o matematické zpracování těchto dat, a to dvojitým způsobem. Prvním byl pokus o simultánní zpracování ¹⁷O a ¹H NMRD dat dle klasického BSM modelu. Bohužel ale při tomto přístupu nebylo možné kompletně „vypnout“ příspěvek vnitřní sféry. Nicméně, bylo nakonec možné získat jakýsi kvantitativní odhad parametrů, ale musela být v tomto modelu uvažována frakce molekul vody v první koordinační sféře, která simulovala příspěvek molekul ve vnější a druhé sféře.

Výsledky jsou shrnuty v následující *Tabulce 12*, kde jsou pro srovnání uvedeny i hodnoty zpracované dle podobného modelu pro komplex Gd–DOTA s jednou molekulou vody ve vnitřní koordinační sféře.

Tabulka 12. Výsledky simultánního matematického zpracování ^1H a ^{17}O NMR dat (pH = 6)

	Gd–DOTP ^H	Gd–DOTP ^{hm}	Gd–DOTP ^{OEt}	Gd–DOTA ¹²⁹
q_{IS}	<u>0.1</u>	<u>0.2</u>	<u>0.15</u>	1
a_{GdH} (Å)	<u>3.6</u>	<u>3.6</u>	<u>3.6</u>	–
R_{GdH} (Å)	<u>3.1</u>	<u>3.1</u>	<u>3.1</u>	–
$^{298}\tau_{\text{M}}$ (ps) ^a	60 ± 3	95 ± 4	65 ± 5	0.24
ΔH (kJ/mol)	45 ± 8	54 ± 6	37 ± 10	49.8
$^{298}\tau_{\text{R}}$ (ps) ^b	70 ± 3	52 ± 3	160 ± 18	77
E_{R} (kJ/mol)	<u>16.1</u>	<u>16.1</u>	<u>16.1</u>	16.1
$^{298}\tau_{\text{v}}$ (ps)	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.2	6.3 ± 0.9	11
E_{v} (kJ/mol)	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	1
Δ^2 (10^{20} s^{-2})	0.55 ± 0.6	0.65 ± 0.4	0.8 ± 0.1	0.16
A/\hbar (10^6 rad s^{-1})	<u>-3.6</u>	<u>-3.6</u>	<u>-3.6</u>	
$^{310}r_1$ ($\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) ^a	2.2	2.2	2.1	3.83 ¹²
R_{GdO} (Å)	<u>4.00</u>	<u>4.00</u>	<u>4.00</u>	–

^a Hodnoty relaxivity byly měřeny při 37 °C a 20 MHz. Podtržené hodnoty byly při zpracování fixovány.

Tyto hodnoty byly nalezeny iterativním způsobem, kdy hlavním kritériem bylo udržet parametry ve fyzikálně smysluplných mezích. Pro všechny systémy tomuto bylo vyhověno nastavením hodnoty q (počtu molekul vody v první koordinační sféře) do rozmezí 0.1–0.2. Tento přístup se může zdát rozporuplný, ačkoli musí být zdůrazněno, že efekty pozorované u ^{17}O dat musí být způsobeny vlivem přítomnosti druhé či vnější hydratační sféry, které jsou při zpracování nahrazeny příspěvkem sféry vnitřní. Další parametry musely být fixovány na typické hodnoty nalezené pro gadolinité komplexy s $q = 1$, jako například volná energie molekulárního pohybu E_{R} , a všechny strukturní parametry A , R_{GdO} a R_{GdH} . Chemické posuny nebyly do tohoto zpracování zahrnuty a tvar jejich teplotní závislosti tento model zcela vyvrací. To může být způsobeno dislokací molekul vody v druhé sféře mimo pseudo- C_4 osu komplexu. Znaménko a

hodnota chemického posunu byly určeny za speciálních souřadnic a pokud jsou molekuly vody umístěny stranou osy, nemohou se profily chemických posunů zahrnout do modelů pro zpracování. Ve světle tohoto faktu může být podobnost mezi profily chemických posunů komplexů Gd-DOTP^H a Gd-DOTP^{hm} pouze shodou náhod.

Druhým přístupem, zřejmě poněkud korektnějším, je matematické zpracování relaxometrických dat pomocí rovnic pro druhou sféru.

Byl tedy proveden pokus o simultánní zpracování ¹H NMRD profilů a ¹⁷O dat společně s EPR daty, která byla naměřena ve spolupráci s universitou v Coimbre (viz výše). Pro zpracování ¹⁷O dat byly použity již dříve použité rovnice sestavené speciálně pro molekuly s pouze druhou a vnější hydratační sférou.¹²⁹ Bohužel je toto simultánní matematické zpracování při tomto přístupu nemožné (diskuze viz. níže). Pouze po vypuštění veškerých ¹⁷O dat a zafixování řady parametrů byl získán rozumný fit pro ¹H NMRD profily a velice dobrý pro hodnoty transverzálních elektronických relaxačních časů, T_{2e} . Proměnnými byly elektronické parametry ²⁹⁸ τ_v (korelační čas modulace ZFS interakce, ZFS = Zero Field Splitting, tj. rozštěp elektronických hladin v nulovém magnetickém poli), Δ^2 (kvadrát stopy tenzoru ZFS) a počet molekul v druhé hydratační sféře, q^{SS} . Princip výpočtu je podobný jako v předchozím případě, jen parametry musely být zpracovány jeden po druhém a procedura samotná byla několikrát opakována. Vypřesnění všech parametrů současně vedlo k jejich nesmyslným hodnotám.

Shrnutí výsledků je uvedeno v *Tabulce 13*. Použité rovnice a vysvětlivky k parametrům jsou uvedeny v příloze.

Tabulka 13. Výsledky simultánního matematického zpracování ^1H NMRD a EPR dat (pH = 6)

	Gd-DOTP ^H	Gd-DOTP ^{hm}	Gd-DOTP ^{OEt}	Gd-DOTP ^{OBu} (ref. ¹²⁴) ^d
q_{ss}	1.2	1.3	0.9	0.7
a_{GdH} (Å)	<u>3.5</u>	<u>3.5</u>	<u>3.5</u>	<u>3.5</u>
R_{GdH} (Å)	<u>3.59</u>	<u>3.59</u>	<u>3.59</u>	<u>3.59</u>
$^{298}\tau_{\text{M,ss}}$ (ps) ^a	<u>56</u>	<u>56</u>	<u>56</u>	<u>56</u>
ΔH (kJ/mol)	<u>35.0</u>	<u>35.0</u>	<u>35.0</u>	<u>35.0</u>
$^{298}\tau_{\text{R}}$ (ps) ^b	<u>88.9</u>	<u>110.6</u>	<u>130.7</u>	<u>162.0</u>
E_{R} (kJ/mol)	<u>25.4</u>	<u>25.4</u>	<u>25.4</u>	<u>25.4</u>
$^{298}\tau_{\text{v}}$ (ps)	3.2	3.7	6.1	4.3
E_{v} (kJ/mol)	<u>1000</u>	<u>1000</u>	<u>1000</u>	<u>1000</u>
Δ^2 (10^{20} s^{-2})	1.05	1.06	1.05	1.04
δ_{gL2}	<u>0.021</u>	<u>0.021</u>	<u>0.021</u>	<u>0.021</u>
$^{298}D_{\text{GdH}}$ ($10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}^{-1}$) ^c	<u>2.48</u>	<u>2.40</u>	<u>2.37</u>	<u>2.33</u>
E_{DGdH} (kJ/mol)	<u>18.2</u>	<u>18.2</u>	<u>18.2</u>	<u>18.2</u>
R_{GdO} (Å)	<u>4.00</u>	<u>4.00</u>	<u>4.00</u>	<u>4.00</u>
$\chi(1+\eta^{2/3})^{1/2}$ (MHz)	<u>7.58</u>	<u>7.58</u>	<u>7.58</u>	<u>7.58</u>

^a spočteno dle publikovaných vzorců¹³⁰

^b spočteno z molekulárních objemů zjištěných programem HyperChem a s pomocí Stokesových–Debyeových–Einsteinových rovnic. τ_{R} hodnoty byly spočteny z publikovaných τ_{R} hodnot pro Gd-DO3AP¹³¹ korekcí beroucí v úvahu dané molekulární objemy modelů, jak byly spočteny v programu HyperChem.

^c spočteno z molekulové hmotnosti pomocí dříve publikovaných rovnic¹²⁶

^d Experimentální hodnoty r_1 pro komplex Gd-DOTP^{OBu} byly odečteny z publikovaných grafů¹⁹

V Tabulce 13 je uvedeno i srovnání s hodnotami pro komplex Gd-DOTP^{OBu}, komplex rovněž bez molekuly vody ve vnitřní koordinační sféře, pro který byl použit stejný model pro zpracování, jako v případě komplexů námi studovaných. Hodnoty publikované pro tento komplex jsou v dobré shodě s našimi výsledky.

Podtržené parametry byly fixovány na určitou hodnotu, která byla odhadnuta či byla použita hodnota nalezená u komplexů s koordinovanou molekulou vody. Na první pohled by se mohlo

zdát, že fixovaných parametrů je hodně (celkem 12 z 15), ale musí být znovu poznamenáno, že je toto jedna z prvních prací, kdy byly provedeny pokusy o matematické zpracování parametrů nalezených pro komplexy bez vody ve vnitřní koordinační sféře. O druhé sféře toho zatím moc známo není a analogické parametry, jaké jsou známy pro komplexy s vodou ve vnitřní sféře, nejsou zatím u bezvodých komplexů přesně určeny. Proto se také může zdát, že při tak velkém počtu fixovaných parametrů, kdy řada z nich je jen odhadnuta, můžeme dospět k řadě velice odlišných výsledků, právě v závislosti na tom, jak se jednotlivé parametry navolí. Výsledky byly ovšem zpracovány ve spolupráci řady velice zkušených lidí, kteří jsou schopni dostatečně kvalifikovaně odhadnout, jaké parametry lze na jaké hodnoty nastavit. S jistou chybou při výpočtech ovšem počítat musíme, ale ta by snad neměla být výrazná.

Zpracovat ^{17}O relaxometrická data se nám bohužel nepodařilo.

V případě, že jsme zkusili spočítat ^{17}O relaxační časy s pomocí parametrů získaných z výše uvedené analýzy, získali jsme hodnoty, které byly podstatně nižší než ty experimentální. Pravděpodobně je to tím, že u ^{17}O dat nebyla provedena korekce na diamagnetický příspěvek, což u ^1H NMRD profilů provedeno bylo. Pouze odečtení příspěvku čisté vody není v tomto případě dostačující. Odečtení příspěvku komplexu Y^{3+} by zřejmě mohlo vést ke smysluplnějším výsledkům. Bohužel jsou ale hodnoty relaxačních rychlostí zřejmě příliš nízké, spadají do chyby měření a po odečtení diamagnetického příspěvku se zejména u nižších teplot dostáváme s hodnotami relaxačních časů i pod nulu, což nám neumožňuje je převést do logaritmické škály a matematicky zpracovat.

Samostatné zpracování ^{17}O dat také není možné, neboť u nich převažuje pseudokontaktní příspěvek, a jeho hodnota závisí krom jiným veličin i na polárních souřadnicích molekul vody druhé sféry a na susceptibilitním tensoru. Tyto hodnoty však nejsme schopni zjistit.

V případě, že bychom chtěli porovnat studované komplexy z relaxometrického hlediska s komplexy analogickými, je zažité srovnávat hodnoty (zejména pak v případě kontrastních látek) relaxivity R_1 měřené při 20 MHz a 37 °C. V tabulce níže je tedy uvedeno srovnání těchto hodnot pro gadolinité komplexy s různými ligandy (*Tabulka 14*).

Tabulka 14. Hodnoty relaxivity R_1 naměřené při 20 MHz a 310 K pro námi studované komplexy (tučně). Pro srovnání jsou uvedeny publikované hodnoty pro komplexy strukturně podobné

komplex	$R_1 / \text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ (37 °C, 20 MHz, pH~6.5)
Gd-DOTP^H	2.2
Gd-DOTP^{hm}	2.2
Gd-DOTP^{OE_t}	2.1
Gd-DOTA (q=1)	3.83 ¹²
Gd-DOTP ^{OE_t}	2.4 ¹⁹
Gd-DOTP ^{OBu}	2.2 ¹⁹
Gd-DOTP ^{Bz}	1.6 ²⁹
Gd-DOTP ^{Me}	1.8 ²⁹
Gd-DOTP ^m	1.4 ²⁸

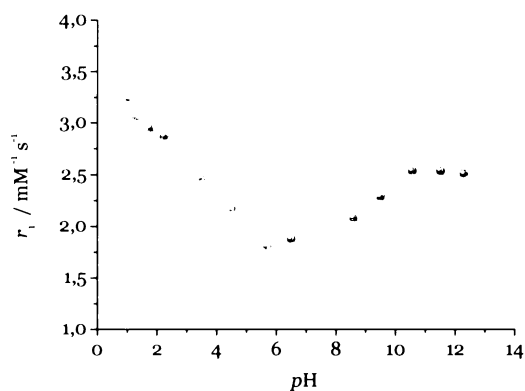
Z hodnot relaxivit je patrné, že námi studované komplexy se v této hodnotě pohybují někde v rozmezí mezi komplexem Gd-DOTA s jednou přímo koordinovanou molekulou vody a komplexy s DOTP^{Me}, DOTP^{Bn} a DOTP^m.

U veličin charakterizujících elektronovou relaxaci gadolinitého iontu nalezených při matematickém zpracování ¹H NMRD profilů a EPR dat si můžeme všimnout zvýšení hodnot Δ^2 a snížení ²⁹⁸ τ_v oproti komplexu Gd-DOTA, což značí výrazné zrychlení elektronové relaxace (Tabulka 15). To je v souladu s krátkými elektronickými relaxačními časy T_{2e} vypočtenými z EPR dat.

Tabulka 15. Srovnání elektronických parametrů pro komplexy Gd-DOTP^H, Gd-DOTP^{hm}, Gd-DOTP^{OEt}, Gd-DOTP^{OBu} a Gd-DOTA

	²⁹⁸ τ _v (ps)	Δ ² (10 ²⁰ s ⁻²)
Gd-DOTP ^H	3.2	1.05
Gd-DOTP ^{hm}	3.7	1.06
Gd-DOTP ^{OEt}	6.1	1.05
Gd-DOTP ^{OBu}	4.3 ¹²⁵	1.04 ¹²⁵
Gd-DOTA	11 ¹²⁹	0.16 ¹²⁹

U gadolinitých komplexů ligandů DOTP^H a DOTP^{hm} byl studován rovněž vliv pH na hodnotu relaxivity. Relaxivita komplexu ligandu DOTP^H je na pH nezávislá (měřeno pro pH 4, 6, 7, 10), u komplexu Gd-DOTP^{OEt} se vzhledem k nalezené nezávislosti u analogických komplexů¹³² předpokládá a u komplexu Gd-DOTP^{hm} byla nalezena pH závislost relaxivity uvedená na obrázku (Obrázek 56).



Obrázek 56. Závislost r₁ na pH pro komplex Gd-DOTP^{hm} (T = 37 °C, 20 MHz)

Oproti původnímu očekávání, se mění relaxivita se změnou pH až o 50 %.

Vzrůst relaxivity v mírně kyselé a mírně bazické oblasti může být způsoben buď jistým druhem bazicky a kysele katalyzované prototropní výměny, podobně jako například u amidů ligandu DOTA,^{133,134} ale i změnou struktury druhé sféry s pH.

V oblasti velmi kyselého pH (< 2) se z komplexu začíná pomalu uvolňovat volný kov, což má za následek další zvětšování relaxivity.

³¹P relaxometrie

Vzhledem k tomu, že hodnoty relaxačních časů měřeného jádra jsou závislé na vzdálenosti lanthanoid–měřené jádro, lze například z hodnot fosforových relaxačních časů spočítat vzdálenost kationtu Ln³⁺ a fosforu pendantního ramene ligandu, r .

Pro komplexy s Ln³⁺ ionty různými od gadolinitých by mělo být možné použít pouze velmi zjednodušenou rovnici (59),⁸

$$\frac{1}{T_{1,p}} = \frac{4}{3} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^2 \mu_{\text{eff}}^2 \beta^2}{r^6} T_{1e} \quad (59)$$

kde $T_{1,p}$ je námi naměřený relaxační čas, μ_0 magnetická permeabilita vakua, γ gyromagnetický poměr, μ_{eff} efektivní magnetický moment Ln³⁺ iontu a β Bohrov magneton. Tato rovnice zohledňuje pouze dipolární příspěvek k relaxaci sledovaného jádra, v našem případě ³¹P. Navíc, vzhledem k rychlé elektronické relaxaci (nízká hodnota elektronického relaxačního času, T_{1e}) Ln³⁺ iontu, by měl být právě tento korelační čas dominantní a rychlost určující. Potřebné hodnoty konstant a parametrů jsou uvedeny v tabulce níže⁸ (Tabulka 16 a 17).

Tabulka 16. Hodnoty konstant potřebných k výpočtům vzdálenosti Ln–P.

β (J T ⁻¹)	9.274×10^{-24}
γ^* (s ⁻¹ T ⁻¹)	1.083×10^8
μ_0 (H m ⁻¹)	1.257×10^{-6}
H_0 (T)	7
k_B (J K ⁻¹)	1.38×10^{-23}

⁸Hodnota pro jádro ³¹P.

Tabulka 17. Hodnoty efektivních magnetických momentů μ_{eff} a elektronických relaxačních časů T_{1e} pro Nd³⁺ a Tm³⁺ kationty.

	Nd ³⁺	Tm ³⁺
T_{1e} (10 ⁻¹³ s)	1.15	3.69
μ_{eff} (B.M.)	3.68	7.6

Naměřené fosforové relaxační časy jsou uvedeny v *Tabulce 18*.

Tabulka 18. Hodnoty ^{31}P relaxačních časů v s^{-1} pro Nd^{3+} a Tm^{3+} komplexy ligandů DOTP^{H} , DOTP^{hm} , DOTP^{OEt}

	DOTP^{H}	DOTP^{hm} (RRRR nebo SSSS)	DOTP^{hm} (RRRS nebo SSSR)	DOTP^{OEt}
Nd^{3+}	0.0585–0.0671	0.06052	0.0596–0.0613	0.0547–0.0559
Tm^{3+}	0.00315–0.00426	0.00306	0.00289–0.00309	–

Z toho důvodu, že v případě komplexů ligandů DOTP^{H} a DOTP^{OEt} byla pro každý pík nalezena jiná hodnota ^{31}P T_1 , byla pro spočtení vzdálenosti Ln–P použita největší a nejmenší naměřená hodnota fosforového relaxačního času a získali jsme tak jisté rozmezí, ve kterém by se měla vzdálenost lanthanoid fosfor pohybovat. Jako referentní byly použity hodnoty pro yttritické komplexy. Spektra nebyla pro měřený a referentní vzorek shodná a nemohly tak být od sebe odečteny hodnoty fosforových relaxačních časů pro odpovídající píky, byla pro korekci použita průměrná hodnota relaxačního času yttritického komplexu příslušného ligandu. Relaxační časy komplexu $\text{Tm}-\text{DOTP}^{\text{OEt}}$ se bohužel zřejmě z důvodu nízké koncentrace vzorku nepodařilo naměřit. V případě ligandu DOTP^{hm} se však podařilo píky ve spektru přiřadit a mohly tak být spočteny vzdálenosti lanthanoid fosfor pro jednotlivé izomery. V případě izomeru RRRS (nebo SSSR), kterému ve spektru odpovídají čtyři píky, byla opět pro výpočet použita nejmenší a největší hodnota ^{31}P T_1 . Yttritický komplex ligandu DOTP^{hm} má ve fosforovém spektru pouze jeden pík, jemuž odpovídající hodnota relaxačního času byla použita jako referentní a odečtena od ^{31}P T_1 vzorku. Hodnoty spočtených vzdáleností jsou uvedeny v *Tabulce 19*.

Tabulka 19. Hodnoty vzdáleností Ln–P ($\text{Ln} = \text{Nd}^{3+}$, Tm^{3+}) v Å spočtené dle rovnice 59 pro studované komplexy.

	DOTP^{H}	DOTP^{hm} (RRRR nebo SSSS)	DOTP^{hm} (RRRS nebo SSSR)	DOTP^{OEt}
Nd^{3+}	3.27–3.35	3.29	3.28–3.30	3.24–3.25
Tm^{3+}	3.11–3.27	3.09	3.07–3.10	–

Vzdálenosti Ln–P pro komplexy s Nd³⁺ jsou však výrazně menší než bylo očekáváno. Proto byly hodnoty přepočítány s použitím níže uvedené rovnice,¹³⁵ která zahrnuje i Curieho příspěvek k relaxaci, tj. člen s rotačním korelačním časem molekuly (60),

$$\frac{1}{T_{1,p}} = \left[\frac{4}{3} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma^2 \mu_{\text{eff}}^2 \beta^2 T_{1e} + \left\{ \frac{6}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^2 H_0^2 \mu_{\text{eff}}^4 \beta^4}{(3k_B T)^2} \right\} \tau_R \right] \frac{1}{r^6} \quad (60)$$

kde H_0 je síla magnetického pole, k_B Boltzmannova konstanta a τ_R rotační korelační čas molekuly. Hodnoty rotačních korelačních časů (použité rovněž pro zpracování relaxometrických dat pro Gd³⁺ komplexy) spolu s hodnotami konstant potřebných při výpočtu jsou uvedeny v *Tabulkách 16, 17 a 20*.

Tabulka 20. Hodnoty rotačních korelačních časů pro komplexy studovaných ligandů

	Gd–DOTP ^H	Gd–DOTP ^{hm}	Gd–DOTP ^{OEt}
τ_R (ps)	88.9	110.6	130.7

Výsledky tohoto výpočtu jsou uvedeny v *Tabulce 21*.

Tabulka 21. Hodnoty vzdáleností Ln–P (Ln = Nd³⁺, Tm³⁺) v Å spočtené dle rovnice 60 pro studované komplexy. Pro srovnání jsou uvedeny i hodnoty vzdáleností Gd–P obdržené z rentgenostrukturní analýzy

	DOTP ^H	DOTP ^{hm} (RRRR nebo SSSS)	DOTP ^{hm} (RRRS nebo SSSR)	DOTP ^{OEt}	
Nd ³⁺	3.40–3.48	3.44	3.44–3.45	3.41–3.42	
Tm ³⁺	3.27–3.43	3.28	3.25–3.29	–	
Gd ³⁺	3.401	–	–	3.409	3.433
	3.412	–	–	3.419	3.418
		–	–	3.418	3.431
		–	–	3.434	3.405

Z *Tabulky 21* je tedy patrné, že se hodnoty vzdáleností výrazně přiblížily k předpokládaným a druhý člen uvedených rovnic tak nelze v našem případě zřejmě zanedbat. V případě komplexů s thuliem jsou hodnoty vzdáleností menší než v případě komplexů s Nd^{3+} , což je v souladu s tím, že ion thulitý má menší iontový poloměr než Nd^{3+} . Hodnoty získané z rentgenových struktur pro Gd^{3+} komplexy jsou menší či srovnatelné s hodnotami pro Nd^{3+} komplexy, což je opět přibližně v souladu s velikostí iontových poloměrů.

Pro srovnání jsou v tabulce níže uvedeny hodnoty vzdáleností získané z rentgenografických analýz pro komplexy $\text{Ln-DOTP}^{\text{Bn}}$, Gd-DOTP , $\text{La-DOTP}^{\text{Ph}}$ a $\text{Ce-DOTP}^{\text{Ph}}$. U této série můžeme rovněž pozorovat pokles vzdálenosti Ln-P se klesajícím poloměrem Ln^{3+} (*Tabulka 22*).

Tabulka 22. Hodnoty vzdáleností Ln-P v Å pro komplexy $\text{Ln-DOTP}^{\text{Bn}}$, Gd-DOTP , $\text{La-DOTP}^{\text{Ph}}$ a $\text{Ce-DOTP}^{\text{Ph}}$ získané z rentgenostrukturních analýz.

$\text{La-DOTP}^{\text{Bn}}$ (ref. ²⁸)	$\text{La-DOTP}^{\text{Ph}}$ (ref. ⁴⁰)		$\text{Ce-DOTP}^{\text{Ph}}$ (ref. ⁴⁰)		$\text{Eu-DOTP}^{\text{Bn}}$ (ref. ²⁸)	Gd-DOTP (ref. ³⁸)		$\text{Dy-DOTP}^{\text{Bn}}$ (ref. ⁴¹)	$\text{Yb-DOTP}^{\text{Bn}}$ (ref. ³⁸)	
3.554	3.567	3.570	3.540	3.544	3.440	3.467	3.466	3.406	3.355	3.396
3.547	3.637	3.634	3.622	3.614	3.446			3.423	3.397	3.417
3.560	3.581	3.572	3.552	3.548	3.435			3.415	3.361	3.407
3.509	3.617	3.584	3.591	3.569	3.425			3.421	3.383	3.408

Pro vzdálenosti spočtené dle relaxačních časů jsou hodnoty v některých případech v dosti velkém rozmezí, což je dáno relativně velkými rozdíly v relaxačních časech pro jednotlivé fosforové atomy daného komplexu.

VII. Závěr

V této diplomové práci byly studovány tetrafosforové ligandy a jejich komplexy, zejména pak s Ln^{3+} kationty, které by neměly vázat molekulu vody v první koordinační sféře. Tyto sloučeniny byly dále charakterizovány řadou metod za účelem získání více informací o jejich vlastnostech. Již dříve byla na europitých komplexech těchto ligandů luminiscenční spektroskopií potvrzena absence přímo koordinované vody. Tento fakt byl rovněž potvrzen i u rentgenových struktur komplexů $\text{Gd-DOTP}^{\text{H}}$ a $\text{Gd-DOTP}^{\text{OEt}}$. Koordinovaná molekula vody byla nalezena pouze v případě komplexů $\text{Ce-DOTP}^{\text{H}}$ a $\text{Ce-DOTP}^{\text{OEt}}$, a to měřením ^{17}O lanthanoidy indukovaných posunů. Měření ^{31}P NMR spekter odhalilo pozoruhodnou odlišnost mezi komplexy $\text{Ln-DOTP}^{\text{H}}$ a $\text{Ln-DOTP}^{\text{OEt}}$ oproti $\text{Ln-DOTP}^{\text{hm}}$ a to v počtu jejich izomerů v roztoku. Zatímco u dříve jmenovaných byla nalezena směs mnoha izomerů, v případě komplexů $\text{Ln-DOTP}^{\text{hm}}$ se v roztoku setkáváme pouze s izomery dvěma, u kterých ještě výrazně převažuje zcela symetrický izomer $RRRR$ ($SSSS$). Z relaxometrického hlediska vykazují pak všechny studované systémy velice podobné vlastnosti. Za účelem získání více informací z tohoto směru byla provedena úplná relaxometrická studie na gadolinitých komplexech studovaných ligandů. Naneštěstí se však ukázala být ^{17}O data (T_1 , T_2 a ω) poněkud nezajímavá, právě z důvodu absence molekuly vody ve vnitřní koordinační sféře. Byl proveden i pokus o jejich simultánní matematické zpracování s ^1H NMRD profily dle klasického BSM modelu. Smysluplnější se ale nakonec jevilo simultánní zpracování pouze ^1H NMRD profilů spolu s EPR daty, pro které byla použita sada rovnic vytvořených speciálně pro molekuly, u nichž se uvažuje pouze vliv druhé a vnější hydratační sféry. Z nich byly získány jednak elektronické parametry, Δ^2 a τ_v a dále také počet molekul v druhé koordinační sféře, q^{SS} . Z ^{31}P relaxometrických dat byly rovněž spočteny vzdálenosti Ln-P v komplexech lanthanoidů, které jsou ve velice dobré shodě s daty získanými z rentgenové strukturní analýzy.

Stručně řečeno, navzdory tomu, že tyto systémy vykazují tak podobné relaxometrické vlastnosti, liší se rozhodně ve struktuře komplexů v roztoku. To může být dáno právě různým vlivem vodíkových vazeb, vyskytujících se v těchto ligandech a komplexech. Podle všeho je ale zřejmé, že bude v případě těchto sloučenin nutné ještě jejich další zkoumání a to v mnoha směrech.

VIII. Literatura

- [1] Greenwood, N. N.; Earnshaw, A. *Chemie prvků* Informatorium, Praha **1993**
- [2] Lindoy, L. F. *Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*, Cambridge University Press, Cambridge **1989**
- [3] Příklady crownetherů viz. internetová stránka:
http://www.vscht.cz/uoch/Skupiny/Lhotak/my_webs/_private/crownethery.htm
- [4] Teorie potenciometrických titrací viz. internetová stránka:
<http://www.ft.utb.cz/people/koutny/analchem/bodekv.doc>
- [5] Teorie k rentgenové difrakci a měření struktury krystalů viz. internetová stránka:
<http://www.xray.cz/krystalografie>
- [6] Teorie k EPR spektroskopii viz. internetová stránka:
<http://cheminfo.chemi.muni.cz/ianua/epr/index.htm>
- [7] Teorie k NMR spektroskopii viz. internetová stránka VŠCHT Praha:
<http://www.vscht.cz/nmr/predmet/lekce/NMR-lekce1.pdf>
- [8] Peters, J. A.; et al. *Progress in NMR Spectroscopy* **1996**, 28, 283
- [9] Winter, P. M.; et al. *J. Appl. Physiol.* **1998**, 85, 1806
- [10] Seshan, V.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1995**, 34, 25
- [11] Aime, S.; et al. *Chem. Commun.* **1996**, 1265
- [12] Merbach, A. E.; Tóth, É. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, New York **2001**
- [13] Šedinová, M. *Bakalářská práce* **2005**
- [14] Botta, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 399
- [15] Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1987**, 87, 901
- [16] Informace o radiomedicíně lze nalézt na internetové stránce:
<http://www.sweb.cz/AstroNuklFyzika/JadRadMetody.htm>
- [17] Bazakas, K.; Lukeš, I. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 1133
- [18] Cole, E; et al. *Synthesis* **1992**, 63
- [19] Geraldes, C. F. G. C.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1993**, 30, 696
- [20] Rohovec, J.; et al. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 195
- [21] Lubal, P.; et al. *Polyhedron* **2001**, 20, 47

- [22] Parker, D.; et al. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 605
- [23] Geraldes, C. F. G. C.; et al. *Inorg Chem.* **1989**, 28, 3336
- [24] Lázár, I.; et al. *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 4422
- [25] Delgado, R.; et al. *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 140
- [26] Burai, L.; et al. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 813
- [27] Kim, D.W.; et al. *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 4128
- [28] Aime, S.; et al. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 3623
- [29] Aime, S.; et al. *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 4696
- [30] Rohovec, J.; et al. *New J. Chem.*, **1999**, 23, 1129
- [31] Carvalho, R. A.; et al. *Inorg. Chim. Acta* **1997**, 262, 167
- [32] Hassfjell, S.; et al. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2003**, 1433
- [33] Sherry, A. D.; et al. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 4604
- [34] Cole, E.; et al. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1473
- [35] Medved, T. Y.; et al. *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* **1988**, 37, 1886
- [36] Kabachnik, M. I. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1987**, 30, 165
- [37] Havlíčková, J.; *Diplomová práce*, PřF UK Praha, **2005**
- [38] Avecilla, F.; et al. *Eur. J. Inorg. Chem* **2003**, 4179
- [39] Kong, D. Y.; et al. *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 7308
- [40] Rohovec, J.; et al. *J. Chem. Soc., Dalton Trans* **1999**, 3585
- [41] Luck, R. L.; et al. *Inorg. Chim. Acta* **2001**, 317, 331
- [42] Anelli, P. L.; et al. *Gazzetta Chimica Italiana* **1991**, 121, 359
- [43] Faulkner, S.; et al. *J. Fluorescence* **1999**, 9, 45
- [44] Geraldes, C. F. G. C.; et al. *Eur. J. Inorg. Chem* **2000**, 559
- [45] Geraldes, C. F. G. C.; et al. *J. Magn. Reson.* **1992**, 97, 290
- [46] Ren, J. M.; et al. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, 339, 273
- [47] Sherry, A. D.; et al. *Inorg. Chim. Acta* **1987**, 139, 137
- [48] Kohler, S. J.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1992**, 23, 77
- [49] Xia, Z.F.; et al. *J. Appl. Physiol.* **1996**, 81, 1395
- [50] Butwell, N. B.; et al. *Am. J. Physiol.* **1993**, 264, H1884
- [51] Pike, M. M.; et al. *Am. J. Physiol.* **1993**, 265, H2017
- [52] Xia, Z. F.; et al. *Am. J. Physiol.* **1994**, 76, 1507

- [53] Wittenkeller, L.; et al. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 1135
- [54] Ramasamy, R.; et al. *Inorg. Chim. Acta* **1989**, *163*, 41
- [55] Winter, P. M.; Bansal, N. *Magn. Reson. Med.* **2001**, *45*, 436
- [56] Xia, Z.F.; et al. *J. Surgical Research* **1997**, *69*, 212
- [57] Vanemous, J.G.; et al. *J. Molecular and Cellular Cardiology* **1997**, *29*, 85
- [58] Makos, J. D.; et al. *J. Appl. Physiol.* **1998**, *85*, 1800
- [59] Collet, J. M.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1999**, *41*, 1127
- [60] Butwell, N. B.; et al. *Invest. Radiol.* **1991**, *26*, 1079
- [61] Collet, J. M.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1998**, *39*, 155
- [62] Bansal, N.; et al. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5638
- [63] Winter, P. M.; Bansal, N. *J. Magn. Reson.* **2001**, *152*, 70
- [64] Seshan, V.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1997**, *38*, 821
- [65] Weidensteiner, C.; et al. *Magn. Reson. Med.* **2002**, *48*, 89
- [66] Ren, J. M.; Sherry, A. D. *Inorg. Chim. Acta* **1996**, *246*, 331
- [67] Malloy, C. R.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1990**, *15*, 33
- [68] Buster, D. C.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1990**, *15*, 25
- [69] Collet, J. M.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1998**, *39*, 155
- [70] Pike, M. M.; et al. *Circulation* **1990**, *82*, 686
- [71] Makos, J.; et al. *Abstract of Papers of the Am. Chem. Soc.* **1996**, *211*, 583
- [72] Sherry, A. D.; et al. *J. Magn. Reson.* **1988**, *76*, 528
- [73] Ramasamy, R.; et al. *Biochimie* **1992**, *74*, 777
- [74] Corsi, D. M.; et al. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 4802
- [75] Zuo, C. S.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1996**, *36*, 955
- [76] Zuo, C. S.; et al. *J. Magn. Reson.* **1998**, *133*, 53
- [77] Zuo, C. S.; et al. *Radiology* **1996**, *201*, 1410
- [78] Sun, Y. P.; et al. *Radiology* **1998**, *209P*, 613
- [79] Dickins, R. S.; et al. *Chem. Commun.* **1996**, 697
- [80] Sun, Y.; et al. *NMR Biomed.* **2000**, *13*, 460
- [81] Aime, S.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1993**, *30*, 583
- [82] Ren, J. M.; Sherry, A. D. *J. Magn. Reson.* **1996**, *111*, 178
- [83] Geraldès, C. F. G. C.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1989**, *9*, 94

- [84] Villa, A.; et al. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 3421
- [85] Geraldès, C. F. G. C.; et al. *Magn. Reson. Med.* **1986**, *3*, 242
- [86] Harrison, A.; et al. *Magn. Reson. Imaging* **1993**, *11*, 761
- [87] Parker, D.; et al. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1441
- [88] Parks, N. J.; et al. *Blood* **1993**, *82*, 318
- [89] Bayouth, J. E.; et al. *Medical Physics* **1995**, *22*, 743
- [90] Rajendran, J. G.; et al. *J. Nucl. Med.* **2002**, *43*, 1383
- [91] Bayouth, J. E.; et al. *J. Nucl. Med.* **1995**, *36*, 730
- [92] Champlin, R.; et al. *Blood* **1993**, *82*, A266
- [93] Champlin, R.; et al. *Experimental Hematology* **1993**, *21*, 1117
- [94] Bayouth, J. E.; et al. *J. Nucl. Med.* **1993**, *34*, P161
- [95] Rajendran, J. G.; et al. *J. Nucl. Med.* **2000**, *41*, 576
- [96] Kasi, L. P.; et al. *J. Nucl. Med.* **1993**, *34*, P33
- [97] Hassfjell, S. P.; et al. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 231
- [98] Hassfjell S. P.; et al. *Nucl. Med. Biol.* **2001**, *28*, 425
- [99] Sun, X. K.; et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 217
- [100] Beeby, A.; et al. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 493
- [101] Huskowska, E.; et al. *Enantiomer* **1997**, *2*, 381
- [102] Dickins, R. S.; et al. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2003**, 1264
- [103] Geraldès, C. F. G. C.; et al. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 559
- [104] Murru, M.; et al. *J. Chem. Soc, Chem. Commun.* **1993**, 1116
- [105] Jones–Wilson, T. M.; et al. *Nucl. Med. Biol.* **1998**, *25*, 523
- [106] Aime, S.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9365
- [107] Aime, S.; et al. *J. Inorg. Bioch.* **1998**, *71*, 37
- [108] Sherry, A. D.; et al. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, 361
- [109] Ren, J. M.; et al. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 3493
- [110] Aime, S.; et al. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1261
- [111] Raghunand, N.; et al. *Magn. Reson. Med.* **2003**, *49*, 249
- [112] Geraldès, C. F. G. C.; et al. *J. Inorg. Bioch.* **2003**, *96*, 137
- [113] Alves, F. C.; et al. *Invest. Radiol.* **2003**, *38*, 750
- [114] Kývala, M.; Lukeš, I. *International Conference, Chemometrics '95*, p. 63. Pardubice,

Czech Republic, **1995**; plná verze programu „OPIUM“ je dostupná na
<http://www.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>

- [115] *Kappa CCD software package (Nonius)*, **1998**
- [116] Sheldrick, G. M. *SHELXL-97, A computer program for refinement of crystal structures*. University of Göttingen, Göttingen **1997**
- [117] Program Mestrec *EXSY CALC* a podrobné informace o jeho užívání lze nalézt na internetové adrese: <http://www.mestrec.com/producto.php?id=9>
- [118] Lázár, I.; et al. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 5016
- [119] Angeregg, G.; et al., *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 1445
- [120] Tóth, É.; Brücher, E. *Inorg. Chim. Acta* **1994**, *221*, 165
- [121] Kukhar, V. P.; Hudson, H. R. Eds; *Aminophosphinic and Aminophosphonic Acids I.*, John Willey & Sons, LTD **2000**
- [122] Haber, V. *Koordinační chemie I*, UK v Praze, **1977**
- [123] Kotek, J. *nepublikované výsledky*
- [124] Pereira, G. *nepublikované výsledky*
- [125] Caravan, P.; et al. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293
- [126] Zitha–Bovens, E.; et al. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 618
- [127] Jacques, V.; Desreux, J. F. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4048
- [128] Powell, D. H.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9333
- [129] Lebdušková, P.; et al. *Dalton Trans.* **2006**, *v tisku*
- [130] Borel, A.; et al. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 600
- [131] Rudovský, J.; et al. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2373
- [132] Lebdušková, P. *nepublikované výsledky*
- [133] Aime, S.; et al. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 941
- [134] Aime, S.; et al. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 2045
- [135] Kotek, J.; et al. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5899

IX Seznam použitých zkratek

BMS	Bulk Magnetic Susceptibility (shift)
BSM	Bloembergenova–Solomonova–Morganova (teorie)
CA	Contrast Agents
CPMG	Carrova, Purcellova, Meiboomova, Gillova (pulzní sekvence)
EPR	Elektronová Paramagnetická Resonance
EXSY	EXchange SpectroscopY
IS	Inner Sphere
KČ	Koordinační Číslo
LIS	Lanthanide Induced Shift
MCL	MakroCyklické Ligandy
MRI	Magnetic Resonance Imaging
NMR	Nukleární Magnetická Resonance
NMRD	Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion
OS	Outer Sphere
RF	RadioFrekvenční (záření)
RVO	Rotační Vakuová Odparka
SA	Square Antiprism
SEM	Scanning Electron Microscopy
SR	Shift Reagents
SS	Second Sphere
TMS	TetraMethylSilan
TSA	Twisted Square Antiprism
ZFS	Zero Field Splitting

X. Příloha

Fitování relaxometrických dat měřených pro gadolinité komplexy:

Plný set rovnic uvažujících pouze příspěvek druhé a vnější hydratační sféry

- hodnota D_{GH} byla spočtena pomocí publikovaných rovnic¹²⁷
- $E_{D_{GH}}$ byla fixována na hodnotu 18.2 kJ/mol
- pokud není uvedeno jinak, jsou jednotky konstant a parametrů vždy základní

Nezávislé proměnné	T, ω
Závislé proměnné	$T_{1rO}, T_{2rO}, T_{2eesr}, R_1, R_1^{OS}, R_1^{SS}$
Parametry	$q^{SS}, a_{GdH}, R_{GdH}, \Delta H, {}^{298}\tau_v, E_v, \Delta^2, dg_L, {}^{298}D_{GH}, R_{GdO}, \chi\sqrt{1+\sqrt[3]{\eta^2}}, {}^{298}k, E_c, {}^{298}\tau_c$

Hodnoty konstant

B	$\omega \times 0.023488$
R	8.31441
k_B	1.38066×10^{-23}
h	6.626176×10^{-34}
\hbar	1.0546×10^{-34}
S	3.5
γ_j	-3.626×10^7
γ_H	2.675×10^8
β	9.274×10^{-24}
μ_0	1.0×10^{-7}
g_{Li}	2
$\gamma_{eGd^{3+}}$	$\frac{2\pi g_{Li} \cdot \beta}{h}$
$E_{D_{GH}}$	18200

Hodnoty parametrů

ΔH	35000
${}^{298}k$	1.78×10^{10}
E_c	25400
${}^{298}\tau_c$	5.1851×10^{-11}
E_v	1000
${}^{298}\tau_v$	24×10^{-12}
Δ^2	0.34×10^{20}
dg_L	0.021
${}^{298}D_{GH}$	2×10^{-9}
R_{GdO}	4×10^{-10}
R_{GH}	3.59×10^{-10}
a_{GH}	3.5×10^{-10}
$\chi\sqrt{1+\sqrt[3]{\eta^2}}$	7.58×10^6
q^{SS}	4

Použité vztahy

$\omega_e = \gamma_{eGd^{3+}} B$	(22)
$D_{GH} = {}^{298} D_{GH} \exp\left(\frac{E_{D_{GH}}}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T}\right)\right)$	(23)
$k = \left({}^{298} k \frac{T}{298.15}\right) \exp\left(\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T}\right)\right)$	(24)
$\tau_c = {}^{298} \tau_c \exp\left(\frac{E_c}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15}\right)\right)$	(25)
$\tau_v = {}^{298} \tau_v \exp\left(\frac{E_v}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15}\right)\right)$	(26)
$\tau_{GH} = a_{GH} \frac{a_{GH}}{D_{GH}}$	(27)
$T_{sr} = \frac{dg_L}{9\tau_c}$	(28)
$T_{2e} = \Delta^2 \tau_v \frac{5.26}{1 + 0.327\omega_e^2 \tau_v^2} + \frac{7.18}{1 + 1.24\omega_e \tau_v} + T_{sr}$	(29)
$T_{1e} = 2.4\Delta^2 \tau_v \frac{1}{1 + \omega_e^2 \tau_v^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_e^2 \tau_v^2} + T_{sr}$	(30)
$T_{2eesr} = T_{2e} \times 10^8$	(31)
$A_2 = \tau_{GH} T_{2e}$	(32)
$C_2 = [0.1]\omega_e \tau_{GH}$	(33)
$J_2 = RE \frac{1 + 0.25\sqrt{C_2 + A_2}}{1 + \sqrt{C_2 + A_2} + \frac{4}{9}(C_2 + A_2) + \frac{1}{9}\sqrt{(C_2 + A_2)^3}}$	(34)
$A_1 = \tau_{GH} T_{1e}$	(35)
$\omega_1 = \gamma_H B$	(36)
$C_1 = [0.1]\omega \tau_{GH}$	(37)

$J_1 = RE \frac{1 + 0.25\sqrt{C_1 + A_1}}{1 + \sqrt{C_1 + A_1} + \frac{4}{9}(C_1 + A_1) + \frac{1}{9}\sqrt{(C_1 + A_1)^3}}$	(38)
$R_1^{OS} = \frac{5.79571 \times 10^{-19}}{a_{GH} D_{GH}} (3J_1 + 7J_2)$	(39)
$\tau_{s1} = \frac{1}{k + T_{1e}}$	(40)
$\tau_{s2} = \frac{1}{k + T_{2e}}$	(41)
$\tau_{d1} = \frac{1}{k + T_{1e} + \frac{1}{\tau_c}}$	(42)
$\tau_{d2} = \frac{1}{k + T_{2e} + \frac{1}{\tau_c}}$	(43)
$T_{1mH} = \frac{1}{\frac{5.1696 \times 10^{-43}}{r_{GH}^6} \frac{3\tau_{d1}}{1 + \omega_1^2 \tau_{d1}^2} \frac{7\tau_{d2}}{1 + \omega_e^2 \tau_{d2}^2}}$	(44)
$R_1^{SS} = \frac{1.8 \times 10^{-5} q^{SS}}{T_{1mH} + \frac{1}{k}}$	(45)
$R_1 = R_1^{SS} + R_1^{OS}$	(46)
$\omega_2 = \gamma_j B$	(47)
$C_{dd} = S(S+1) \sqrt{\left(\frac{h\gamma_j \gamma_{eGd^{3+}} \mu_0}{R_{GdO}^3} \right)^2}$	(48)
$T_{1d} = C_{dd} \frac{6\tau_{d1}}{1 + \omega_2^2 \tau_{d1}^2} + \frac{14\tau_{d2}}{1 + \omega_e^2 \tau_{d2}^2}$	(49)
$T_{2d} = C_{dd} \frac{13\tau_{d2}}{1 + \omega_e^2 \tau_{d2}^2} + \frac{3\tau_{d1}}{1 + \omega_2^2 \tau_{d1}^2} + 4\tau_{d1}$	(50)

$$T_{1q} = 0.94748 \left(\chi \sqrt{1 + \sqrt[3]{\eta^2}} \right)^2 \tau_c \frac{0.2}{1 + \omega_2^2 \tau_c^2} + \frac{0.8}{1 + 4\omega_e^2 \tau_c^2} \quad (51)$$

$$T_{2q} = 4 \cdot 0.007895684 \left(\chi \sqrt{1 + \sqrt[3]{\eta^2}} \right)^2 \tau_c \frac{15}{1 + \omega_2^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1 + 4\omega_e^2 \tau_c^2} + 9\tau_c \quad (52)$$

$$T_{1c} = \frac{6}{5} \mu_0^2 \frac{\gamma_j^2 B^2 3974.4955 \beta^4}{(3k_B T)^2 R_{GdO}^6 \frac{\tau_c}{1 + \omega_2^2 \tau_c^2}} \quad (53)$$

$$T_{2c} = \frac{1}{5} \mu_0^2 \frac{\gamma_j^2 B^2 3974.4955 \beta^4}{(3k_B T)^2 R_{GdO}^6 \left(4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_2^2 \tau_c^2} \right)} \quad (54)$$

$$T_{1mO} = T_{1q} + T_{1d} + T_{1c} \quad (55)$$

$$T_{2mO} = T_{2q} + T_{2d} + T_{2c} \quad (56)$$

$$T_{2rO} = \ln \left(\frac{q^{SS}}{\frac{1}{T_{2mO}} + \frac{1}{k}} \right) \quad (57)$$

$$T_{1rO} = \ln \left(\frac{q^{SS}}{\frac{1}{T_{1mO}} + \frac{1}{k}} \right) \quad (58)$$

Význam jednotlivých parametrů

nezávisle proměnné

T	teplota v Kelvinech
B	magnetické pole v Tesla

závisle proměnné

$T_{1rO} = \ln(1/T_{1r})$	logaritmus redukovaných ^{17}O longitudinálních relaxačních rychlostí (druhá sféra)
$T_{2rO} = \ln(1/T_{2r})$	logaritmus redukovaných ^{17}O transversálních relaxačních rychlostí (druhá sféra)
$T_{2e\text{esr}} = 1/T_{2e}$	transversální elektronické relaxační rychlosti změřené EPR spektroskopii dělené 10^8
R_1	protonová relaxivita vztažená na 1 mM koncentraci

matematicky zpracovávané parametry

ΔH	aktivační enthalpie
^{298}k	konstanta rychlosti výměny vody
E_c	aktivační energie rotace
$^{298}\tau_c$	rotační korelační čas při teplotě 298 K
$^{298}\tau_v$	korelační čas pro ZFS (ZFS = Zero Field Splitting) modulaci, E_v je jeho aktivační energie
Δ^2	střední kvadratická energie ZFS
C^{OS}	konstanta vnější sféry
dg_L	odchylka od hodnoty g_L volného elektronu
$^{298}D_{\text{GH}}$	difúzní koeficient při teplotě 298 K, $E_{D_{\text{GH}}}$ je jeho aktivační energie
R_{GdO}	vzdálenost Gd–O
$\chi\sqrt{1 + \sqrt[3]{\eta^2}}$	člen zahrnující kvadrupolovou štěpící konstantou a asymetrický parametr

konstanty

R	univerzální plynová konstanta
k_B	Boltzmanova konstanta
h	Planckova konstanta
\hbar	$h/2\pi$
S	elektronový spin pro Gd
γ_j	jaderný gyromagnetický poměr
γ_H	protonový gyromagnetický poměr
β	Bohrův magneton
μ_0	permeabilita vakua
g_{Li}	isotropický Landého g -faktor
$\gamma_{eGd^{3+}}$	gyromagnetický poměr elektronového spinu Gd^{3+}
R_{GH}	efektivní vzdálenost mezi elektronovým spinem Gd a protony vody
a_{GH}	vzdálenost nejbližšího přiblížení protonů vody druhé sféry k Gd centru

další poznámky

ω_e	elektronová rezonanční frekvence
τ_{GH}	korelační čas pro difúzi protonů vody
$T_{sr} = (1/T_{ie})_{sr}$	příspěvek spinového rotačního mechanismu k elektronické relaxaci
ω_1	protonová Larmorova frekvence
R_1^{OS}	příspěvek vnější sféry k protonové relaxivitě
R_1^{IS}	příspěvek vnitřní sféry k protonové relaxivitě
$T_{1,2m}$	^{17}O relaxační čas vázané vody
T_{1d}, T_{1q}	dipól–dipolární a kvadrupolární příspěvek k T_1 relaxaci
ω_m	rozdíl chemických posunů mezi vázanou a volnou vodou
$T_{1e}, T_{2e}, T_{1mH}, T_{2m}, T_{1m}, T_{1q}, T_{1d}$	odpovídající relaxační časy pro rychlosti $1/T_{1e}, 1/T_{2e}$, atd
T_{1r}, T_{2r}	odpovídající relaxační časy pro přirozené logaritmy relaxačních rychlostí

Je to i shodou okolností, že teď píši poslední slova této diplomové práce...

Proto děkuji nejen lidem, kteří mě přivedli na tuto cestu, ale i těm, kteří mě svým méně vstřícným přístupem odvrátili od cesty jiné...

Největší dík ale patří mamince, tatínkovi, babičce a dědečkovi za jejich citlivý přístup i pevnou ruku...

Děkuji i mému příteli Honzovi, a to nejen za psychickou podporu...

Dále děkuji samozřejmě všem lidem, kteří přispěli ke zkompletování této práce...

Petru Hermannovi (školiteli)

Jakubovi Rudovskému (za obrovskou pomoc při zpracování výsledků z NMR měření)

Ivaně Císařové (za změření rentgenových struktur)

Joopu A. Petersovi (za pomoc při měření NMR experimentů)

Sophii Laurent a Robertu N. Mullerovi (za pomoc při měření ^1H NMRD profilů)

Carlosu F. G. C. Geraldsovi (za změření EPR dat)

Martině Malíkové (za provedení potenciometrických titrací)

...a všem z laboratoře č. „19“ za vytvoření příjemné atmosféry pracovního prostředí...