

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Mgr. David Kaliba

Využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu biologicky aktivních látek

Utilization of mass spectrometry for analysis of biologically active compounds

Disertační práce

Vedoucí práce/Školitel: doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Konzultant: RNDr. Martin Štícha, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 23. 6. 2018

Podpis

Disertační práce vznikla na základě výsledků získaných v letech 2014 – 2018 během mého postgraduálního studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Hlavova 5030, 128 43, Praha 2.

Školitel: doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.
Katedra analytické chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Konzultant: RNDr. Martin Štícha, Ph.D.
Sekční pracoviště chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Tato disertační práce byla podporována projekty SVV a projektem Norwegian Financial Mechanism CZ01116.

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Ivanu Jelínkovi, CSc. za ochotu, trpělivost, cenné rady a všestrannou pomoc během vypracovávání této disertační práce.

Dále bych rád poděkoval svému konzultantovi RNDr. Martinu Štíchovi, Ph.D. za věcné připomínky, náměty a pomoc při vyhodnocování hmotnostních spekter a RNDr. Janě Polákové za pomoc při syntetizování zkoumaných komplexů. Poděkování také patří všem ostatním členům Katedry analytické chemie UK za vytvoření příjemného prostředí.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině za podporu a trpělivost během studia.

Předmětová slova:

Analytická chemie, kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, organická analýza

Klíčová slova:

Rhenium, koordinační chemie, komplexy, protinádorová léčiva, aromatické ligandy, kapilární zónová elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, organokovové sloučeniny

Subject words:

Analytical chemistry, capillary electrophoresis, mass spectrometry, high performance liquid chromatography, organic analysis

Key words:

Rhenium, coordination chemistry, complexes, antitumor drugs, aromatic ligands, capillary zone electrophoresis, mass spectrometry, high performance liquid chromatography, organometallic compounds

Prohlášení o spoluautorství

Prohlašuji, že se Mgr. David Kaliba podílel na níže uvedených publikacích měrou uvedenou v závorkách.

[1] Štícha M., Jelínek I., Poláková J., Kaliba D.: Characterization of Rhenium(V) complexes with phenols using mass spectrometry with selected soft ionization techniques. *Analytical Letters* **48**, 2329-2342 (2015).

(20%)

[2] Štícha M., Kaliba D., Jelínek I., Poláková J.: Analytical study of rhenium complexes with pyrogallol and catechol. *Chemical Papers* **71**, 819-830 (2017)

(40%)

[3] Kaliba D., Štícha M., Jelínek I.: Synthesis and characterization of rhenium complexes of 1,2,3-trihydroxybenzene as potential antitumor agents. *Transition Metal Chemistry* **42**, 211-218 (2017)

(70%)

[4] Kaliba D., Štícha M., Jelínek I., Poláková J., Radová J.: Application of capillary electrophoresis to the separation of rhenium complexes of 1,2,3-trihydroxybenzene. *Monatshefte für Chemie* **148**, 1619-1624 (2017)

(80%)

.....
doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Abstrakt

Předložená disertační práce je komentovaným souborem čtyř publikací popisujících využití kapilární elektroforézy, kapalinové chromatografie a UV/Vis spektrometrie ke studiu komplexů rhenia s aromatickými ligandy. Ke strukturální charakterizaci jednotlivých komplexů byly využity metody hmotnostní spektrometrie s měkkými ionizačními technikami, ^1H a ^{13}C nukleární magnetické resonance a infračervené spektrometrie. Komplexy byly připraveny v reakcích rheniového prekursoru tetrabutylamonium tetrachlorooxorhenátu s odpovídajícím ligandem za aerobních i anaerobních podmínek. V průběhu výzkumu byla zjištěna nestabilita připravených komplexů (s Re v oxidačním čísle +V a +VI) a jejich přechod na jinou stabilnější formu ($\text{Re}^{+\text{VII}}$).

V průběhu výzkumu byly úspěšně realizovány následující dílčí projekty:

- Návrh a úspěšná realizace postupu syntézy vybraných rheniových komplexů s aromatickými ligandy 1,2-dihydroxybenzen, 1,2,3-trihydroxybenzen a 2,3-dihydroxynaftalen v reakcích bez přístupu vzduchu a s přístupem vzduchu a jejich strukturální charakterizace metodami ESI-MS, APPI-MS, LDI-MS, ESI-MS/MS, NMR a IR.
- ESI-MS SRM a UV/Vis časové studie chování primárně vzniklých rheniových komplexů ($\text{Re}^{+\text{V}}$) s aromatickými ligandy v reakční směsi v závislosti na přídavku triethylaminu jako akceleratoru reakce a přeměna komplexů na jinou stabilnější formu.
- Vývoj a úspěšná realizace postupu separace jednotlivých složek reakce metodou kapilární zónové elektroforézy v rozdílných základních elektrolytech o proměnlivé hodnotě pH. Sledování závislosti migračních časů jednotlivých složek reakční směsi v závislosti na pH základního elektrolytu. Analytická validace metody stanovení složek reakční směsi obsahující rheniový komplex s 1,2,3-trihydroxybenzenem.

Abstract

This PhD thesis provides a commented set of four publications. These publications are focused on capillary electrophoresis, liquid chromatography, and UV/Vis spectrometry used to study complexes of rhenium with aromatic ligands. The methods of mass spectrometry with soft ionization techniques, ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance, and infrared spectrometry were used for structural characterization of the individual complexes. The complexes were synthesized in reactions of the rhenium precursor tetrabutylammonium tetrachlororhenate with the corresponding ligand under both aerobic and anaerobic conditions. In the course of the research, it was revealed that the prepared complexes (with Re in the oxidation number +V and +VI) are unstable and their oxidation numbers change to another more stable form ($\text{Re}^{+\text{VII}}$).

Sub-projects which were successfully implemented during the research were as follows:

- Design and successful realization of the process of synthesis of selected rhenium complexes with aromatic ligands 1,2-dihydroxybenzene, 1,2,3-trihydroxybenzene, and 2,3-dihydroxynaphthalene in reactions with and without air access, and their structural characterization by ESI-MS, APPI-MS, LDI-MS, ESI-MS/MS, NMR, and IR.
- ESI-MS SRM and UV/Vis time studies of the behaviour of primary rhenium complexes ($\text{Re}^{+\text{V}}$) with aromatic ligands in the reaction mixture, depending on the addition of triethylamine as a reaction accelerator and the conversion of the complexes to another more stable form.
- Development and successful realization of the process of separation of the individual components of the reaction using the method of capillary zone electrophoresis in background electrolytes with a changing pH-value. Monitoring of the dependency of the migration time of the reaction mixture components on the pH-value of the background electrolytes. Analytical validation of the method for determining the components of the reaction mixture containing the rhenium complex with 1,2,3-trihydroxybenzene.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	10
2	ÚVOD.....	13
3	CÍLE PRÁCE	15
4	RHENIUM A JEHO KOMPLEXY	16
4.1	Nukleární medicína.....	16
4.1.1	Prvky využívané v nukleární medicíně.....	22
4.1.2	Radiofarmaka.....	24
4.1.3	Využití rhenia v radiodiagnostice.....	28
4.1.4	Příklady ligandů rheniových komplexů.....	32
4.2	Obecné metody stanovení rheniových komplexů.....	35
5	ANALÝZA KOMPLEXŮ RHENIA S AROMATICKÝMI LIGANDY	40
5.1	Charakterizace komplexů rhenia (V) s fenoly pomocí hmotnostní spektrometrie s měkkými ionizačními technikami (publikace I).....	40
5.1.1	Syntéza komplexů.....	40
5.1.2	Výsledky a diskuze – doplňkový komentář k publikaci.....	41
5.2	Analytická studie komplexů rhenia s aromatickými ligandy metodou UV/Vis spektrometrie a ESI-MS (komentář k publikaci II a III).....	64
5.3	Separace reakční směsi obsahující rheniové komplexy s aromatickými ligandy metodou kapilární zónové elektroforézy (komentář k publikaci IV)....	92
6	ZÁVĚR.....	104
7	SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFEREČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ	106
8	LITERATURA.....	108
9	PŘÍLOHY	130
9.1	Publikace I.....	130
9.2	Publikace II a III.....	148
9.3	Publikace IV.....	157

1 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

^1H NMR	vodíková nukleární magnetická resonance
^{13}C NMR	^{13}C uhlíková nukleární magnetická resonance
ACN	acetonitril
ACN-d ₃	deuterovaný acetonitril
ADP	adenosin difosfát
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (z anglického <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
API	aktivní farmaceutická substance (z anglického <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (z anglického <i>Atmospheric Pressure Photo Ionization</i>)
APPI-MS	hmotnostní spektrometrie s fotoionizací za atmosférického tlaku
ATP	adenosin trifosfát
Cat.	katechol (ligand 1,2-dihydroxybenzen)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (z anglického <i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
DAD	detekce pomocí diodového pole (z anglického <i>Diode Array Detection</i>)
DESI	desorpční ionizace elektrosprejem (z anglického <i>Desorption Electrospray Ionization</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EOF	elektroosmotický tok (z anglického <i>ElectroOsmotic Flow</i>)
ESI	elektrosprejová ionizace (z anglického <i>ElectroSpray Ionization</i>)
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
ESI-MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
Exp.	experimentálně získaná hodnota
EZ	elektronový záchyt
FAB	ionizace urychlenými atomy (z anglického <i>Fast Atom Bombardment</i>)

FD	ionizace polem (z anglického <i>Field Desorption</i>)
FLD	fluorescenční detektor
HEDP	1,1-hydroxydiethyliden difosfát
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (z anglického <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
$i; i_0$	intenzita signálu píků
IP	izomerní přechod
IR	infračervená spektrometrie (z anglického <i>InfraRed spectrometry</i>)
kal.	vypočtená hodnota
LDI	laserová desorpce/ionizace (z anglického <i>Laser Desorption/Ionization</i>)
LDI-MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací
LOD	limit detekce (z anglického <i>Limit Of Detection</i>)
LOQ	limit kvantifikace (z anglického <i>Limit Of Quantification</i>)
MALDI	laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (z anglického <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MIBI	metoxyisobutylisonitril
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
N	počet signálů produktový iontů ve vzorci indexu podobnosti
NMR	nukleární magnetická resonance
p -BA	<i>para</i> -bromanilin
PESI	elektrosprejová ionizace využívající jehly (z anglického <i>Probe Electrospray Ionization</i>)
PET	pozitronová emisní tomografie
PG	pyrogallol (ligand 1,2,3-trihydroxybenzen)
RNA	ribonukleová kyselina
RTG	rentgen, rentgenové záření

SCE	nasyčená kalomelová elektroda (z anglického <i>Saturated Calomel Electrode</i>)
SI	index podobnosti (z anglického <i>Similarity Index</i>)
SRM	záznam vybraných přechodů (z anglického <i>Selected Reaction Monitoring</i>)
TEA	triethylamin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV/Vis	spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra
v/v	objem podílu/objem celku (z anglického <i>volume/volume</i>)
Z	protonové číslo
α	záření alfa
β^+	záření beta plus
β^-	záření beta mínus
γ	záření gama
δ	chemický posun [ppm]
λ	vlnová délka [nm]
m/z	poměr hmotnosti a náboje (z anglického <i>mass/charge ratio</i>)
ppm	jedna miliontina celku (z anglického <i>Parts Per Million</i>)
R^2	interval spolehlivosti regresní přímky
t	čas [min]
$t_{1/2}$	poločas rozpadu [h]
Δt	časové intervaly [min]

2 ÚVOD

Nukleární medicína se řadí mezi rychle se rozvíjející medicínské obory schopné diagnostikovat buněčné nádorové bujení již v prvotním stádiu pomocí vhodných otevřených radioaktivních zářičů aplikovaných do těla pacienta. Výhodou současných metod nukleární medicíny je neinvazivnost, tedy prakticky absence jakýchkoli vedlejších účinků a většinou i nízká radiační zátěž. Vhodné diagnostické metody umožňují sledování funkčního stavu orgánů, jejich metabolické aktivity i na molekulární úrovni, zobrazení různé patologické léze (včetně primárních nebo sekundárních nádorů), zobrazení distribuce nádorových antigenů, hormonálních receptorů, neuroreceptorů, sledování aktivity zánětů a mnohé další zajímavé aplikace. Hlavní nevýhodou radiodiagnostických technik je nedostatečné zobrazení a vykreslení anatomických detailů jednotlivých orgánů a pochopitelně i nutnost práce s radioaktivními zářiči za přísně kontrolovaných podmínek [1].

Otevřený radiozářič (např. ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{131}I nebo ^{201}Tl) je do těla pacienta aplikován nejčastěji intravenózně. Vhodnou zobrazovací technikou (např. pozitronovou emisní tomografií) využívající gama kameru jako zobrazovací přístroj je detekována radiace vycházející z otevřeného radiozářičového indikátoru, která je následně převedena do snímkové podoby. Metabolicky aktivnější tkáň (rakovina) soustřeďují aktivní látku mnohem více než okolní zdravá tkáň a proto jsou na výsledném snímku více patrné. Nevýhodou v současné době nejvíce využívaného otevřeného radiozářiče ^{99m}Tc je jeho krátká doba poločasu rozpadu. Musí být připravován přímo před vlastní aplikací do těla pacienta, což s sebou nese rizika spojená s přípravou a vystavení personálu nemocnice nežádoucímu záření a nemalé finanční náklady spojené s nutným vybavením k práci s otevřenými radiozářiči [1].

V posledních několika letech se pozornost vědců zaměřila na radioaktivní izotopy jiných kovů (s technecií podobnými chemickými vlastnostmi) včetně rhenia, které má pro medicínské účely vhodné izotopy ^{186}Re a ^{188}Re . Rheniové izotopy vykazují jisté podobnosti s techneciovými analogy a mají navíc delší poločasy rozpadu umožňující přípravu na specializovaných pracovištích mimo nemocniční pracoviště. Podobnost mezi techneciovými a rheniovými analogy je dána jejich pozicí v periodické tabulce i jejich jadernými vlastnostmi, nicméně predikce chování rheniových preparátů na základě znalosti techneciových analogů bez podrobnějších chemických a klinických

studií není možná [2]. Fyzikálně chemické vlastnosti (velikost, lipofilita atd.) komplexů rhenia a technecia se stejnými ligandem jsou v některých případech podobné. Tato analoga nicméně vykazují i několik odlišností (např. rhenium v komplexech je mnohem obtížněji redukovatelné), které mohou vést k odlišné distribuci v lidském těle. [3]. V posledních několika letech se soustřeďuje výzkum na využití izotopů rhenia zejména k diagnostikování rakoviny kostní tkáně.

Na rozdíl od většiny ostatních léčiv jsou radiofarmaka často podávána ve formě reakčních směsí bez předchozí izolace účinné látky. Před vlastní aplikací do těla pacienta je nutno znát konkrétní složení této reakční směsi včetně zastoupení nezreagovaných výchozích látek, požadovaného produktu reakce a všech vznikajících vedlejších a degradačních produktů. Složky reakčních směsí při přípravě rheniových komplexů je možné stanovit mnoha analytickými metodami v závislosti na parametru měření: změna oxidačního stavu rhenia (elektroanalytické, spektrometrické metody), monitorování složení reakční směsi a zastoupení jednotlivých složek reakce (vysokoučinná kapalinová chromatografie, kapilární zónová elektroforéza) případně určení čistoty a analýza produktů (tenkovrstvá chromatografie, hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická resonance, infračervená spektrometrie). Hmotnostní spektrometrie s měkkými ionizačními technikami (ESI, APPI, APCI nebo LDI) patřící do skupiny nedestruktivních metod je vhodná ke studiu struktury výsledných komplexů a monitorování složení reakční směsi. Dobrá znalost doby stálosti rheniového komplexu, struktur degradačních produktů a jednoduchá příprava jsou důležité pro případné budoucí využití rheniových izotopů v nukleární medicíně.

3 CÍLE PRÁCE

Tato disertační práce si klade za cíl rozšířit spektrum analytických metod vhodných pro kvantifikaci a strukturní charakterizaci organometalických komplexů rhenia s aromatickými ligandy. Bude prostudována možnost využití hmotnostní spektrometrie s měkkými ionizačními technikami pro strukturní charakterizaci vznikajících komplexů. Bude prostudována možnost separace a kvantifikace jednotlivých složek reakční směsi při přípravě komplexů metodou kapilární zónové elektroforézy.

Konkrétní dílčí cíle disertační práce jsou následující:

- Optimalizovat postupy přípravy vybraných komplexů rhenia s organickými aromatickými ligandy (1,2-dihydroxybenzen, 1,2,3-trihydroxybenzen a 2,3-dihydroxynaftalen);
- Prostudovat možnosti strukturální charakterizace připravených rheniových komplexů metodou hmotnostní spektrometrie s využitím měkkých ionizačních technik (elektrosprejové ionizace, chemická a foto ionizace za atmosférického tlaku a laserové desorpční ionizace);
- Charakterizovat produkty následných reakčních přeměn připravených rheniových komplexů v aerobních podmínkách metodami hmotnostní spektrometrie a UV/Vis spektrometrie;
- Vyvinout, optimalizovat a částečně validovat metodu kapilární zónové elektroforézy a zhodnotit separační metodu z hlediska dosažené separační účinnosti, citlivosti detekce, doby analýzy a dalších běžných validačních parametrů.

4 RHENIUM A JEHO KOMPLEXY

4.1 Nukleární medicína

Nukleární medicína patří mezi nejrychleji se rozvíjející samostatné medicínské obory. Principiálně se zabývá diagnostikou a léčbou nádorového bujení prostřednictvím cílené aplikace zdroje ionizujícího záření (otevřeného radioaktivního zářiče) do těla pacienta.

Historie nukleární medicíny se začala psát prvním publikováním využitelnosti RTG záření Wilhelmem Conradem Röntgenem roku 1895. Pokusy ohledně RTG záření byly prováděny asi od 50. let 19. století, ale až Röntgenovi (prvnímu nositeli Nobelovy ceny za fyziku) se podařilo využít toto neznámé záření (Röntgenem pojmenováno jako záření X) k zobrazovacím technikám. Na Röntgenovu práci navázal téhož roku Thomas Alva Edison vynálezem fluoreskopu využívajícího fluorescence určitých materiálů po vyjmutí z RTG pole [1]. Do lékařského odvětví se RTG záření dostalo v roce 1908 díky Johnu Hall-Edwardsovi a jeho založení lékařského oboru ozařovací terapie [2]. Začátek nukleární medicíny se datuje mezi roky 1934 a 1946, kdy byla objevena radioaktivita určitých izotopů prvků a průmyslová výroba radionuklidů stabilních prvků, přestože již v roce 1913 György Hevesy úspěšně použil radionuklid jako značkovací chemických procesů [3]. Za tento objev mu byla v roce 1943 udělena Nobelova cena. Od 50. let 20. století, kdy byla vynalezena scintilační kamera (Hall O. Anger) a přímočarý skener (Benedict Cassen), je nukleární medicína využívána pro chirurgická, nefrologická, endokrinologická fyziologická a jiná lékařská vyšetření [4]. V roce 1971 byla nukleární medicína uznána jako samostatná lékařská specializace Americkou lékařskou asociací, čím se dostává do povědomí většiny lékařů [5].

Diagnostické metody se v nukleární medicíně dělí na *in vivo* (asi 95 % všech vyšetření) a *in vitro*. Mírou využití *in vivo* metod se nukleární medicína odlišuje od ostatních zobrazovacích technik využívajících vnějších zdrojů RTG záření. Záření emitované diagnostickými radiofarmaky je mnohdy mnohonásobně nižší než dávka obdržená při RTG diagnostice. Lze tedy detailně vyšetřit velmi náchylné oblasti a to bez nutnosti invazivního zásahu nebo chirurgického zákroku. Nukleární medicínu a její zobrazovací techniky lze pokládat za nejbezpečnější způsob diagnostiky primárních a sekundárních nádorů z pohledu radiační zátěže pacienta [6].

Nukleární medicína je samostatným medicínským oborem navazujícím na další klinické obory (kardiologie, neurologie nebo onkologie). Metody nukleární medicíny jsou založeny na indikátorovém (stopovacím) principu aplikovaného radionuklidu. Po zakoncentrování radionuklidu mohou být vhodnou zobrazovací technikou diagnostikovány primární i sekundární nádory. Primární nádor vzniká prvotně v určitém orgánu (např.: primárním nádorem plic je bronchogenní karcinom), jako sekundární nádor určitého orgánu se označují metastázy pocházející z nádoru v jiné části těla [7].

Jako nádor se obecně označují shluky buněk rostoucí samostatně bez řízení organismu. Nádory mohou vzniknout v jakékoliv tkáni, nejčastěji ale vznikají ve tkáních, kde se nejvíce množí buňky (dýchací soustava, trávicí soustava) anebo s největší stimulací buněk hormony (prostata, vaječníky, prsy) [8]. Rakovinové buňky jsou charakterizovány svou schopností růst i bez přítomnosti většiny růstových faktorů, neschopností odpovídat na signály omezujícího jejich růst, omezenou citlivostí vůči obrannému mechanismu programované buněčné smrti, teoreticky neomezenou schopností dělení a schopností šíření se i do vzdálených tkání [9].

Mezi nejčastější faktory ovlivňující vznik a vývoj rakovinového bujení je možné zařadit:

1. dědičnost

Vliv poškozených genů zděděných po rodičích, kdy je zárodečná mutace přenesena již pohlavními buňkami a byla by tedy obsažena ve všech buňkách dítěte, je poměrně vzácná (nastává asi v 5 - 10 % nádorových onemocněních). Týká se zejména nádorových onemocnění diagnostikovaných již ve velice útlém věku dítěte (např. nádory oka nebo dětské nádory ledvin). Jsou však známé případy tzv. „nádorových rodin“ v jejichž rodokmenu je možné vysledovat určité typy nádorů pravidelně se objevujících přes několik generací.

2. ionizující záření

Ionizující záření je zodpovědné asi za 5 % všech úmrtí spojených s nádorovým onemocněním. Většinou se jedná o expozici přírodnímu záření. Nejvýznamnějším zástupcem je v přírodě běžně se vyskytující radon a jeho rozpadové produkty.

3. UV záření

UV záření je spojené se vznikem většiny melanomů (nádorových onemocnění kůže). Při snížení frekvence záměrného slunění a používání ochranných pomůcek je možné snížit možnost vzniku melanomu na minimum.

4. výživa

Strava je asi nejčastějším faktorem, podílejícím se na vzniku nádorového bujení. Jako typický příklad je možné použít rakovinu tlustého střeva, která řadí Českou republiku na první místo v celosvětovém měřítku pacientů s tímto onemocněním na 100 000 zdravých jedinců. Jako problematické se jeví nadměrné solení, přejídání, nedostatek čerstvých potravin, nadbytečný příjem masa nebo nadbytek smažených a jinak na oleji upravených jídel [10].

Dalšími faktory ovlivňujícími vznik nádorových onemocnění, jsou zejména kouření, konzumace alkoholu, elektromagnetické záření, viry, bakterie nebo nechráněný sexuální život (spojený zejména s karcinomem děložního čípku) [10, 11].

Léčba již propuklých nádorových onemocnění je závislá na době, kdy byl karcinom objeven, tedy, v jakém stádiu nemoci se pacient nachází. Léčebný proces je rozdělen do dvou fází: fáze diagnostikování nádorového onemocnění a fáze terapeutické. Strategie léčby (terapie) závisí na biologickém charakteru nádoru, na jeho velikosti a lokalizaci a na věku a celkovém stavu pacienta [12]. Terapeuticky lze nádorová onemocnění řešit pomocí tří léčebných záměrů:

1. kurativní záměr

Cílem léčby je nemocného vyléčit. Jako kritérium úspěšnosti použité léčby je přežití pacienta bez návratu onemocnění po určitou dobu. U většiny nádorů se jako úspěšná léčba pokládá doba bez návratu onemocnění alespoň po 5 let, u pomalu rostoucích nádorů pak po 10 let.

2. paliativní záměr

Cílem léčby je nemocného zbavit projevů onemocnění a zpomalit nebo úplně zastavit růst nádorového onemocnění. Nádor nicméně není možné z těla pacienta odstranit úplně. Nemocný pak může žít kvalitním životem ještě po několik let nebo desetiletí.

3. symptomatický záměr

Pacient se již nachází v takovém stavu, že vyléčení není možné a nedá se ani zastavit postup onemocnění. Jedná se zejména o onemocnění spojená s maligními nádory. Základem léčby je snaha o udržení kvality života, tišení případné bolesti a řešení komplikací spojených s růstem nádoru [13-15].

Léčba nádorového onemocnění (pro kurativní záměr léčby) je prováděna zejména chirurgicky (metoda se stále největší nadějí na úplné vyléčení), chemoterapeuticky (léčba vysokou dávkou cytostatik předpokládající větší citlivost nádorových buněk k toxickému poškození vyvolanému podáním cytostatika), radioterapeuticky (léčba ionizujícím zářením), termoterapeuticky (likvidace nádorového onemocnění pomocí tepla), imunoterapeuticky (cílená stimulace imunitního systému pacienta), hormonálně (podání látek tlumících účinek některých hormonů) nebo pomocí biologických látek (ovlivnění nádorového bujení na buněčné úrovni pomocí zásahu do životního pochodu buňky) [16, 17].

Lokalizace, rozsah či charakter nádoru jsou určeny diagnostickými metodami. Diagnostika předchází terapeutickému procesu a od jejího výsledku se odvíjí následně použitá terapeutická metoda. Cílem diagnostického procesu je v první řadě zjistit, zda je v těle pacienta přítomen nádor. Po prokázání rakovinového bujení v organismu je důležitá charakterizace nádoru, zda se jedná o maligní, potencionálně maligní nebo benigní nádor [18]. Nádorová onemocnění jsou diagnostikována pomocí základních skupin metod:

1. metody biochemické

Využívají vyšetření krve, moči nebo stolice na určení zastoupení jednotlivých nádorových markerů v odebraném vzorku. Jako příklad může být test na množství krve obsažené ve stolici, které může indikovat rakovinu tlustého střeva. Obsáhlý přehled markerů byl publikován v [19, 20].

2. metody genetické

Předmětem výzkumu jsou změny v molekule DNA signalizující narušení buněk na genetické úrovni.

3. metody bioptické

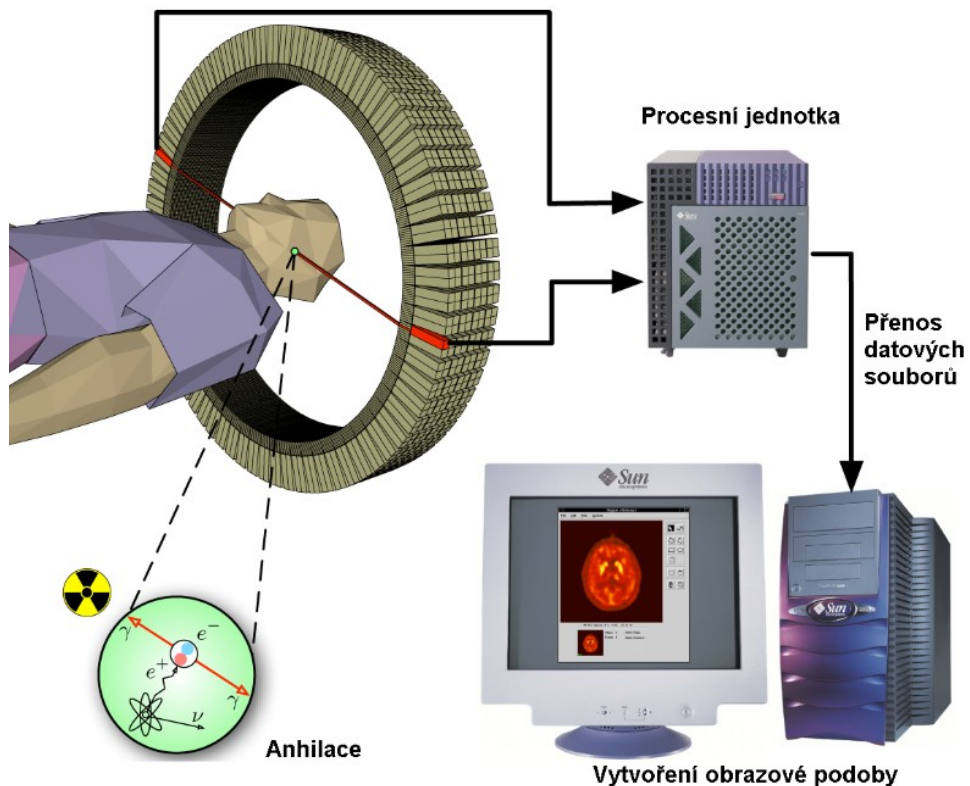
Zahrnují odběr tkáně pacienta pomocí bioptické jehly a její následné zkoumání pod mikroskopem (histologie).

4. metody cytologické

Sledují přítomnost nebezpečných buněk ve vzorcích tělních tekutin (zejména mozkomíšní mok nebo výpotek).

5. metody zobrazovací

Hledají přítomnost nádorového onemocnění pomocí rentgenových a jim podobných snímků [21-23]. Princip pozitronové emisní tomografie (PET) je znázorněn na obrázku 4.1.

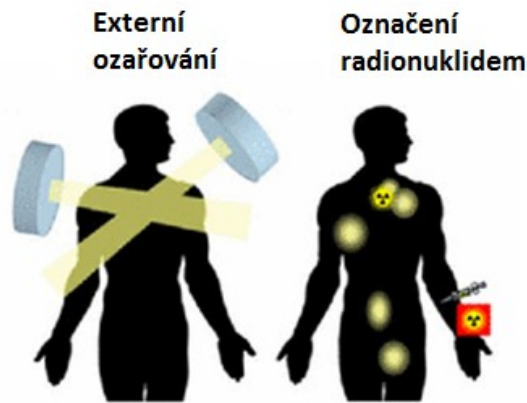


Obr. 4.1 Schéma vyšetření mozku pomocí pozitronové emisní tomografie (převzato z [24], upraveno)

Diagnostické metody zobrazovací (PET, radiodiagnostika nebo hybridní metody zobrazování) jsou založeny na aplikaci radiofarmaka s krátkým poločasem rozpadu a jeho následném stopování (indikaci) v těle pacienta [8]. Principem PET je lokalizace místa rozložení radiofarmaka po jeho aplikaci a následném zakoncentrování zejména v místě rakovinového bujení vykazujícího větší metabolickou aktivitu než zdravá tkáň. Po zakoncentrování radiofarmaka následuje postupné rozložení nuklidu kovu obsaženého v aplikovaném radiofarmaku doprovázené uvolněním pozitronů. Pozitrony reagují ihned s elektrony z okolní tkáň za vzniku dvou fotonů záření gama. Vzniklé fotony odlétají z místa vzniku v opačném směru v téměř dokonalé přímce, díky čemuž je možné vhodnou zobrazovací technikou přesně lokalizovat místo výskytu nádoru [24]. Radioizotopy aplikované do těla pacienta podléhají v organismu stejné chemické cestě (stejnému metabolismu) jako neradioaktivní stabilní izotop téhož prvku. Díky této vlastnosti je možný výzkum metabolismu daného farmaka v laboratorních podmínkách na neradioaktivním izotopu bez ohrožení vědeckých pracovníků [25].

Zatímco klasické zobrazovací metody (RTG, magnetická resonance) zobrazují pouze anatomickou strukturu vyšetřovaných tkání, diagnostické zobrazovací metody mají možnost také sledovat fyziologické a biologické změny patologického ložiska a porovnat je s okolní tkání zcela neinvazivním postupem. Mohou tedy odhalit případné nemoci již v raném stádiu vývoje. Díky neinvazivnímu způsobu léčby je nukleární medicína vhodná i pro pediatrická vyšetření pacientů v kojeneckém věku. Metodami nukleární medicíny je možné sledovat vylučovací funkci ledvin, pumpování krve srdcem nebo zakoncentrování jódu ve štítné žláze [26].

Výhoda označení nádoru pomocí radiofarmaka oproti klasickému RTG ozařování je naznačena na obrázku 4.2.



Obr. 4.2 Srovnání klasického externího RTG vyšetření s cíleným vyšetřením pomocí radiofarmak (převzato z [27], upraveno)

Z obrázku 4.2 je patrné, že oproti klasickému RTG zobrazení, které ozáří širokou oblast lidského těla a může tedy negativně ovlivnit i zdravé lidské buňky, označení nádoru pomocí radiofarmaka nepředstavuje téměř žádné riziko pro zdravé buňky. Vzhledem k tomu, že nádorová buňka vykazuje řádově vyšší metabolické pochody než buňka zdravá, dochází téměř výlučně k zakoncentrování radiofarmaka právě do těchto buněk. Nepatrné množství, které se dostává do zdravých buněk, je oproti ozáření RTG zářením téměř zanedbatelné.

4.1.1 Prvky využívané v nukleární medicíně

Prvky se v přírodě vyskytují většinou jako směs různých izotopů (různých nuklidů stejného prvku). Nuklidy prvků se schopností samovolné radioaktivní přeměny jader jsou označovány jako radionuklidy. Během přeměny jádra radionuklidu dochází k uvolnění přebytečné energie buď ve formě vytvoření nových částic (radioaktivita) nebo jejím uvolněním do elektronu v atomovém obalu. Během rozpadu tedy dochází k uvolnění alfa částice, subatomární částice nebo radioaktivního záření gama. Mezi příklady využití prvků vykazujících radioaktivitu můžeme zařadit použití v technice (jaderné elektrárny, odhalování skrytých vad materiálů, měření tloušťky materiálů), archeologii (radioizotopová metoda určení stáří nálezů pomocí izotopu ^{14}C), zemědělství (šlechtitelství, ochrana skladovaných potravin), vojenství (jaderná bomba) a především lékařství [27]. Každý radionuklid má svůj charakteristický poločas rozpadu, druh přeměny a aktivitu.

K radiodiagnostickým vyšetřením je možné využít radionuklidy mnoha prvků. Stručný přehled používaných radionuklidů včetně jejich poločasu rozpadu, druhu přeměny, energie záření a příkladu použití jsou uvedeny v tabulce 4.1 [27, 28]. Pod zkratkami jsou uvedeny jednotlivé druhy při přeměně vysílaného záření: záření alfa (α), záření beta plus (β^+) a beta minus (β^-), záření gama (γ), elektronový záchyt (EZ) a izomerní přechod (IP).

Tab. 4.1 Příklady radionuklidů využívaných v medicíně včetně jejich poločasu rozpadu, druhu přeměny, energie záření a příkladu využití používaných v nukleární medicíně. Zkratky EZ a IP označují přechody elektronovým záchytem (EZ) a izomerním přechodem (IP) [27, 28].

Radionuklid	Poločas rozpadu	Druh přeměny	Energie záření	Lit.
^{11}C	20 min.	β^+ , pozitrony	0,96 MeV	[29]
^{13}N	10 min.	β^+ , pozitrony	1,19 MeV	[30]
^{15}O	2 min.	β^+ , pozitrony	1,73 MeV	[31]
^{18}F	110 min.	β^+ , pozitrony	0,64 MeV	[32]
^{32}P	14,3 dne	β^+ , β^-	1,71 MeV	[33]
^{51}Cr	27,7 dne	EZ, γ	320 keV	[34]
^{57}Co	272 dne	EZ, γ	122 keV	[35]
^{67}Ga	78 hod.	EZ, γ	91; 185; 300 keV	[36]
^{68}Ga	68 min.	β^+ , pozitrony	1,90 MeV	[37]
$^{81\text{m}}\text{Kr}$	13,3 sec.	IP, γ	190 keV	[38]
^{82}Rb	1,3 min.	β^+ , pozitrony	3,15 MeV	[39]
^{89}Sr	50,5 dne	β^+ , β^-	1,49 MeV	[40]
^{90}Y	64 hod.	β^+ , β^-	2,28 MeV	[41]
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 hod.	IP, γ	140 keV	[2]
^{99}Mo	67 hod.	β^+ , β^- , γ	1,21 MeV	[42]
^{111}In	2,8 dne	EZ, γ	171; 245 keV	[43]
^{123}I	13 hod.	EZ, γ	157 keV	[44]
^{125}I	60 dnů	EZ, γ	35 keV	[45]
^{131}I	8 dnů	β^+ , β^- , γ	80; 284; 600 keV	[46]
^{133}Xe	36,4 dne	EZ, γ	172; 203 keV	[47]
^{153}Sm	47 hod.	β^+ , β^- , γ	103; 630; 700 keV	[48]
^{186}Re	90,6 hod.	β^+ , β^- , γ	1,07 MeV	[2]
^{201}Tl	73 hod.	IP, γ	78; 167 keV	[49]
^{211}At	7,2 hod.	α	5,87 MeV	[50]
^{212}Bi	1,01 hod.	α , β^+ , β^-	6,09; 2,25 MeV	[51]
^{223}Ra	11,4 dne	α	5,75 MeV	[52,53]

* Tučně je zvýrazněn nejpoužívanější radionuklid $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Z tabulky 4.1 je patrná využitelnost technecia pro lékařské účely. Energie emitovaného záření je dostatečně velká, aby nebyla příliš odstíněna okolními orgány nebo tkáně (je snadno detekovatelná), a relativně krátký poločas rozpadu nezatěžuje organismus v dlouhém časovém úseku.

Jednotlivé radionuklidy výše vyjmenovaných kovů nachází své uplatnění v rozdílných radiodiagnostických metodách v závislosti na zkoumaném orgánu. Některé orgány potřebují dlouhý poločas rozpadu izotopu, aby se do něj radionuklid dostal a mohl se v něm zakonzentrovat, jinými radionuklid naopak rychle prochází do dalších částí těla.

4.1.2 Radiofarmaka

Radiofarmaka jsou medicínské přípravky skládající se s radionuklidu (účinná látka) navázaného na neradioaktivní vhodný nosič (farmakum, voleno na základě chování a specifické distribuce v organismu) se specifickou farmakokinetikou zajišťující správné místo akumulace. Podle českého lékopisu dostupného na internetových stránkách Státního ústavu pro kontrolu léčiv jsou jako radiofarmaka označeny jakékoliv léčivé přípravky, které, když jsou připraveny k podání, obsahují jeden nebo více radionuklidů (radioaktivních izotopů) a jsou určeny k léčebným nebo diagnostickým účelům [54]. Oproti jiným léčivům je možná změna obsahu látku nesoucí vlastní účinek přípravku. Zvolená radiofarmaka jsou do těla pacienta dávkována ve stopovém množství (nano- a pikomolární koncentrace 10^{-9} - 10^{-12} mol dm^{-3} , hmotnostně asi 10^{-10} - 10^{-14} gramů), aby nedocházelo k ovlivnění funkce jednotlivých orgánů ani okolní tkáně [55].

Radionuklidy jsou děleny podle doby rozkladu, druhu záření (α , β^+ , β^- nebo γ) a vysílané energie (eV, keV, MeV) ionizujícího záření. Radiofarmaka s α zářiči nejsou v klinické praxi příliš využívána, β zářiče jsou používány pro terapeutické účely a γ zářiče v metodách *in vivo* diagnostiky. V závislosti na době přeměny jsou radionuklidy připravovány hromadně v lékárenských koncernech (dny až týdny) nebo přímo na klinickém pracovišti (minuty, hodiny) těsně před aplikací do těla pacienta [56]. Vyráběny jsou v cyklotronech (^{111}In , ^{67}Ga , ^{123}I , ^{11}C), jaderných reaktorech (^{99}Mo , ^{131}I , ^{51}Cr) nebo jsou získávány jako dceřiné produkty z radionuklidových generátorů ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). Oproti jiným léčivům se radiofarmaka vyznačují s časem exponenciálně klesající koncentrací účinné látky vlivem radioaktivní přeměny radionuklidu na jiný prvek [55].

Jako nosiče jsou využívány chemicky a biologicky aktivní látky anorganických solí, molekul organických látek nebo složek krve, peptidy a protilátky [57]. Obecně lze diagnostická a terapeutická radiofarmaka rozdělit do dvou skupin podle použitého nosiče. První skupina zahrnuje složitější biomolekuly (např. monoklonální protilátky, peptidy nebo oligonukleotidy) tvoří tzv. cílicí skupiny. Tyto cílicí skupiny jsou následně obohaceny malými organickými molekulami obsahujícími již zabudovaný radionuklid a po vpravení do těla pacienta napomáhají vizualizaci např. nádorů se specifickými receptory ve své buněčné membráně ($[^{111}\text{In}]$ pentetreotid) [58].

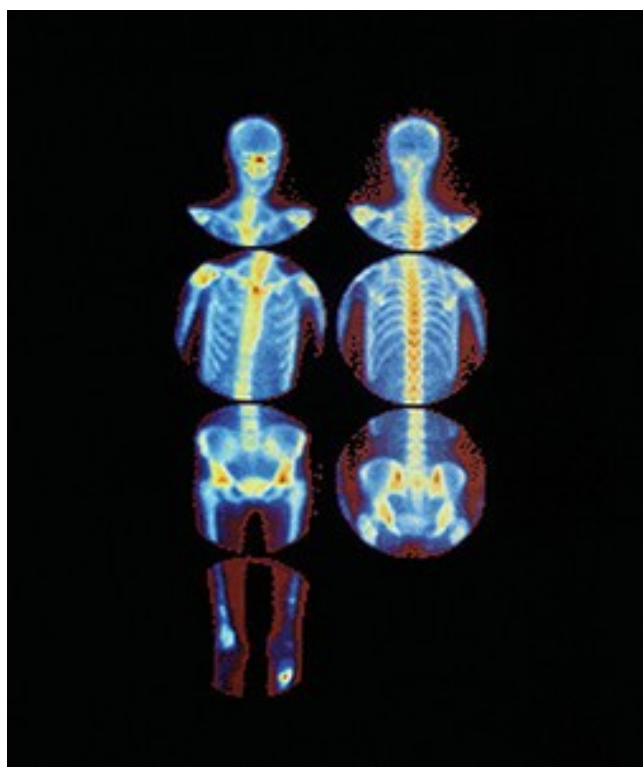
Druhou skupinou jsou pak molekuly radiofarmak často odvozené ze zavedených léčiv nebo přírodních látek, jež jsou většinou značeny záměnou jednoho z atomů za odpovídající radioaktivní izotop (např. $[^{11}\text{C}]$ cholin) nebo za izotop jiného prvku neobsaženého v původní molekule ($[^{18}\text{F}]$ cholin) [59]. Příkladem využití druhé skupiny radiofarmak může být zobrazení nádorů založených na nespecifických mechanismech. Mezi taková zobrazení patří použití $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ MIBI (MIBI = metoxyisobutylisonitril) jako lipofilního kationtu akumulovaného v mitochondriích viabilních buněk na základě potenciálového rozdílu na membráně mitochondrií [60-62]. Vyšší akumulace je typická pro metabolicky aktivnější buňky (nádor).

Podle fyzikální struktury můžeme radiofarmaka rozdělit na pravé roztoky, koloidní disperze, suspenze nebo plyny. Nejčastěji se radiofarmaceutické přípravky podávají parenterálně, intravenózně (pravé roztoky, suspenze, disperze), subkutánně (disperze) nebo intralumbálně (roztoky nebo plyny) [63]. Radiofarmaka se z 93 % využívají k diagnostickým účelům (zobrazení distribuce, metabolismu v cílových orgánech, posouzení poruch obvyklé farmakokinetiky) a ze 7 % jsou využívána k přímé terapii lokálním ozářením postiženého orgánu specifickým radiofarmakem. Nejvíce využívané radiofarmakum obsahující technecium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ jako účinnou látku je podáváno injekčně.

Technecium $^{99\text{m}}$ bylo objeveno v roce 1938 při ostřelování molybdenu 99 . Tento způsob přípravy byl zachován v komerčních aplikacích do dnešních dnů, protože je neekonomičtější. Výroba technecia je rozdělena do několika kroků a bohužel neplatí, že by se v jednom podniku ozářil uran za vzniku odpovídajícího $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radiofarmaka transportovaného do nemocnice k dalšímu využití. Celý proces výroby je komplikován krátkým poločasem rozpadu $^{99\text{m}}\text{Tc}$, který činí 6 hodin. Kvůli krátkému poločasu rozpadu není možné technecium skladovat po delší dobu a tedy i přepravovat na velké

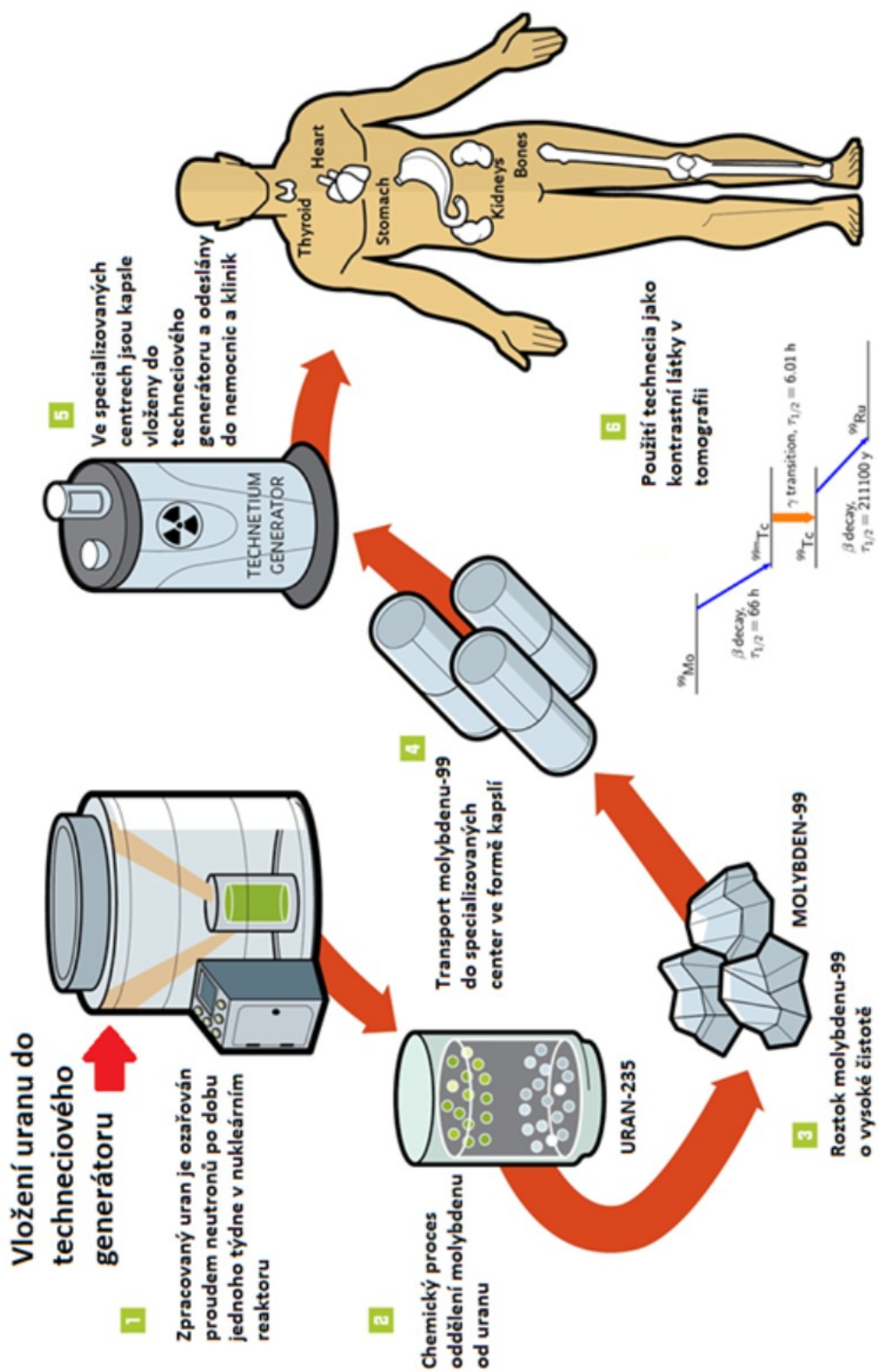
vzdálenosti. Proto je nejdříve v reaktoru ozářen vysoce obohacený uran ^{235}U za vzniku izotopu ^{99}Mo s poločasem rozpadu 66 hodin, umožňujícího transport a krátkodobé přechovávání. V jiném zařízení umístěném poblíž nemocnice potom probíhá přeměna molybdenu 99 na technecium $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Tomografický záznam vyšetření kostní tkáně pomocí $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radioizotopu je ukázán na obrázku 4.3. Červené části zvýrazňují oblast výskytu nádorového onemocnění.



Obr. 4.3 Tomografie kostní tkáně po aplikaci radiofarmaka s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (převzato z [64]).

Schématické zobrazení přípravy techneciového radionuklidu v molybdenovém generátoru z izotopu molybdenu 99 je ukázáno na obrázku 4.4. Podobná příprava se uplatňuje i v případě rheniového radionuklidu.



Obr. 4.4 Příprava techneciového radiofarmaka z uranu 235 (převzato z [64], upraveno).

V současné době jsou radiofarmaka většinou dodávána do nemocničního pracoviště ve formě „kitových přípravků“, ze kterých se po přidání radionuklidu připraví značené radiofarmakum o potřebné kvalitě s efektivitou značení obvykle vyšší než 95 %.

Oproti diagnostické nukleární medicíně terapeutická nukleární medicína využívá radioaktivního izotopu aplikovaného do těla pacienta z důvodu léčení rakoviny nebo kontroly nad rakovinovými symptomy. Jako terapeutické radionuklidy využíváme nuklidy s vysokou aktivitou a nízkým dosahem záření (^{131}I , ^{90}Y , ^{89}Sr). Radionuklidy jsou specificky vychytávány rakovinovou tkání a prodělávají nejčastěji β přeměnu [63]. Příkladem terapie pomocí nukleární medicíny může být léčba nádoru štítné žlázy využívající schopnosti štítné žlázy intenzivně vychytávat jód (používá se ^{131}I), léčení kostní metastázy (^{89}Sr , ^{153}Sm , ^{186}Re) nebo prodloužení života pacientů s rezistentním karcinomem prostaty (^{223}Ra).

4.1.3 Využití rhenia v radiodiagnostice

Rhenium patří mezi stříbrobílé vzácné, tvrdé a těžké kovy s vysokou odolností, jehož existenci předpověděl Dimitrij Ivanovič Mendělejev při vytváření své periodické tabulky prvků. Mendělejev nazval neznámý prvek dwi-mangan, protože měl mít podobné vlastnosti jako mangan. První nepřímá zmínka o objevení rhenia pochází již z roku 1908, kdy japonských vědec Masataka Ogawa zkoumal minerály thoria ze Srí Lanky a našel v pásech atomové spektrometrie neznámý prvek. Mylně se domníval, že se jedná o již známý mangan a proto objevu nevěnoval patřičnou pozornost a objevení nového prvku nepublikoval.

Rhenium bylo objeveno německými vědci Walterem Noddackem, Idou Tacke-Noddackovou a Otto Carl Bergem jako jeden ze vzácnějších elementů v zemské kůře RTG spektroskopii v roce 1925 jako stopová příměs v platinových rudách a minerálech kolumbit, gadolinit a molybdenit. Z prvků tvořících stabilní izotopy bylo rhenium objeveno jako poslední. Stejně jako většina kovů těžších než železo, je rhenium produktem výbuchu supernovy [65].

V roce 1928 se Noddackovi s Bergem podařilo úspěšně izolovat 1 g čistého rhenia zpracováním 660 kg molybdenitu. V zemské kůře činí průměrný obsah rhenia pouze 1 – 5 ng na kilogram zeminy, většinou jako příměs v minerálu molybdenit. V přírodě

se rhenium volně vyskytuje jako směs neradioaktivního stabilního nuklidu ^{185}Re (37,4%) a radioaktivního nuklidu ^{187}Re (62,6%) s poločasem rozpadu $4,12 \cdot 10^{10}$ let přecházejícím β rozpadem na osmium 187 [66]. Podíl radioaktivního izotopu je tedy téměř dvakrát vyšší než stabilního izotopu. Toto zvláštní chování v přírodě vytváří po rheniu pouze osmium. Po uhlíku a wolframu má rhenium třetí nejvyšší bod tání (3186 °C), díky čemuž patří mezi nejhůře tavitelné prvky. Název rhenia je odvozen od latinského názvu řeky Rýn = *Rhenus* odkud objevitelé pocházeli.

Další vlastnosti rhenia shrnuje tabulka 4.2.

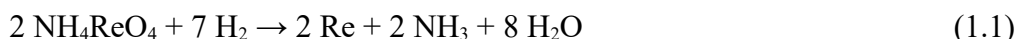
Tab. 4.2 Vlastnosti rhenia [66, 67]

Atomové číslo	75
Atomová hmotnost	186,207
Paulingova elektronegativita	1,9
Elektronová konfigurace	[Xe] 4f ¹⁴ 5d ⁵ 6s ²
Teplota varu [°C]	5596
Hustota při 20 °C [g cm⁻³]	21,02
Mohrova tvrdost	7,0
Atomový poloměr [pm]	188
Kovalentní rádius [Å]	1,41
Počet stabilních izotopů	2
Počet nestabilních izotopů	27
Ionizační energie do 1. stupně [kJ mol⁻¹]	755,82

Většina rhenia (více jak 80 %) se využívá jako přísada do vysokoteplotních slitin wolframu a molybdenu pro letecké motory nebo do platino-rheniových katalyzátorů využitelných v rafinářském průmyslu při výrobě vysokooktanových benzínů. Nachází se také v tepelně namáhaných součástkách, např. jako součást žárovkových vláken nebo jako součást supravodivých materiálů.

Na vzduchu je rhenium odolné vůči vzdušné oxidaci, mnohem reaktivnějším se stává v práškové podobě nebo podobě porézní houby. Při zahřívání v kyslíku hoří na molekulu Re_2O_7 , v kovové podobě se výborně rozpouští v oxidujících kyselinách.

V přírodě se rhenium většinou nevyskytuje v čistém stavu v podobě minerálů nebo rud, proto se nejčastěji získává rafinací polétavého prachu molybdenových koncentrátů nebo termickým rozkladem rhenistanu amonného podle rovnice (1.1) [66]:



Jediným popsaným minerálem rhenia je rhenit (ReS_2), který byl nalezen v roce 1994 v sopce Kudriavy na Kurilových ostrovech. Roční světová produkce rhenia se pohybuje mezi 40 - 50 tunami, přičemž největšími výrobci jsou Čile, Spojené státy americké, Peru a Polsko. Ve sloučeninách se rhenium vyskytuje nejčastěji v oxidačních stavech Re^{+II} , Re^{+IV} , Re^{+V} a Re^{+VII} , i když výjimkou nejsou ani oxidační stavy Re^{-I} , Re^{+I} či Re^{+VI} [67]. Kyselina rhenistá patří mezi silné kyseliny, její iont ReO_4^- je bezbarvý. Rhenium nevykazuje žádnou biologickou aktivitu ani není součástí žádných biologických drah či přeměn. Další vlastnosti rhenia včetně toxicity jsou blíže popsány v [68, 69].

Blízká podobnost s techneciem (radioizotop ^{99m}Tc je využíván v 80 % diagnostických vyšetřeních) činí z rhenia slibného kandidáta pro diagnostické a terapeutické aplikace. Výzkum komplexů rhenia je nejčastěji zaměřen na rhenium v oxidačním stavu (+V) z důvodu podobnosti s komplexy technecia vytvořenými kolem TcO^{III+} jádra [70]. Analoga technecia a rhenia vykazují nicméně i několik odlišností, které mohou vést k odlišné distribuci v lidském těle. Například, rhenium v komplexech je mnohem obtížněji redukovatelné, vykazuje vyšší stabilitu ve vyšších oxidačních stavech a je více substitučně inertní než analoga technecia [71]. K radiodiagnostickým účelům jsou vhodné radionuklidy ^{186}Re a ^{188}Re , jejichž radiodiagnosticky důležité vlastnosti shrnuje tabulka 4.3.

Tab. 4.3 Základní fyzikální vlastnosti radionuklidů rhenia důležité pro klinickou diagnostiku [72]

Fyzikální vlastnosti	^{186}Re	^{188}Re
Poločas rozpadu [h]	90,60	16,98
Energie β záření [MeV]	1,08	2,12
Průnik tkání [mm]	5	11

Z tabulky 4.3 je patrný rozdíl mezi izotopy rhenia a izotopem technecia, kdy na rozdíl od technecia (poločas rozpadu 6 hodin) mají oba izotopy rhenia mnohem delší poločas rozpadu, tudíž při jejich přípravě není nutný mezikrok na stabilnější meziproduct vhodný k transportu na pracoviště.

Oba rheniové radionuklidy lze využít k terapeutickým účelům díky emitaci β záření s doplňkovým gama zářením. Díky nižšímu dosahu β záření lze radionuklid ^{186}Re využít k diagnostice malých nádorů, ^{188}Re je vhodnější k diagnostice rozsáhlejších ploch. Výběr vhodného radionuklidu se řídí přísnými faktory, jako jsou poločas rozpadu nebo technické aspekty produkce radionuklidu. V literatuře jsou publikována využití radionuklidů rhenia k diagnostice [73] a léčení rakoviny prsu [74], prostaty [75] a kostní tkáně [76]. Do kostní tkáně se rakovinové buňky většinou dostanou v případě maligního rakovinového bujení v jiném orgánu krevním nebo mízním řečištěm. Obliba komplexů rhenia jako radiodiagnostické látky stoupla po prokázání diagnostických vlastností rheniového komplexu ^{186}Re -HEDP (HEDP = 1,1-hydroxydiethyliden difosfát) použitého k diagnostice kostní metastázy [77] a strukturálně určeného v citaci [78]. Radiofarmaceutická léčiva mohou být do cílového orgánu dopravována prostřednictvím molekulárním přenašečů, jako jsou komplexy se správnými ligandy o známé struktuře, které splní přísné klinické stabilitní parametry.

Rhenistanová radiofarmaka jsou vyráběna z radioaktivního rhenistanového iontu ($^{188}\text{ReO}_4^-$) připraveného v generátoru. Vhodným redukčním činidlem (oxid siřičitý, hydrazin, chlorid cínatý, zinek) musí být následně rhenistanový iont zredukován na nižší oxidační číslo (např. +V), které je vhodnější pro cílenou chelataci vhodným ligandem [79].

Snadná příprava obou radionuklidů rhenia je další vlastností hovořící ve prospěch používání jeho komplexů v nukleární medicíně. Příprava ^{186}Re se provádí neutronovou aktivací neradioaktivního isotopu ^{185}Re . Rhenium ^{188}Re se připravuje ve $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generátoru, kde se radioizotop rhenia odděluje iontově výměnnými metodami shodnými s výrobou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [79].

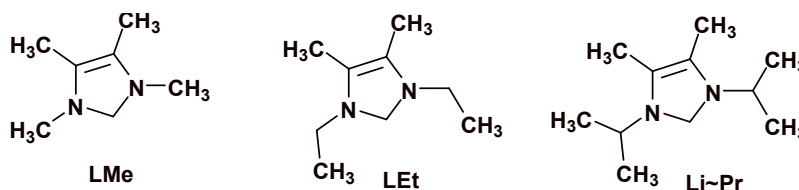
Další uplatnění rheniových komplexů mimo medicínské aktivity lze nalézt v publikacích [80-82].

4.1.4 Příklady ligandů rheniových komplexů

Komplexy s největším případným využitím v medicínské praxi mají ve svém jádře nejčastěji rhenium v pátém oxidačním stupni. Takovéto jádro je nejreaktivnější a nejvíce přístupné pro případné navázání vhodného ligandu. V literatuře jsou obvykle využívány rheniové prekurzory s rheniem v sedmém oxidačním stupni a teprve vhodnými redukčními činidly je toho oxidační číslo sníženo na požadovanou hodnotu. Ligandy se na rheniové jádro naváží pomocí vazných atomů (N, C, O, P, S případně jejich kombinací) [83-103].

Fosfor, jako jeden z biogenních prvků, je pro lidské tělo důležitý při tvorbě kostí a zubů, vyskytuje se v přenašečích ATP a ADP a je součástí DNA a RNA. V molekulách oxokomplexů rhenia hraje dvě role, jednou je schopnost vázat ligandy na centrální atom rhenia (často se vykytuje i v primárních reaktantech použitých při syntéze komplexů, např. $[\text{ReO}_2(\text{PPh}_3)_2\text{I}]$), druhou je schopnost pronikání do kostí v součinnosti s vápníkem, kde napomáhá léčení a udržování dobrého stavu kostí.

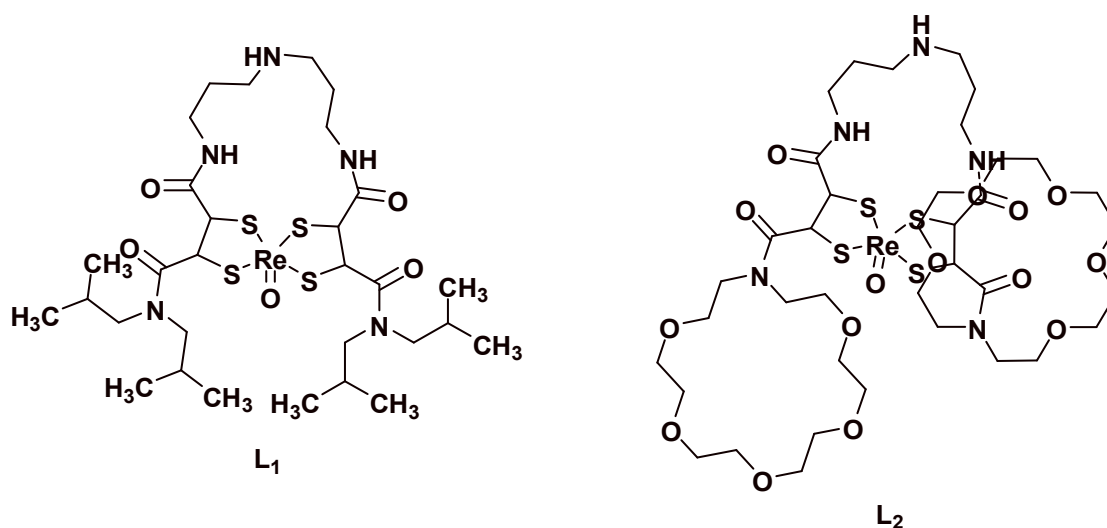
Za příklad ligandů rheniových komplexů je možné považovat heterocyklické uhlovodíky, známé jako ligandy v organické chemii od konce 60. let minulého století, kdy byla poprvé popsána deprotonace imidazolové soli zásaditým kovovým komplexem [104]. Koncem minulého století byly popsány komplexy heterocyklických uhlovodíků s mědí (+I), stříbrem (+I) a zlatem (+I) [105]. Důvodem k syntézám takovýchto komplexů je velký katalytický potenciál heterocyklických uhlovodíků v řadě reakcí [106]. V roce 2004 navázal na předchozí znalosti Kückmann a kol. reakcí prekurzoru obsahujícího rheniový atom $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$ a heterocyklických uhlovodíků (Obr. 4.5) typu 1,3-dialkyl-4,5-dimetylimidazol-2-ylidenu (L^{R} , kde $\text{R} = \text{Me}, \text{Et}, \text{i-Pr}$). Z výše popsané reakce vznikly rheniové oxokomplexy $[\text{ReOCl}(\text{L}^{\text{Me}})_4]^{+\text{II}}$, $[\text{ReOCl}(\text{L}^{\text{Et}})_4]^{+\text{II}}$ a $[\text{ReO}(\text{OMe})(\text{L}^{\text{Me}})_4]^{+\text{II}}$. Z reakce $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$ s 1,3-diisopropyl-4,5-dimetylimidazol-2-ylidenu ($\text{L}^{\text{i-Pr}}$) vznikl dioxokomplex $[\text{ReO}_2(\text{L}^{\text{i-Pr}})_4]^+$ [107].



Obr. 4.5 Použité heterocyklické uhlovodíky jako ligandy L^{R} (převzato z [107], upraveno)

Ligandy vázané na atom rhenia přes kyslík jsou intenzivně zkoumány vzhledem k některým vlastnostem kyslíku. Značný zájem je o chemii anorganických sloučenin obsahujících atom kyslíku v několikavazebné interakci s centrálním atomem kovu. Takovéto sloučeniny mohou transportovat kyslík do reakcí s fosfíny, sulfidy nebo alkeny [108], jež jsou využitelné v průmyslu a biologickém inženýrství (např. epoxidace olefinů nebo biologické napodobování katalýzy cytochromů [109]). Oxidace trifenylfosfinu na oxid trifenylfosfinu je důležitá vzhledem k podobnosti s reakcí přenosu kyslíku katalyzovanou cytochrom P-450 oxidázou [110].

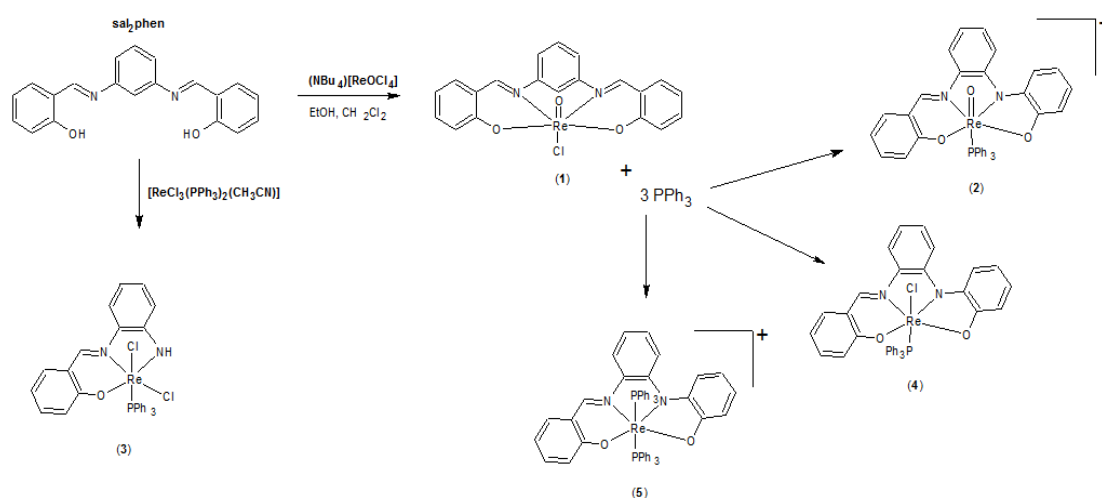
Síra jako vazný atom se uplatnila v reakci stereoisomerní tetrathioaltových S_4 ligandů s prekurzorem $(NBu_4)[ReOCl_4]$ v metanolovém prostředí. Z reakce vznikly dva stereoisomery odvozené od *meso*-dimerkaptojantarové kyseliny (L_1). K další reakci byl využit stejný rheniový prekurzor, jako ligand byl použit hydrofilický crown-eterový derivát kyseliny jantarové (L_2). Výsledné produkty (chemické struktury na obrázku 4.6) byly strukturně určeny metodami ESI-MS a podrobeny stabilitním *in vivo*, *in vitro* a biodistribučním studiím [111].



Obr. 4.6 Chemická struktura $^{188}Re-S_4$ komplexů L_1 a L_2 , (převzato z [111], upraveno)

Komplexy s různými druhy vazných atomů vznikly například v reakci *N,N'*-o-fenylenebis(salicyldimin) = sal_2phen , patřící do skupiny Schiffových bází, s rheniovým prekurzorem $(NBu_4)[ReOCl_4]$ prováděné ve směsi etanolu a dichlormetanu. Reakční schéma je na obrázku 4.7. Výsledkem reakce je rheniový komplex *trans*-

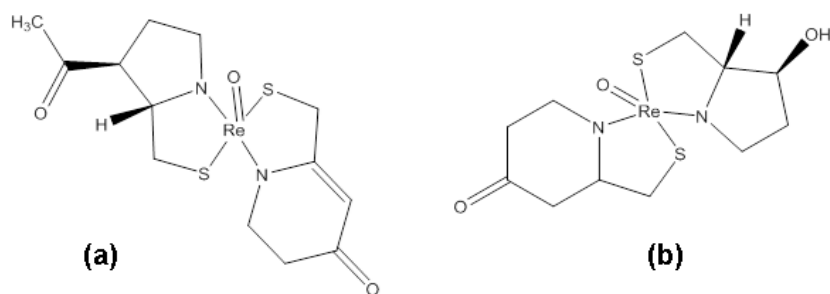
$[\text{ReOCl}(\text{sal}_2\text{phen})] \cdot \text{CH}_3\text{Cl}$ (**1**). Za použití stejného ligandu sal_2phen s jiným prekurzorem $[\text{ReCl}_3(\text{PPh}_3)_2(\text{CH}_3\text{CN})]$, dojde k vytvoření komplexu $[\text{ReCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{salphen})] \cdot 2,5 \text{ CHCl}_3$ (**3**). Pokud použijeme komplex (**1**) do reakce s přebytkem trifenylaminu, dojde k vytvoření tří rheniových produktů *cis*- $[\text{ReO}(\text{PPh}_3)(\text{sal}_2\text{phen})]$ (**2**) a dvou komplexů obsahujících rhenium ve třetím oxidačním stupni *trans*- $[\text{ReCl}(\text{PPh}_3)(\text{sal}_2\text{phen})]$ (**4**) a *trans*- $[\text{Re}(\text{PPh}_3)_2(\text{sal}_2\text{phen})]$ (**5**) [112].



Obr. 4.7 Reakční schéma syntézy oxorheniových komplexů s ligandem *N,N'*-ofenylenbis(salicyldimin) = sal_2phen (převzato z [112], upraveno)

Jako speciální případy lze popsat komplexy s antimonovými a arsenovými vaznými atomy jako analoga fosforu [113-115]. Obsáhlejší přehledy použitých ligandů jsou v literatuře [116-118].

Zvláštní kapitolou jsou ligandy odvozené od hormonů a látek podobných vyskytujících se v lidském organismu. Jako příklady můžeme uvést progesteron [119], β -estradiol [120], α -melanotropin [121] nebo reakce s peptidickými aminokyselinovými sloučeninami [122-124]. Navržené struktury výsledných komplexů rhenia s progesteronem a dihydrotestosteronem jsou ukázány na obrázku 4.8.



Obr. 4.8 Navržené struktury komplexů rhenia s progesteronem (a) a dihydrotestosteronem (b), (podle [119], upraveno)

4.2 Obecné metody stanovení rheniových komplexů

Rheniové komplexy je možné stanovit nejrůznějšími metodami v závislosti na parametru měření. Pokud je parametrem měření změna oxidačního stavu rheniového atomu, je možné tuto změnu měřit pomocí elektroanalytických, případně spektrometrických metod.

Elektroanalytické metody (nejčastěji cyklická voltametrie nebo polarografie) využívají schopnosti změny oxidačního stavu rhenia v závislosti na vloženém potenciálu na pracovní elektrodu. V závislosti na kyselosti prostředí dochází k rozdílným změnám v oxidačním čísle atomu rhenia z původního $\text{Re}^{\text{VII}+}$. V kyselém prostředí (např. 4 mol l^{-1} kyselina chloristá nebo chlorovodíková) dochází k redukci na $\text{Re}^{\text{IV}+}$ (-0,4 V oproti SCE), v neutrálním prostředí (např. 2 mol l^{-1} roztok chloridu draselného) se změni oxidační číslo na Re^{-1} (-1,5 V oproti SCE) a v zásaditém je změna oxidačního čísla závislá na původní koncentraci rhenistanu a nejčastěji vede ke směsi Re^0 a Re^{-1} (-1,66 až -1,75 V oproti SCE) [125, 126].

Spektrometrické metody jsou nejčastěji založeny na chemické redukci rhenistanu chloridem cínatým a následném vybarvení vzniklých produktů například s thiokyanatanem. Vznikají žlutě až žlutooranžově zbarvené iontové asociáty s absorpčním maximem při 400 nm. Ve vodném prostředí lze takto stanovit rhenistan do koncentrace 15 ppm, při extrakci do etheru se limit stanovitelnosti sníží na 0,24 - 5,00 ppm [127]. Rhenistan obecně vykazuje vysoký absorpční koeficient

v blízké UV oblasti (maximum kolem 220 nm), který od 270 nm výše prudce klesá téměř k nule [128].

Sledování různých rheniových specií v reakční směsi při přípravě komplexů a případně rozdělení výsledného požadovaného produktu od reaktantů je podle literatury prováděno metodami vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforézy (CZE) [129-134]. Příkladem může být HPLC stanovení farmakologicky významných Re komplexů na koloně C_{18} s mobilní fází tvořenou směsí metanol:dihydrogenfosforečnanový pufr (60:40, v/v) [135], směsí hexan:hexan-toluen (98:2, v/v), případně směsí dichlormetan:hexan (90:10, v/v) [136]. Popsané metody CZE využívají křemenné kapiláry s vnitřním průměrem 75 μm , roztok základního elektrolytu 20 mmol dm^{-3} Britton-Robinsonův pufr ($\text{pH} = 2 - 10$) nebo 40 mmol dm^{-3} fosfátový pufr ($\text{pH} = 6 - 8,5$) [137], případně 40 mmol dm^{-3} Britton-Robinsonův pufr ($\text{pH} = 2 - 6,5$) [138]. V obou případech byla použita UV detekce při 214 nm a během separace došlo k oddělení výsledného komplexu od reaktantů. Metody tenkovrstvé chromatografie, doporučované pro rychlou kontrolu vzniku Re komplexu před klinickou aplikací jsou blíže popsány v [139, 140].

Ke strukturální charakterizaci organokovových komplexů jsou v současnosti nejčastěji využívány metody nukleární magnetické resonance (NMR), infračervené spektrometrie (IR) a rentgenové difrakce (RTG). Využití těchto technik většinou vyžaduje větší množství vzorku o poměrně vysoké čistotě a v případě RTG i v krystalickém stavu. Výsadní postavení má v této aplikační oblasti metoda hmotnostní spektrometrie (MS), především díky vysoké citlivosti a schopnosti získat relevantní strukturální data i pro velmi nízké koncentrace analytů. Další výhodou této metody je i vysoká selektivita, která najde své uplatnění zejména při analýzách reakčních směsí.

Za otce MS je považován objevitel elektronu (1897) Joseph John Thomson, který v roce 1899 publikoval v práci [141, 142] objev pohyblivosti iontů plynu v závislosti na jejich náboji v elektrickém poli. Francisi Williamu Astonovi se podařilo v roce 1919 sestavit první aparaturu hmotnostního spektrometru s elektronovou ionizací [143]. Na tomto přístroji byly experimentálně změřeny přesné atomové hmotnosti 212 z 287 tehdy známých prvků [144-146]. Do 30. let pak byly určeny atomové hmotnosti všech doposud známých prvků včetně jejich neradioaktivních izotopů [147-164]. Roku 1935 byl pomocí MS objeven Dempsterem radioaktivní isotop uranu ^{235}U [165].

K zásadnímu průniku hmotnostní spektrometrie do oblasti strukturní analýzy organických látek došlo díky instrumentálnímu rozvoji této techniky během a po druhé světové válce. Jako příklad je možno zmínit objev a konstrukci průletového analyzátoru TOF (1946) a jeho spojení s plynovou chromatografií vyvinuté roku 1956 [166, 167]. První kvadrupólový hmotnostní filtr byl sestaven v roce 1953 [168]. Od 60. let je hmotnostní spektrometr standardně využíván v petrochemickém průmyslu, ale rychle nachází uplatnění i v dalších oblastech chemické analýzy, například ve farmacii. Karl Djerassi začal využívat hmotnostní spektrometrii ke studiu biologicky aktivních látek [169].

Rýchlý vývoj nových ionizačních technik a nových typů hmotnostních analyzátorů, spolu s rozvojem počítačové techniky dále významně rozšířil aplikační oblast hmotnostní spektrometrie v analytické chemii. V této souvislosti je možno například zmínit objev chemické ionizace (1966) [170], elektrosprejové ionizace (1968) [171], ionizace za atmosférického tlaku (1974) [172], ionizace pomocí urychlených atomů (1981) [173], ionizace biomolekul pomocí laserové desorpce/ionizace za účasti matrice MALDI (1988) [174, 175], ionizace biomolekul elektrosprejem (1989) [176]. Vývoj analyzátorů byl následující: analyzátor doby letu TOF (1946), kvadrupólový analyzátor (1953), ion-cyklotronové resonance s Fourierovou transformací (1974) [177], trojitý kvadrupólový analyzátor (1978), orbitrap (1999) [178]. V Československé republice byl do chodu uveden první hmotnostní spektrometr roku 1953 [179], detailněji popsán v publikaci [180].

Přehlednější a obsáhlejší historie hmotnostní spektrometrie byla sepsána například v publikacích [181-185].

Vývoj měkkých ionizačních technik zásadním způsobem ovlivnil aplikační oblast hmotnostní spektrometrie a umožnil využít tuto metodu pro strukturní charakterizaci komplexů.

Jako první byly pro tyto účely použity hmotnostní spektrometry s ionizací urychlenými atomy (FAB) a desorpcí elektrickým polem (FD) [186, 187]. Teprve vývoj a komerční dostupnost sprejových ionizačních technik umožnil širší uplatnění MS při strukturní charakterizaci komplexů. Elektrosprej (ESI) umožňuje u řady komplexů získat spektra s dominantním molekulárním iontem a nízkým zastoupením fragmentových iontů [188].

Hmotnostní spektrometrie s elektrosprejem (ESI-MS) ve srovnání s NMR a IR umožňuje dosáhnout řádově nižší limity detekce a je použitelná i pro vodné roztoky analytů. Bylo prokázáno, že ESI může v průběhu ionizace ovlivnit složení analyzovaného vzorku. Při ionizaci elektrochemicky oxidovatelných nebo redukovatelných látek může na kovové kapiláře v iontovém zdroji docházet k elektrochemické přeměně ionizované látky. Uvedenému jevu byla v literatuře věnována značná pozornost, bylo experimentálně prokázáno že ESI a ostatní příbuzné ionizační techniky (DESI, PESI) vykazují chování průtokového galvanostatu [189, 190].

Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) je v současnosti nejměkčí komerčně dostupnou ionizační technikou, která byla s úspěchem využita pro strukturní charakterizaci komplexů [191]. Velmi nízká energie budícího záření UV výbojky umožňuje generovat molekulární a kvazi-molekulární ionty i pro kineticky labilní analyty, přičemž rozsah fragmentace v iontovém zdroji je většinou zanedbatelný.

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je odvozena od klasické chemické ionizace (CI), ale je oproti ní prováděna za atmosférického tlaku. Při APCI ionizaci je eluát rozprašen proudem dusíku do vyhřívané komůrky (400 – 500 °C), kde dochází k jeho desolvataci. V oblasti koronového výboje dochází primárně k ionizaci dusíku, vodních par a dalších složek mobilní fáze přítomných v iontovém zdroji za vzniku reakčních iontů, které pak mechanismem přenosu protonu ionizují analyt [192]. APCI ionizace je použitelná pro látky středně nepolární až po silně polární. Při ionizaci vznikají primárně molekulární ionty typu $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$ a běžné jsou i adukty se solventem [193-195].

Laserová ionizace za přítomnosti matrice (MALDI) je desorpční fotoionizační technika používaná pro vzorky v tuhé fázi, probíhající ve většině případů za sníženého tlaku. Použití této ionizační techniky je vhodné pro nepolární i vysoce polární analyty v hmotnostním intervalu 500 - 100 000 Da [196-198]. Ionizace MALDI se nejčastěji kombinuje s průletovým analyzátozem (TOF) v běžně komerčně dostupné sestavě MALDI-TOF [199]. MALDI-TOF metoda se vyznačuje vysokou citlivostí detekce, těžištěm jejího využití je strukturní a kvantitativní analýza biopolymerů, proteinů, nukleových kyselin nebo lipidů. Předností této metody je rychlá a jednoduchá příprava vzorku s nízkými požadavky na množství vzorku, nízký limit detekce a především vysoká rychlost analýzy umožňující zpracovat velký počet vzorků za jednotku času [200].

Při MALDI experimentech se vzorek nejprve rozpustí, smíchá s vhodnou maticí (organická kyselina) a nanese na omytou destičku. Následně je vzorek vysušen (vykrytalizován) společně s maticí, nanášecí destička převedena do evakuovaného prostoru iontového zdroje, kde je analyt převeden do ionizovaného stavu sérií krátkých laserových pulzů. Během ionizace přednostně dochází k tvorbě pseudomolekulárních iontů $[M+H]^+$, výjimkou ale nejsou ani vícenásobně nabitě ionty $[M+2H]^{+II}$, $[M+3H]^{+III}$ nebo ionty dimérů $[2H+M]^+$ [201].

Využití hmotnostní spektrometrie s měkkými ionizačními technikami ke strukturální charakterizaci organokovových sloučenin rhenia lze nalézt v publikacích [202-210].

Spojením hmotnostního spektrometru s některou ze separačních technik můžeme získat výhodu separace a následné identifikace jednotlivých složek složité směsi látek v jednom měřicím cyklu. Zásadním problémem tohoto propojení je zatěžování vakuového systému hmotnostního spektrometru průtokem mobilní fáze. U plynové chromatografie tento problém vyřešilo používání kapilárních kolon místo náplňových. Kapilární kolony umožňují používání mnohonásobně menšího průtoku nosného plynu, díky čemuž je možné zavést konec kapiláry přímo do iontového zdroje. U kapalinové chromatografie byl problém v zásadě vyřešen použitím sprejových ionizačních technik, které jsou kompatibilní s průtokem kapaliny. Mobilní fáze se přímo účastní ionizačního procesu a její nadbytek je odváděn čerpacím systémem. V případě konvenční HPLC je nutno před vstupem do iontového zdroje odvést část mobilní fáze mimo přístroj, v případě použití kapilárních kolon je možno do iontového zdroje přivést celý objem mobilní fáze. [211]. U kapilární zónové elektroforézy jsou průtoky nosného elektrolytu ve srovnání s kapalinovou chromatografií zanedbatelné, problémem v tomto případě je stabilizace toku a vytvoření zemnicí elektroforetické elektrody, nejčastěji realizované přiváděním pomocné kapaliny přímo do elektrospreje. Nevýhodou tohoto řešení je snížení citlivosti díky naředění základního elektrolytu vytékajícího ze separační kapiláry [212, 213].

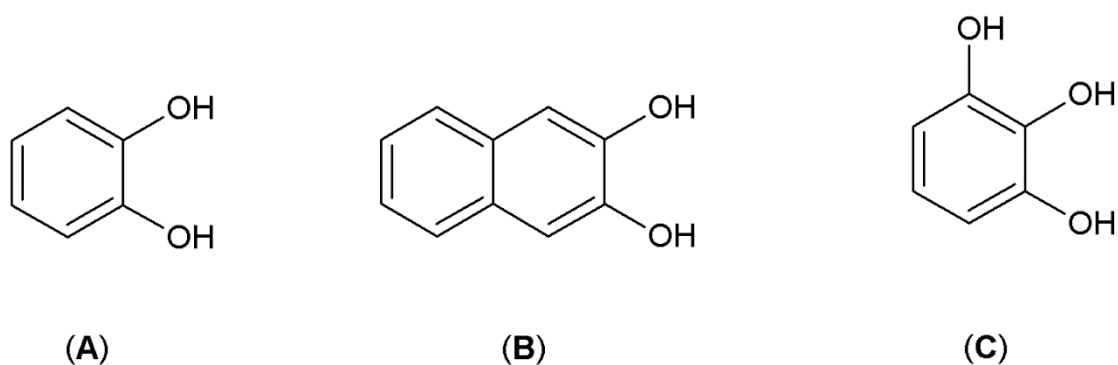
Spojení separační techniky s MS detektorem patří v současné farmaceutické analýze k nejvíce využívaným instrumentálním spojení umožňujícím stanovení až do úrovně desetin ng l^{-1} . Uplatnění nachází v kvantitativní i kvalitativní analýze účinných látek (API) i finálních farmaceutických přípravků. Rozšířena jsou stanovení API plynovou chromatografií [214-216], kapalinovou chromatografií [217-219] i kapilární elektroforézou [220-222] ve spojení s MS, MS/MS detektorem nebo DAD a FDL detektorem [223-226].

5 ANALÝZA KOMPLEXŮ RHENIA S AROMATICKÝMI LIGANDY

5.1 Charakterizace komplexů rhenia (V) s fenoly pomocí hmotnostní spektrometrie s měkkými ionizačními technikami (publikace I)

5.1.1 Syntéza komplexů

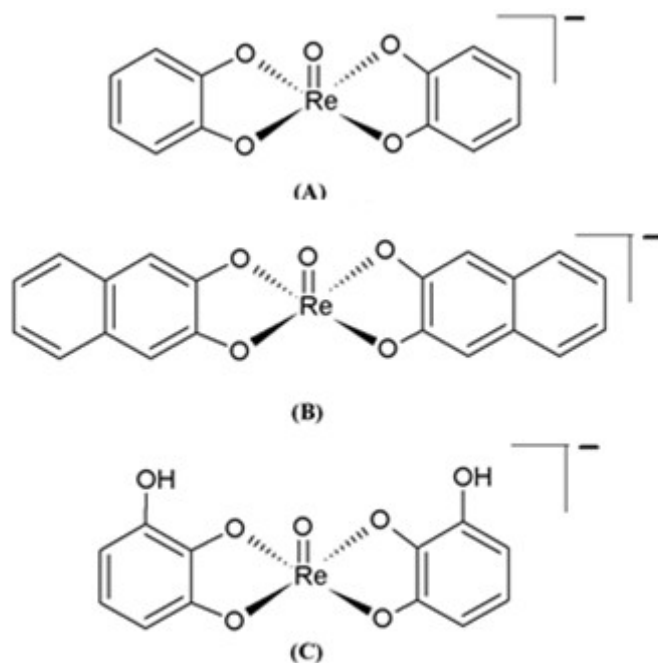
Rheniové komplexy se třemi alkoholovými aromatickými ligandy (1,2-dihydroxybenzen, 2,3-dihydroxynaftalen a 1,2,3-trihydroxybenzen; struktury naznačeny na obrázku 5.1) použité k dalším MS experimentům byly připraveny modifikovaným postupem podle literatury [227-229]. Všechny komplexy byly připraveny podle stejného postupu. Směs 2 mg rheniového prekurzoru tetrabutylamoniium tetrachlorooxorhenátu ($3,42 \text{ mmol dm}^{-3}$) a $6,84 \text{ mmol dm}^{-3}$ (dvojnásobný molární přebytek) ligandu byla rozpuštěna ve 2 ml acetonitrilu a zahřívána pod refluxem a argonovou atmosférou 60 minut. Po zchlazení na laboratorní teplotu bylo rozpouštědlo částečně nebo úplně odpařeno na vakuové odparce a produkt byl uchováván pod inertní atmosférou. Pro NMR experimenty byly komplexy připraveny podle stejného postupu v deuterovaném acetonitrilu.



Obr. 5.1 Struktury použitých ligandů: 1,2-dihydroxybenzen (A), 2,3-dihydroxynaftalen (B) a 1,2,3-trihydroxybenzen (C)

5.1.2 Výsledky a diskuze – doplňkový komentář k publikaci

Připravené rheniové komplexy s alkoholovými ligandy, zobrazené jako anionty na obrázku 5.2, byly strukturálně charakterizovány metodami IR, ^1H a ^{13}C NMR a MS. Odpovídající 3D modely vytvořené programem MolView [230] jsou přiloženy v sekci Přílohy I/1-3)



Obr. 5.2 Anioinická struktura připravených komplexů: bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium⁻ (A); bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorhenium⁻ (B) a bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorhenium⁻ (C)

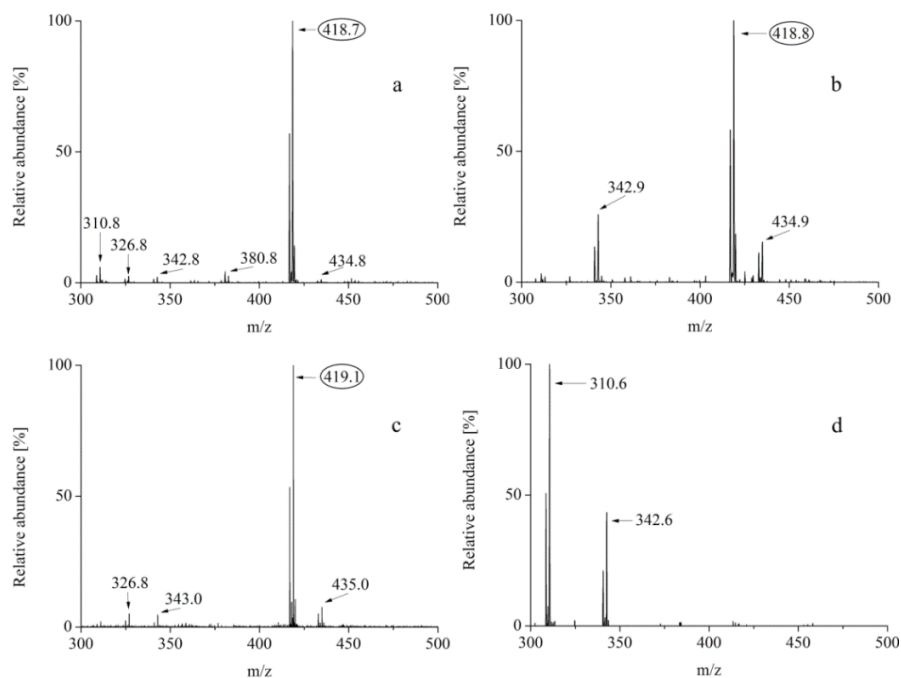
Infračervená spektra připravených komplexů ukazují na silnou absorpenci v oblasti $910 - 1000 \text{ cm}^{-1}$. Tato oblast je charakteristická pro absorpenci terminální Re=O skupiny. Typická intenzivní aromatická C=C protahovací vazba vede k absorbančním pásům v oblasti $1470 - 1520 \text{ cm}^{-1}$. Intenzivní absorpční pásy při 2962 , 2932 a 1509 cm^{-1} ukazují na přítomnost nezreagovaného tetrabutylamoniového kationtu v reakční směsi. Naměřená IR spektra jsou k práci přiložena v sekci Přílohy I/4-6.

U připravených komplexů byla naměřena NMR spektra v deuterovaném acetonitrilu s ostrými, dobře oddělenými píky při ^1H NMR experimentu. Všechny NMR experimenty byly měřeny na 600 MHz přístroji. Komplex bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium (A) vykazuje ve vodíkovém spektru posuny při δ : 6,82 – 6,80 (m, 6H), 6.72 – 6.71 (m, 6H) ppm a δ : 145.64 (4C), 121.36 (4C), 116.48 (4C), 59.53 (4C), 24.44 (4C), 20.44 (4C), 13.88 (4C) ppm v uhlíkovém spektru.

Komplex bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorhenium (B) vykazuje posuny při δ : 7.61 – 7.59 (m, 4H), 7.25 – 7.22 (m, 8H), 3.09 – 3.06 (m, 14H), 1.62 – 1.57 (m, 8H), 1.37 – 1.33 (m, 8H), 0.97 ppm ve vodíkovém spektru a δ : 147.41 (4C), 130.80 (4C), 127.25 (4C), 124.79 (4C), 111.22 (4C), 59.76 – 59.73 (m, 4C), 24.71 (4C), 20.73 (4C), 14.19 (4C) ppm v uhlíkovém spektru.

Komplex bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorhenium (C) poskytuje posuny při δ : 9,95 (bs, 2H), 6.57 – 6.55 (m, 2H), 6.35 – 6.34 (m, 4H), 3.09 – 3.06 (m, 8H), 1.62 - 1.57 (m, 8H), 1.37 – 1.33 (m, 8H), 0.97 ppm v ^1H spektru a δ : 147.38 (4C), 130.90 (2C), 120.99 (2C), 108.9 (4C), 59.76 – 59.73 (m, 4C), 24.71 (4C), 20.73 (4C), 14.19 (4C) ppm v ^{13}C spektru. Všechna spektra jsou k práci přiložena v sekci Přílohy I/7-12.

ESI-MS, APPI-MS, ESI-MS/MS a LDI-MS hmotnostní spektra studovaných komplexů byla měřena v negativním módu. Na obrázku 5.3 jsou uvedena ukázková spektra pro komplex s 1,2-dihydroxybenzenem, analogická spektra ostatních komplexů jsou uvedena v sekci Přílohy I/13-14. Z obrázku 5.3 je zřejmé dominantní zastoupení molekulárních aniontů při použití všech ionizačních technik, zastoupení fragmentových iontů je ve všech případech nízké. Připravené komplexy neobsahují protonovatelnou skupinu, z tohoto důvodu hmotnostní spektra v pozitivním módu nepřinášejí žádnou informaci o jejich struktuře. V pozitivním módu bylo možné registrovat pouze tetrabutylamoniový kation jako protion použitý při přípravě komplexů.



Obr. 5.3 Naměřená spektra v negativním módu pro komplex s 1,2-dihydroxybenzenem pro ionizační techniky ESI-MS (a); APPI-MS (b), LDI-MS (c) a ESI-MS/MS (d). Kroužkem jsou označeny příslušné molekulární anionty.

ESI-MS/MS experimenty umožňují rozlišit mezi fragmentačními ionty vzniklými přímo ze studovaného komplexu a ionty vzniklými ze sloučenin přítomných v reakční směsi. Dceřiné ionty pozorované při MS/MS fragmentaci studovaných komplexů vznikly převážně štěpením aromatické části na jednom ligandu nebo ztrátou ligandu celého. Výše popsaný mechanismus nicméně nebyl pozorován u komplexu vzniklého reakcí s 2,3-dihydroxynaftalenem, který vykazuje nejvyšší stabilitu ze všech studovaných komplexů.

Všechny studované komplexy vykazovaly v negativním módu charakteristické izotopové klastry. Tyto klastry byly porovnány s teoreticky vypočtenými klastry pomocí programu IsotopePattern (Bruker Daltonics). Shoda mezi teoreticky vypočtenými a naměřenými izotopovými klastry byla vyjádřena na základě indexu podobnosti (SI) [231]. Index podobnosti SI byl vypočten podle vzorce 5.1, ve kterém ($i-i_0$) je rozdíl mezi intenzitami signálu mezi dvěma zastoupenými ionty, dělená malou hodnotou intenzity i_0 . Symbol N označuje počet signálů produktových iontů, které jsou porovnávány.

$$SI = \sqrt{\frac{\sum_i \left\{ \frac{i-i_0}{i_0} \times 100 \right\}^2}{N}} \quad (5.1)$$

Zvýše uvedeného vzorce 5.1 je zřejmé, že *SI* může nabývat hodnot v intervalu <0;1>, nula charakterizuje úplnou shodu mezi teoretickým a experimentálním izotopovým profilem.

Vypočtená shoda mezi teoreticky vypočtenými a naměřenými daty pro ESI, APPI a LDI ionizaci je uvedena v tabulce 5.1.

Tab. 5.1 Experimentální (exp.) a vypočtené (kal.) hodnoty relativních intenzit *I* [%] jednotlivých iontů v klastrovém izotopovém zastoupení s vypočtenými hodnotami indexu podobnosti *SI* vztažené k jednotlivým typům ionizace

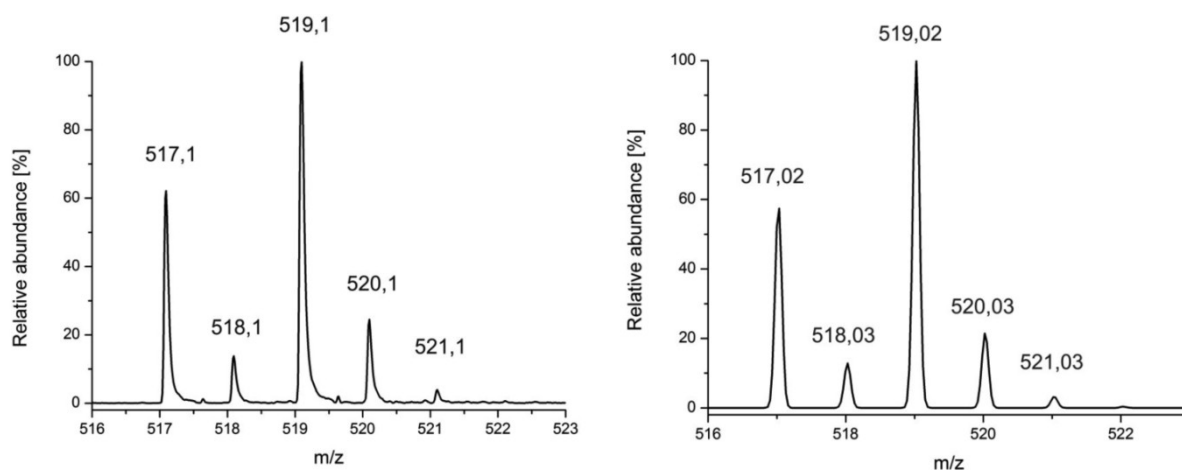
Komplex	m/z	ESI		APPI		LDI	
		<i>I</i> [%] kal.	<i>I</i> [%] exp.	<i>I</i> [%] kal.	<i>I</i> [%] exp.	<i>I</i> [%] kal.	<i>I</i> [%] exp.
bis(1,2- dihydroxybenzen) oxorhenium ⁻	417	59,1	56,9	59,1	56,9	59,1	53,4
	418	7,8	4,2	7,8	4,2	7,8	9,5
	419	100	100	100	100,0	100	100,0
	420	13,2	14,1	13,2	14,1	13,2	10,6
	421	1,8	0,4	1,8	0,4	1,8	0,7
			(1-SI)*100=91,9		(1-SI)*100=91,9		(1-SI)*100=89,0
bis(1,2,3- trihydroxybenzene) oxorhenium ⁻	449	58,9	49,8	58,9	41,9	58,9	62,3
	450	7,9	20,4	7,9	8,3	7,9	15,6
	451	100	100	100	100,0	100	100,0
	452	13,3	11,9	13,3	16,5	13,3	16,5
	453	2,2	0,1	2,2	2,0	2,2	3,8
			(1-SI)*100=74,9		(1-SI)*100=79,1		(1-SI)*100=84,2
bis(2,3- dihydroxynaphthalene) oxorhenium ⁻	518	12,9	11,5	12,9	13,8	12,9	13,8
	519	100	100	100	100,0	100	100,0
	520	21,8	19	21,8	15,4	21,8	24,5
	521	3,3	3	3,3	5,9	3,3	3,9
		(1-SI)*100=91,1		(1-SI)*100=81,1		(1-SI)*100=92,3	

Celkový přehled všech pozorovaných iontů ve spektrech připravených komplexů s odezvou vyšší než 5 % intenzity příslušného molekulárního aniontu, spolu s odpovídající m/z hodnotou je uveden v tabulce 5.2. Charakteristické izotopové klastry odpovídající přítomnosti charakteristických izotopů rhenia byly pozorovány u všech studovaných komplexů.

Tab. 5.2 Přehled pozorovaných iontů v připravených komplexech s odezvou vyšší než 5 % (s hvězdičkou označeny fragmentační ionty pozorované ESI-MS/MS technikou, tučně molekulové hmoty jednotlivých komplexů)

bis(1,2-dihydroxybenzen) oxorhenium ⁻			bis(1,2,3- trihydroxybenzen) oxorhenium ⁻			bis(2,3-dihydroxynaftalen) oxorhenium ⁻		
označení	m/z	vzorec	označení	m/z	vzorec	označení	m/z	vzorec
1*	311	ReC ₆ H ₄ O ₃	7*	327	ReC ₆ H ₄ O ₄	12*	393	ReC ₁₀ H ₆ O ₅
2	327	ReC ₆ H ₄ O ₄	8*	343	ReC ₆ H ₄ O ₅	13	431	ReC ₁₀ H ₆ O ₃ Cl ₂
3*	343	ReC ₆ H ₄ O ₅	9*	359	ReC ₆ H ₄ O ₆	14	519	ReC₂₀H₁₂O₅
4	381	ReC ₆ H ₄ O ₃ Cl ₂	10	451	ReC₁₂H₈O₇	15	535	ReC ₂₀ H ₁₂ O ₆
5	419	ReC₁₂H₈O₅	11	467	ReC ₁₂ H ₈ O ₈	16	554	ReC ₂₀ H ₁₂ O ₅ Cl
6	435	ReC ₁₂ H ₈ O ₆						

Srovnání naměřeného a teoretického izotopového klustru v oblasti molekulárního aniontu pro komplex s 2,3-dihydroxynaftalenem je ukázán na obrázku 5.4.



Obr. 5.4 Porovnání naměřeného (vlevo) a teoretického (vpravo) hmotnostního spektra rheniového komplexu s 2,3-dihydroxynaftalenem.

Na základě opakovaných měření je možno konstatovat, že připravené komplexy vykazují podobné chování při ESI-MS experimentech, charakterizované bohatě zastoupenými molekulárními ionty jako nejvyššími píky a fragmentačními píky s nízkou intenzitou. Zaznamenaná hmotnostní spektra nízkého rozlišení jsou jednoduchá a poskytují v kombinaci se studiem izotopických klastrů dostatečné informace o struktuře připravených komplexů. Přímé analýzy reakčních směsí hmotnostní spektrometrií prokázaly, že je možno získat analytické informace o zastoupení zbytkových reakčních složek a vedlejších produktů reakce, včetně produktů následné oxidace primárně vzniklých komplexů, bez použití separační metody. V hmotnostních spektrech nebyly pozorovány žádné dimerní ani jiné shlukové struktury, v rámci provedených stabilitních studií byla potvrzena oxidace primárně vzniklých Re^{+V} komplexů na finální Re^{+VII} produkty. Rozsah následných reakcí spojených se ztrátou či výměnou ligandu v komplexech byl zanedbatelný. Při srovnání ESI-MS a APPI-MS experimentů se neprokázal vznik iontů v elektrospreji na základě probíhající elektrochemické reakce.

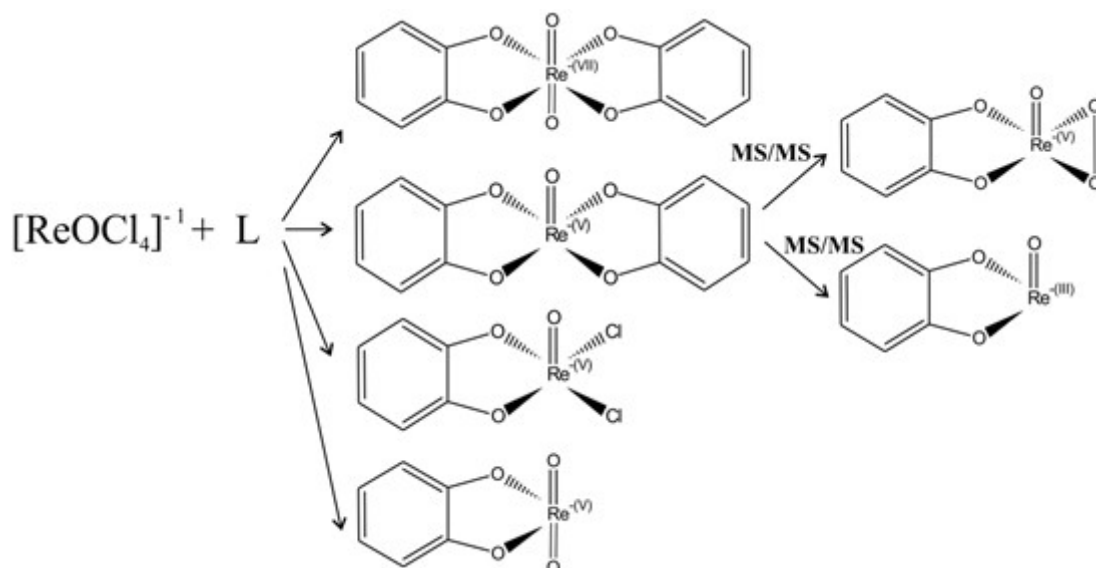
Přímé posuzování rozdílů v relativních intenzitách jednotlivých iontů za použití rozdílných ionizačních technik je obtížné vzhledem k odlišným postupům nastavení parametrů jednotlivých iontových zdrojů, naladěných s použitím specifického komerčního ladícího roztoku, použitelného jen pro daný typ ionizace. Je zřejmé, že každý ladící proces může diskriminovat jiné ionty ve spektru. Přesto však je možno některé rozdíly specifikovat: na obrázku 5.3 je patrný nárůst relativní intenzity fragmentového

píku s hmotou 343 u ionizace APPI (část b) ve srovnání s ESI a LDI, způsobený vyšším faktorem odezvy nebo výraznější fragmentací během fotoionizace.

Díky přítomnosti *O*-substituovaných aromatických ligandů, vykazují studované komplexy výraznou absorpční zónou záření v UV/Vis oblasti, zejména při 337 nm. Vzhledem k této vlastnosti je možno při ionizaci laserovou desorpcí pracovat bez přídavku matrice v módu LDI. Jak vyplývá z obrázku 5.3 (c) v LDI-MS spektrech pozorujeme výrazně zastoupený molekulární anionty a zanedbatelné množství fragmentů.

Tandemová hmotnostní spektrometrie ESI-MS/MS poskytuje základní informace o fragmentech vznikajících z původních molekulárních iontů studovaných komplexů. Umožňuje také rozlišení fragmentů iontů od molekulárních iontů látek přítomných přímo v reakční směsi. Je třeba poznamenat, že za určitých okolností mohou být fragmentační ionty shodné s ionty přítomnými v reakční směsi. Toto je právě příklad námi připravovaných komplexů, u kterých je možná koincidence fragmentového iontu komplexu a molekulárního iontu volného ligandu přítomného v nadbytku v reakční směsi. Hmotnostní spektrum z ESI-MS/MS je ukázáno pro komplex s 1,2-dihydroxybenzenem na obrázku 5.3 (ostatní spektra pro další komplexy jsou uvedena v sekci Přílohy I/13-14).

Po vyhodnocení MS spekter byla programem ACD/labs ChemSketch verze 12.01 vytvořena reakční schémata struktur komplexů, primárně vznikajících při reakci rheniového prekurzoru s příslušným ligandem. Na obrázku 5.5 jsou jako příklad uvedeny struktury komplexů s 1,2-dihydroxybenzenem jako ligandem. Schema je doplněné o dominantní dceřiné ionty vznikající při fragmentaci bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorheniového aniontu v rámci provedených MS/MS experimentů. Ostatní reakční schémata pro komplexy s 2,3-dihydroxynaftalenem a 1,2,3-trihydroxybenzenem jsou uvedeny v sekci Přílohy I/15-16.



Obr. 5.5 Struktury molekulárních aniontů komplexů přítomných v reakční směsi rheniového prekurzoru s 1,2-dihydroxybenzenem a dceřiných iontů vzniklých při fragmentaci bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorheniového aniontu; symbol L je použit pro obecné označení ligandu.

Závěrem je možno konstatovat, že v publikaci I byla prokázána schopnost ESI, APPI a LDI ionizace efektivně ionizovat za laboratorních podmínek syntetizované komplexy rhenia s aromatickými ligandy, získaná hmotnostní spektra poskytla cenné informace o struktuře vznikajících komplexů. Všechny použité měkké ionizační techniky poskytly ve spektrech molekulární ionty o vysoké intenzitě signálu, rozsah fragmentace byl ve všech případech nízký.

PUBLIKACE I

Název	<i>Characterization of <u>rhenium(V) complexes</u> with phenols using mass spectrometry with selected soft ionization techniques</i>
Autoři	Štícha Martin Jelínek Ivan Poláková Jana Kaliba David
Časopis	Analytical Letters
Volume:Issue	48:15
Stránky	2329-2342
Rok	2015

Mass Spectrometry

CHARACTERIZATION OF RHENIUM(V) COMPLEXES WITH PHENOLS USING MASS SPECTROMETRY WITH SELECTED SOFT IONIZATION TECHNIQUES

Martin Štícha,¹ Ivan Jelínek,² Jana Poláková,¹ and David Kaliba²

¹Faculty of Science, Department of Chemistry, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

²Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

The synthesis, characterization, and mass spectra of oxorhenium(V) complexes with 1,2-dihydroxybenzene, 1,2,3-trihydroxybenzene, and 2,3-dihydroxynaphthalene are reported. Electrospray ionization, atmospheric pressure photoionization, and laser desorption/ionization mass spectra of the complexes showed abundant negatively charged molecular anions and low fragmentation. Calculated similarity indexes showed significant conformity between the computed and experimental isotopic patterns of selected ions and confirmed correct assignment of elemental composition to m/z values. Electrospray tandem mass spectrometry provided essential information about fragments from molecular ions of studied complexes, making it possible to distinguish among fragment ions and the ions arising from compounds present in the reaction mixture. Based on the results, mass spectrometry utilizing soft common ionization techniques is useful for monitoring complex formation reaction kinetics and the stabilities of the complexes. Representative spectra were recorded for micromolar concentrations of the analytes.

Keywords: Complexes; Fragmentation; Mass-spectrometry; Rhenium; Structural analysis

INTRODUCTION

Nuclear medicine relies frequently on transition metal-based radiopharmaceuticals introduced to patients in form of organic ligand complexes (Abrams and Murrer 1993). The choice of radioisotopes is restricted to those fulfilling strict radiological and pharmacological requirements. Previous research has focused on technetium and rhenium (Alberto 1996; Dilworth and Parrott 1998). Both metals possess almost identical chemical properties (Colton 1965; Gerloch and Constable 1994) and their compounds possess a variety of oxidation states from -1 to $+7$ and form both cationic and anionic species with strong oxidizing to mild reducing properties. As transition metals, they are able to form coordination complexes with

Received 26 January 2015; accepted 29 March 2015.

Address correspondence to Martin Štícha, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic. E-mail: sticha@natur.cuni.cz

complexes (but not with phenolic ligands) by means of LDI, MALDI, and ESI ionization was reported by Petroselli et al. (2012) and Day, Payne, and Holt (2007).

Atmospheric pressure photoionization (APPI) offers a viable alternative for ionization of kinetically labile compounds and various types of complexes. Relatively low ionization energy provided by ultraviolet radiation typically generates molecular ions or protonated molecules, and relatively few adducts and fragment ions. Compared to ESI, LDI, and MALDI the extent of molecular ion fragmentation is usually negligible.

Here is reported the characterization and mass spectra of three structurally related oxorhenium(V) complexes with phenols as complex forming ligands derived from catechol. The 1,2-Dihydroxybenzene, 1,2,3-trihydroxybenzene, and 2,3-dihydroxynaphthalene were used as oxygen donor ligands with a oxorhenium(V) complex, *n*-tetrabutylammonium-tetrachlorooxorhenate (*n*-Bu₄N)[ReOCl₄]. ESI-MS, APPI-MS, and LDI-MS were compared for the identification of studied complexes and other compounds present in the reaction mixture in course of complex formation.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All reagents were obtained commercially and were of highest purity available: the standards tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenate(V) and 1,2-dihydroxybenzene were purchased from Sigma-Aldrich; 1,2,3-trihydroxybenzene and 2,3-dihydroxynaphthalene were purchased from Alfa Aesar; deuterated acetonitrile (ACN-d₃) for NMR (99.8 percent purity) was purchased from Euro-isotop; acetonitrile (HPLC grade) was purchased from Lach-Ner (dried and deoxygenated before use); and ESI tuning mix for the ion trap and APCI/APPI tuning mix for the ion trap were purchased from Agilent.

Instrumentation

Infrared (IR) spectra of prepared complexes were recorded on Nicolet 380 spectrometer using KBr discs. Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were obtained in deuterated acetonitrile (ACN-d₃) and recorded using a Bruker Avance III (600 MHz) spectrometer. APPI-MS and ESI-MS were conducted on an ion trap instrument Esquire 3000; LDI-MS experiments were performed using matrix assisted laser desorption ionization with a tandem time of flight analyzer (MALDI-TOF/TOF) Ultraflex II with a 337 nanometers nitrogen laser (both Bruker Daltonics, Germany).

Synthesis of the Complexes

The structures of the ligands and prepared complexes are shown in Figure 1 and Figure 2. These complexes were prepared by modified procedure described for similar compounds by Gerber and others (Gerber, Luzipo, and Mayer 2004, 2006; Gerber and Mayer 2005; Booysen et al. 2007). The procedure was identical for all studied ligands. A mixture of 2 mg of tetrabutylammonium-tetrachlorooxorhenate

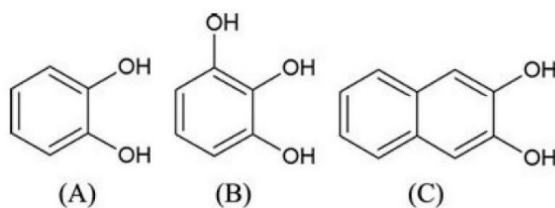


Figure 1. Structures of ligands: (A) 1,2-dihydroxybenzene, (B) 1,2,3-trihydroxybenzene, and (C) 2,3-dihydroxynaphthalene.

(3.42 millimolar) and 6.84 millimolar of appropriate ligand in 2 milliliters of acetonitrile was heated to reflux under argon with constant stirring for sixty minutes. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated under vacuum and the resulting precipitates were stored under an inert atmosphere.

Spectroscopic Characterization

The infrared spectra of the complexes included strong absorption from 910 to 1000 per centimeter assigned to a characteristic stretch of a terminal Re=O group. The typical intense aromatic C=C stretching vibrations gave rise to absorption bands in the region from 1470 to 1520 per centimeter. Intense bands at 2962, 2932, and 1509 per centimeter corresponded to the presence of the tetrabutylammonium counteranion.

The complexes in deuterated acetonitrile showed sharp, well-resolved peaks in their ^1H NMR spectra. The complex bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium(-) (**5**) provided shifts at (600 MHz, CD_3CN): δ : 6.82–6.80 (m, 6H) and 6.72–6.71 (m, 6H). Bis(1,2,3-trihydroxybenzene)rhenium(-) (**10**) had shifts at (600 MHz, CD_3CN): δ : 9.95 (bs, 2H), 6.57–6.55 (m, 2H), and 6.35–6.34 (m, 4H). Bis(2,3-dihydroxynaphthalene)oxorhenium(-) (**14**) had peaks at (600 MHz, CD_3CN): δ : 7.61–7.59 (m, 4H) and

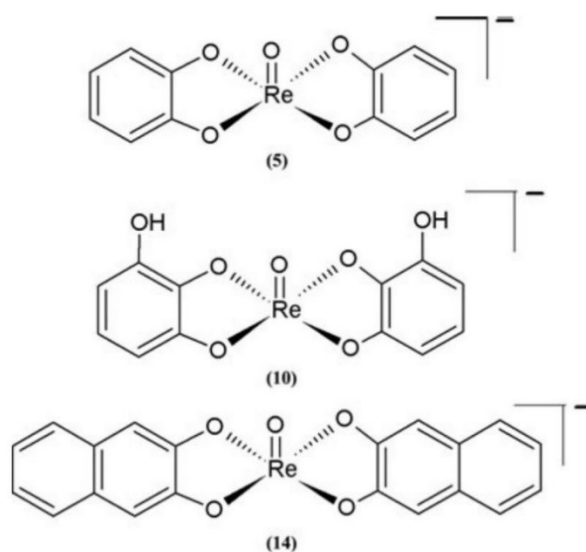


Figure 2. Structures of prepared anionic oxorhenium complexes: bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium(-) (**5**); bis(1,2,3-trihydroxybenzene)oxorhenium(-) (**10**); and bis(2,3-dihydroxynaphthalene)oxorhenium(-) (**14**).

7.25–7.22 (m, 8H). Characteristic shifts of terabutylammonium at 3.09–3.06 (m, 8H), 1.62–1.57 (m, 8H), 1.37–1.33 (m, 8H), and 0.97 (t, $j = 7.3$ Hz, 12H) ppm were present in all complexes.

Mass Spectrometry

ESI-MS and APPI-MS data were collected in negative ion mode at a scan range from m/z 260 to 1000. For APPI-MS, the source temperature was 350 degree Celsius and the nebulizer gas pressure was 20 psi. In all measurements, the flow rate of dry gas was 5 liters per minute and the temperature was 250°C. The sample was diluted in acetonitrile and delivered to the nebulizer by a syringe pump (Cole Parmer, USA) at a flow rate of 100 microliters per minute. Optimized conditions of the mass spectrometer in negative ion modes were a capillary voltage of 1500 volts, a flow rate of desolvation gas of 5 liters per minute, and a desolvation temperature of 250 degree Celsius.

In ESI-MS, the nebulizer gas pressure was 18 psi. In all measurements, the flow rate of dry gas was 5 liters per minute and the temperature was 250 degree Celsius. The sample was diluted in acetonitrile and delivered to the nebulizer by a syringe pump (Cole Parmer, USA) at a flow rate of 8 microliters per minute. Optimized conditions of the mass spectrometer in negative ion modes were a capillary voltage of 4000 volts, a flow rate of desolvation gas of 5 liters per minute, and a desolvation temperature was 250 degree Celsius. The instrument was controlled by the Esquire Control 5.3.11 software and data were processed via Data Analysis 3.3.56 from Bruker Daltonics (Germany).

LDI-MS spectra were acquired in negative ion mode at a scan range from m/z 260 to 1000. Sample solutions were spotted on an MTP 384 polished stainless steel target plate from Bruker Daltonics (Germany). The laser power was adjusted to obtain high signal-to-noise ratios and maximal resolution. Spectra were obtained and analyzed with the software FlexControl and FlexAnalysis from Bruker Daltonics (Germany).

ESI-MS/MS spectra were recorded with a fragmentation cut-off set to approximately one-third of the m/z of the parent ion. The isolation width of the parent ion was set to 4 daltons to acquire a full isotope profile of the fragments. The fragmentation amplitude was varied from 0.8 to 1.2 volts. The fragmentation time in the ion trap was 40 milliseconds. All other experimental conditions were identical to those above in conventional ESI-MS.

The similarity between the computed and experimental molecular ion isotopic clusters was evaluated on the basis of similarity indexes (SI) (Wan, Vidavsky, and Gross 2002). The corresponding formula is given in (1), where $(i - i_0)$ is a difference in signal intensities at a given mass for two peaks, divided by the smaller intensity value (i_0) and N is the number of product-ion signals that are compared:

$$SI = \sqrt{\frac{\sum_i \left\{ \frac{i - i_0}{i_0} \times 100 \right\}^2}{N}} \quad (1)$$

According to definition, the similarity index may have values from 0 to 1. Peak patterns with $SI = 0$ are identical. In order to obtain percentual expression of isotopic

patterns similarity, values of $(1 - SI)100$ were evaluated. Theoretical isotopic patterns were generated via Data Analysis 3.3.56 software.

RESULTS AND DISCUSSION

ESI, APPI, and LDI mass spectra of the complexes, together with supplementary ESI-MS/MS spectra, are shown in Figures 3, 4, and 5. In general, abundant negatively charged molecular ions of the complexes were observed for all ionization techniques and the extent of fragmentation was low. Recorded negative ion mass spectra primarily consisted of intact molecular ions of the complexes and other ions corresponding to the presence of residual reagents, reaction byproducts, and their oxidation products. The ligands did not contain functional groups that could be protonated; therefore, positive ion spectra did not include information about the structure of prepared complexes. In the positive mode, only the tetrabutylammonium counter cation was observed.

A survey of observed ions in prepared complexes with abundancies higher than 5 percent of corresponding base peak intensity in comparison to their mass/charge (m/z) ratio is shown in Table 1. Characteristic isotopic clusters were observed for all molecular species. The values $(1 - SI)100$ given in Table 2 indicate significant conformity between calculated and experimental spectra and correct assignment of elemental composition to m/z values of observed ions.

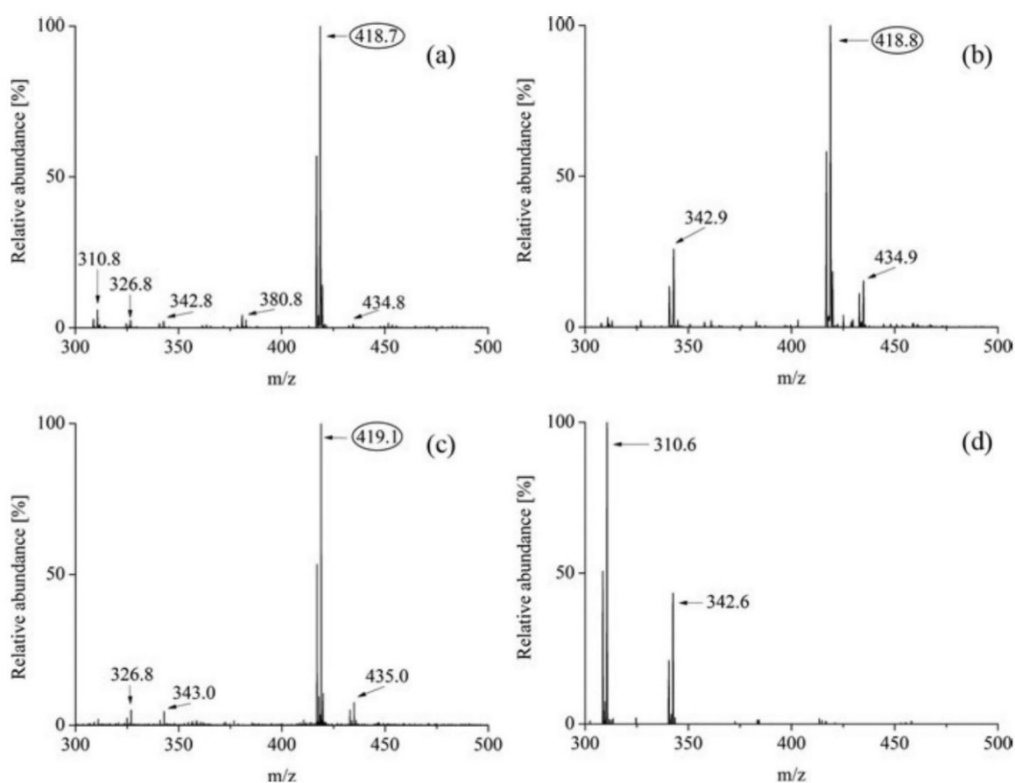


Figure 3. Negative ion mass spectra of $\sim 5 \times 10^{-6}$ molar bis(1, 2-dihydroxybenzene)oxorhenium(-): (a) ESI, (b) APPI, (c) LDI, and (d) ESI-MS/MS. Molecular ion peaks are circled.

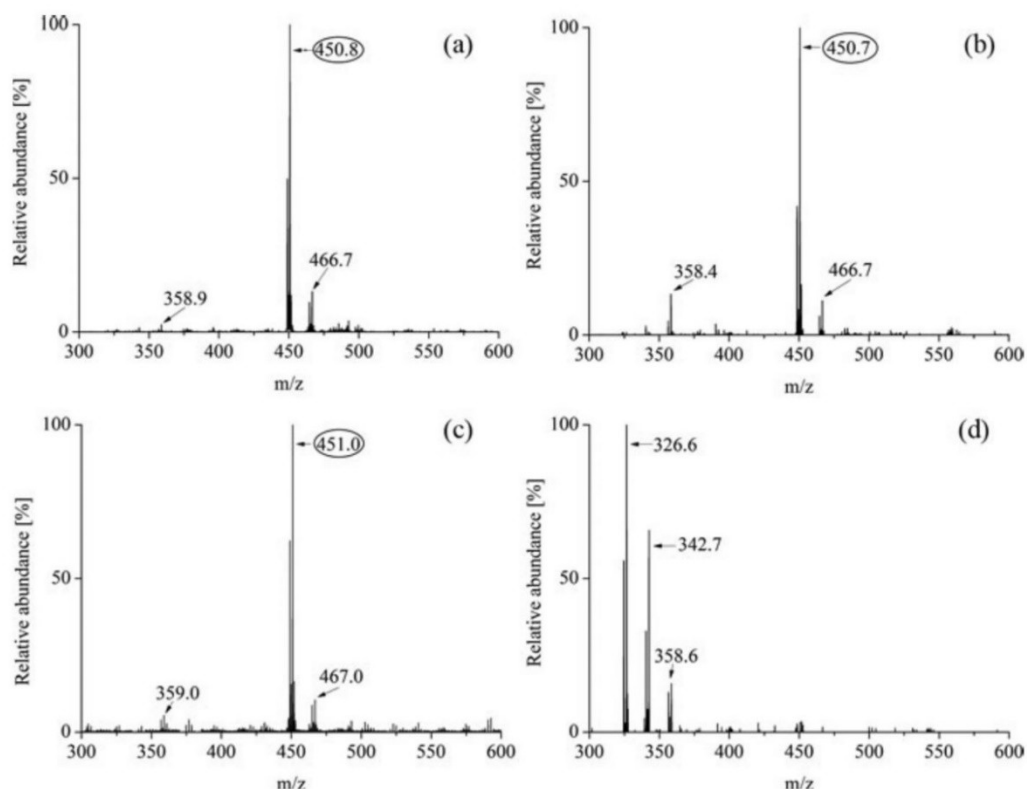


Figure 4. Negative ion mass spectra of $\sim 5 \times 10^{-6}$ molar bis(1,2,3-trihydroxybenzene)oxorhenium(-); (a) ESI, (b) APPI, (c) LDI, and (d) ESI-MS/MS. Molecular ion peaks are circled.

It is evident that all ionization techniques provide abundant molecular ions for the complexes, residual reactants, and reaction by-products in corresponding reaction mixtures. Evident isotope pattern proximity between calculated and experimental ESI spectra of bis(2,3-dihydroxynaphthalene)oxorhenium(-) complex is documented in Figure 6.

ESI-MS, APPI-MS, and LDI-MS

By ESI and APPI, it was possible to detect negatively charged intact molecular anions $[M]^-$. The complexes showed similar behavior under ESI conditions: abundant molecular anions as base peaks and minor fragment peaks. Recorded spectra were simple and provided direct information about the structure of the complexes and the presence of residual reactants and reaction by-products. No dimeric and other cluster structures were observed. The extent of possible ligand exchange with acetonitrile as a solvent was negligible. Comparison of ESI and APPI spectra showed no evidence of ions arising from electrochemical processes in the course of ESI ionization. Direct comparison of minor differences in ion intensities was difficult due to different tuning procedures used for the types of ionization. Evidently, different tuning procedures discriminated ions in a different manner and made the direct comparison of intensities impossible. Concerning the ion 343 m/z (fragment of Re-catechol complex), its higher relative intensity in APPI is due to a higher response

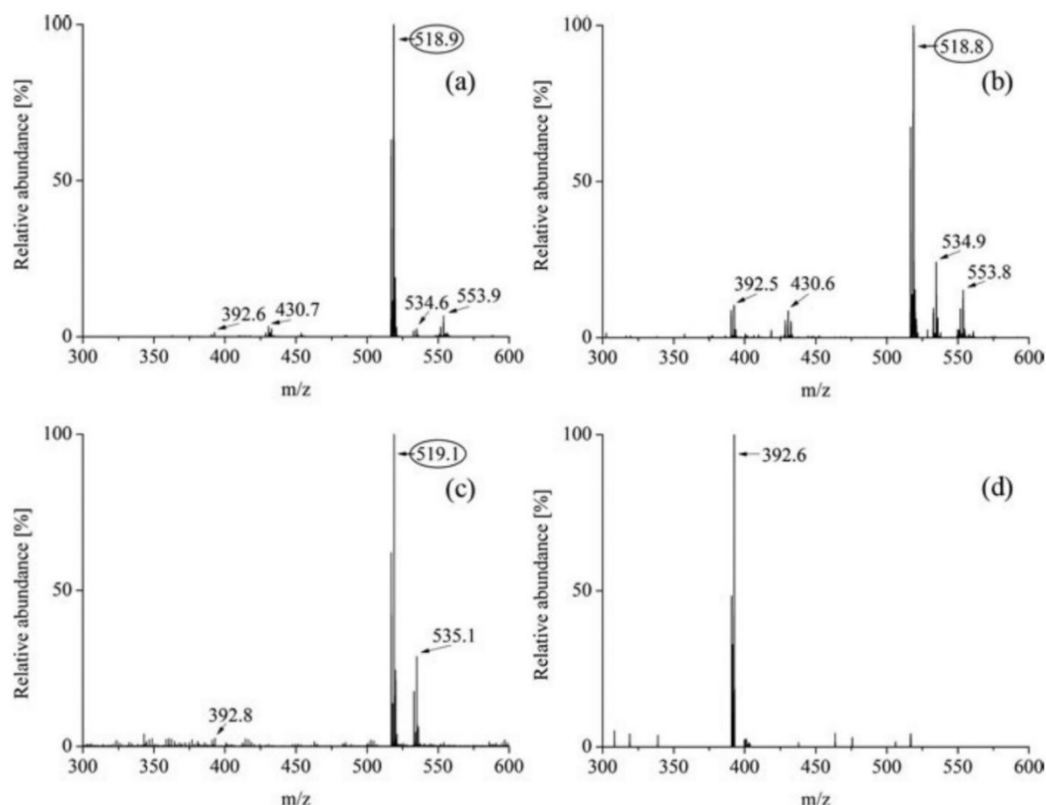


Figure 5. Negative ion mass spectra of $\sim 5 \times 10^{-6}$ M bis(2,3-dihydroxynaphthalene)oxorhenium(-); (a) ESI, (b) APPI, (c) LDI, and (d) ESI-MS/MS. Molecular ion peaks are circled.

factor or more pronounced fragmentation in course of photoionization. Moderate increases of the fragment ion intensities for APPI were also observed for the other complexes.

Due to the presence of O-substituted aromatic ligands, the complexes studied in this work showed strong absorption in the ultraviolet, particularly at 337 nanometers and, in principle, did not require the addition of a matrix. In contrast to previously reported MALDI and LDI work on rhenium complexes (Petroselli et al. 2012), we observed abundant negatively charged molecular ions as base peaks.

Table 1. Summary of observed ions in prepared complexes with abundancies higher than 5 percent of corresponding base peak intensity and listed by increasing mass to charge ratio (m/z)

Bis(1,2-dihydroxybenzen)			Bis(1,2,3-trihydroxybenzene)			Bis(2,3-dihydroxynaphthalene)		
oxorhenium(-)			oxorhenium (-)			oxorhenium(-)		
Entry	m/z	Formula	Entry	m/z	Formula	Entry	m/z	Formula
1*	311	ReC ₆ H ₄ O ₃	7*	327	ReC ₆ H ₄ O ₄	12*	393	ReC ₁₀ H ₆ O ₅
2	327	ReC ₆ H ₄ O ₄	8*	343	ReC ₆ H ₄ O ₅	13	431	ReC ₁₀ H ₆ O ₃ Cl ₂
3*	343	ReC ₆ H ₄ O ₅	9*	359	ReC ₆ H ₄ O ₆	14	519	ReC₂₀H₁₂O₅
4	381	ReC ₆ H ₄ O ₃ Cl ₂	10	451	ReC₁₂H₈O₇	15	535	ReC ₂₀ H ₁₂ O ₆
5	419	ReC₁₂H₈O₅	11	467	ReC ₁₂ H ₈ O ₈	16	554	ReC ₂₀ H ₁₂ O ₅ Cl
6	435	ReC ₁₂ H ₈ O ₆						

*Identified by ESI-MS/MS as fragment ions. Desired products are highlighted in bold.

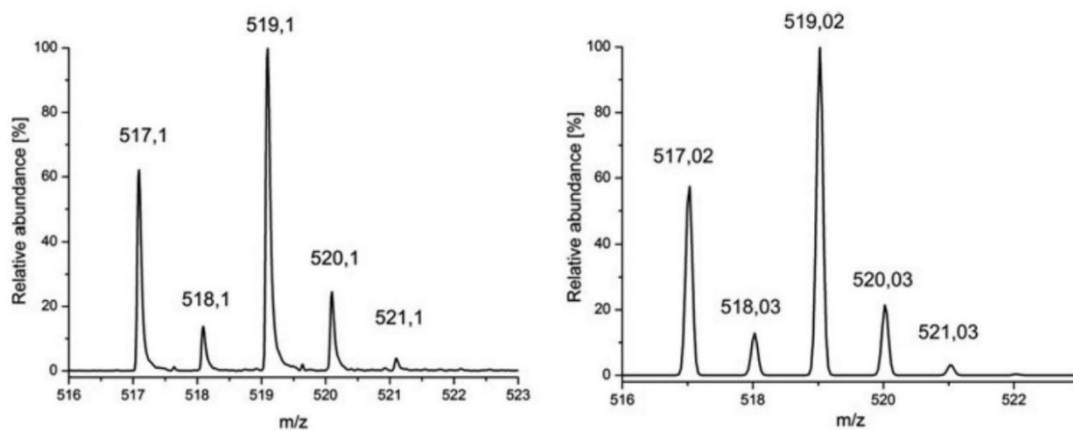
Table 2. Experimental (exp.) and calculated (calc.) relative intensities (I %) of ions in isotopic clusters and evaluated values of similarity indexes (SI) expressed as (1-SI)100

Complex	Molecular Formula	m/z	ESI		APPI		LDI	
			I percent calc.	I percent exp.	I percent calc.	I percent exp.	I percent calc.	I percent exp.
bis(1,2-dihydroxybenzen) oxorhenium(-)	C ₁₂ H ₈ O ₅ Re	417	59.1	56.9	59.1	56.9	59.1	53.4
		418	7.8	4.2	7.8	4.2	7.8	9.5
		419	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		420	13.2	14.1	13.2	14.1	13.2	10.6
		421	1.8	0.4	1.8	0.4	1.8	0.7
			(1 - SI)100 = 91.9		(1 - SI)100 = 91.9		(1 - SI)100 = 89.0	
bis(1,2, 3-trihydroxybenzene) oxorhenium(-)	C ₁₂ H ₈ O ₇ Re	449	58.9	49.8	58.9	41.9	58.9	62.3
		450	7.9	20.4	7.9	8.3	7.9	15.6
		451	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		452	13.3	11.9	13.3	16.5	13.3	16.5
		453	2.2	0.1	2.2	2.0	2.2	3.8
			(1 - SI)100 = 74.9		(1 - SI)100 = 79.1		(1 - SI)100 = 84.2	
bis(2,3-dihydroxy-naphthalene) oxorhenium(-)	C ₂₀ H ₁₂ O ₅ Re	517	58.6	63.0	58.6	67.5	58.6	62.1
		518	12.9	11.5	12.9	13.8	12.9	13.8
		519	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		520	21.8	19.0	21.8	15.4	21.8	24.5
		521	3.3	3.0	3.3	5.9	3.3	3.9
			(1 - SI)100 = 91.1		(1 - SI)100 = 81.1		(1 - SI)100 = 92.3	

This is probably due to high stability of these studied complexes, together with the absence of matrix promoting photochemically induced dissociation reactions.

ESI-MS/MS

ESI-MS/MS provided essential information about fragments arising from molecular ions of studied complexes, making it possible to distinguish among fragment ions and the ions arising from compounds present in reaction mixture.

**Figure 6.** Experimentally (left) and theoretical (right) isotopic patterns of the bis(2,3-dihydroxynaphthalene) oxorhenium(-) molecular ion cluster.

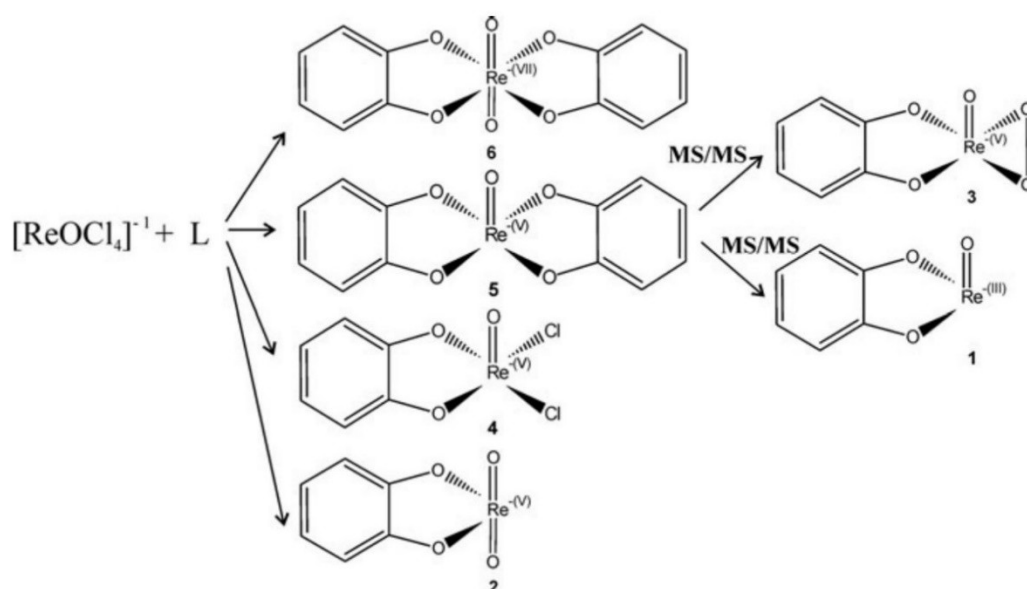


Figure 7. Molecular and fragment ions in the bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium(-) reaction by ESI-MS and ESI-MS/MS.

In some cases, chemical reactions and fragmentation processes yielded the same ionic structures. The spectra of ions arising from ESI-MS/MS fragmentation of complex molecular ion as a parent ion are shown in Figures 3, 4, and 5. Ionic structures in bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium(-) (5) reaction mixture are summarized in Figure 7. It may be concluded that (1) and (3) are fragments, (4) is a molecular

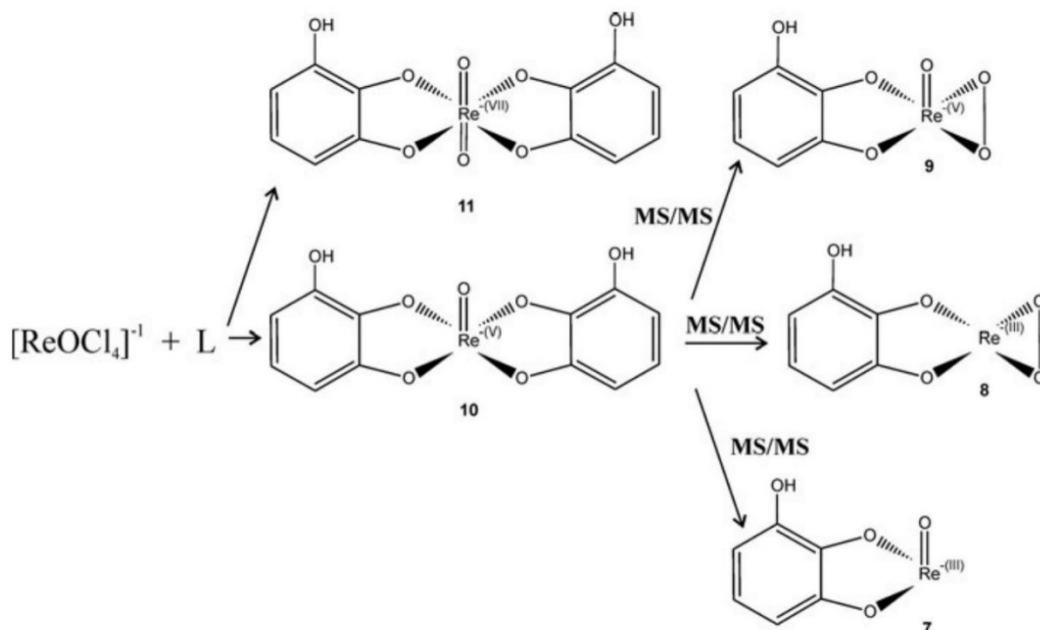


Figure 8. List of molecular and fragment ions in the bis(1,2,3-trihydroxybenzene)oxorhenium(-) reaction by ESI-MS and ESI-MS/MS.

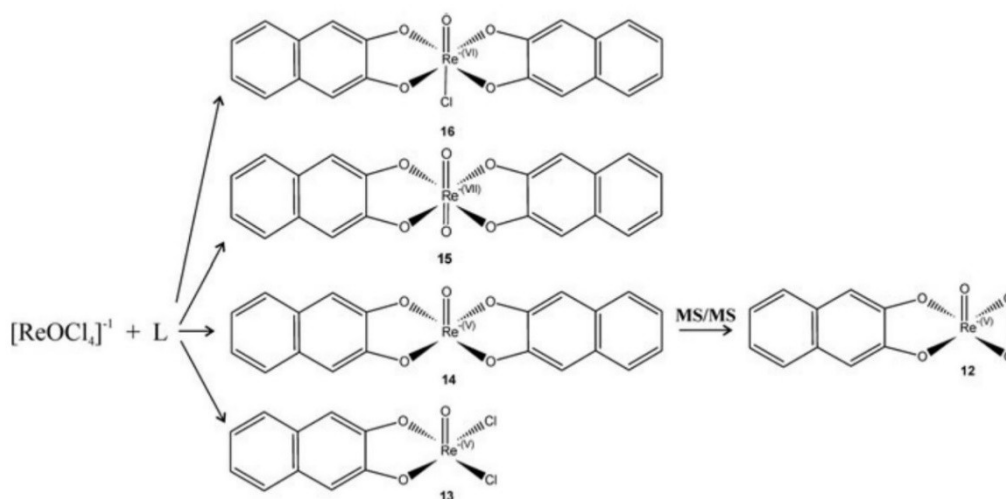


Figure 9. List of molecular and fragment ions in the bis(2,3-dihydroxynaphthalene)oxorhenium(-) reaction by ESI-MS and ESI-MS/MS.

ion of an intermediate of complex forming reaction, and (2) and (6) correspond to di-oxo derivatives of a complex and its intermediate. The ionic structures detected in bis(1,2,3-trihydroxybenzene)oxorhenium(-) (10) reaction mixture are shown in Figure 8. Ions (7), (8), and (9) are fragments and (11) corresponds to di-oxo derivative. Ions detected in the bis(2,3-dihydroxynaphthalene)oxorhenium(-) reaction mixture are shown in Figure 9. Here the spectrum of ions corresponding to species accompanying the complex is quite rich and involves complex intermediates [(13) and (16)] and molecular ion of di-oxo derivative [(15)]. Ion (12) was the only MS/MS fragment observed.

In general, MS/MS fragmentation pathways are straightforward. Daughter ions were formed predominantly by a cleavage of the aromatic part on a single ligand [(3), (9), and (12)] or by a loss of entire ligand [ML] [(1) and (7)]. However, the latter mentioned fragmentation mechanism was not observed for the bis(2,3-dihydroxynaphthalene)oxorhenium(-) complex as the most stable. For bis(1,2,3-trihydroxybenzene)oxorhenium(-), the ion at m/z 327 may be rationalized by a loss of oxygen from (9). Complementary APPI-MS/MS experiments did not reveal differences in fragmentation pathways; the spectra of daughter ions were nearly identical.

CONCLUSIONS

Mass spectrometry using electrospray ionization, atmospheric pressure photoionization, and laser desorption/ionization was shown to be useful for structural characterization of rhenium complexes with phenolic ligands and for other compounds present in reaction mixtures in course of complex preparation. The mass spectra obtained gave unambiguous information about molecular weights and the structures of the compounds because intact molecular ions and structurally characteristic fragments were observed. Direct information about the composition of the reaction mixture was accessible without, in principle, problematic and laborious

chromatographic separation. The uncertainty of correct structural characterization of observed ions, based on low-resolution MS data, was greatly reduced by the complementary evaluation of characteristic isotopic patterns and comparison with theoretical profiles.

The synthesis of three structurally similar rhenium complexes prepared by the reaction of rhenium precursor tetrabutylammonium-tetrachlorooxorhenate with aromatic alcohol ligands; 1,2-dihydroxybenzene, 1,2,3-trihydroxybenzene, and 2,3-dihydroxynaphthalene was performed in acetonitrile. In addition, complexes of bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium(-), bis(1,2,3-trihydroxybenzene)oxorhenium(-), and bis(2,3-dihydroxynaphthalene)oxorhenium(-) were characterized by ^1H NMR and infrared spectroscopy. Comparisons of data available from these methods clearly demonstrated the reliability and information obtained by mass spectrometry.

One may conclude that mass spectrometry utilizing soft ionization techniques is powerful for monitoring complex formation reaction kinetics and their stabilities. Representative spectra were recorded for micromolar concentrations of the analytes. Though it is less suitable for characterization of closely related structures, such as *cis* and *trans* isomers, its sensitivity is superior to commonly used NMR making it unique for real clinical and pharmacokinetic studies. The ESI-MS/MS results provide an initial understanding of the mechanism of rhenium oxo-complex fragmentation.

FUNDING

This work was supported by Charles University project SVV 260205.

REFERENCES

- Abrams, M. J., and B. A. Murrer. 1993. Metal compounds in therapy and diagnosis. *Science* 261: 725–30. doi:10.1126/science.8102010
- Alberto, R. 1996. Technetium and rhenium. *Topics in Current Chemistry* 176: 150–84.
- Bandoli, G., A. Dolmella, T. I. A. Gerber, D. Mpinda, J. Perils, and J. G. H. du Preez. 2002. Complexes of oxorhenium (V) with aromatic 2-amino-alcohols. *Journal of Coordination Chemistry* 55(7): 823–33. doi:10.1080/0095897022000001575
- Blower, P. J., J. Singh, S. E. M. Clarke, M. M. Bisundan, and M. J. Went. 1990. Preparation and characterisation of pentavalent Rh-186 DMSA. A possible tumour therapy agent. *Journal of Nuclear Medicine* 31: 212–13.
- Booyen, I., T. I. A. Gerber, E. Hostem, and P. Mayer. 2007. Monodentate imido coordination of 2-aminodiphenylamine to rhenium(V). *Journal of Coordination Chemistry* 60: 1749–53. doi:10.1080/00958970601151273
- Chen, L. C., K. Nishidate, Y. Saito, K. Mori, D. Asakawa, S. Takeda, T. Kubota, N. Terada, Y. Hashimoto, H. Hori, and K. Hiraoka. 2008a. Application of probe electrospray to direct ambient analysis of biological samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22: 2366–74. doi:10.1002/rcm.3626
- Chen, L. C., K. Nishidate, Y. Saito, K. Mori, D. Asakawa, S. Takeda, T. Kubota, N. Terada, Y. Hashimoto, H. Hori, and K. Hiraoka. 2008b. Characteristics of probe electrospray generated from a solid needle. *The Journal of Physical Chemistry B* 112: 11164–70. doi:10.1021/jp803730x
- Colton, R. 1965. *The chemistry of rhenium and technetium*. London. UK: Interscience.

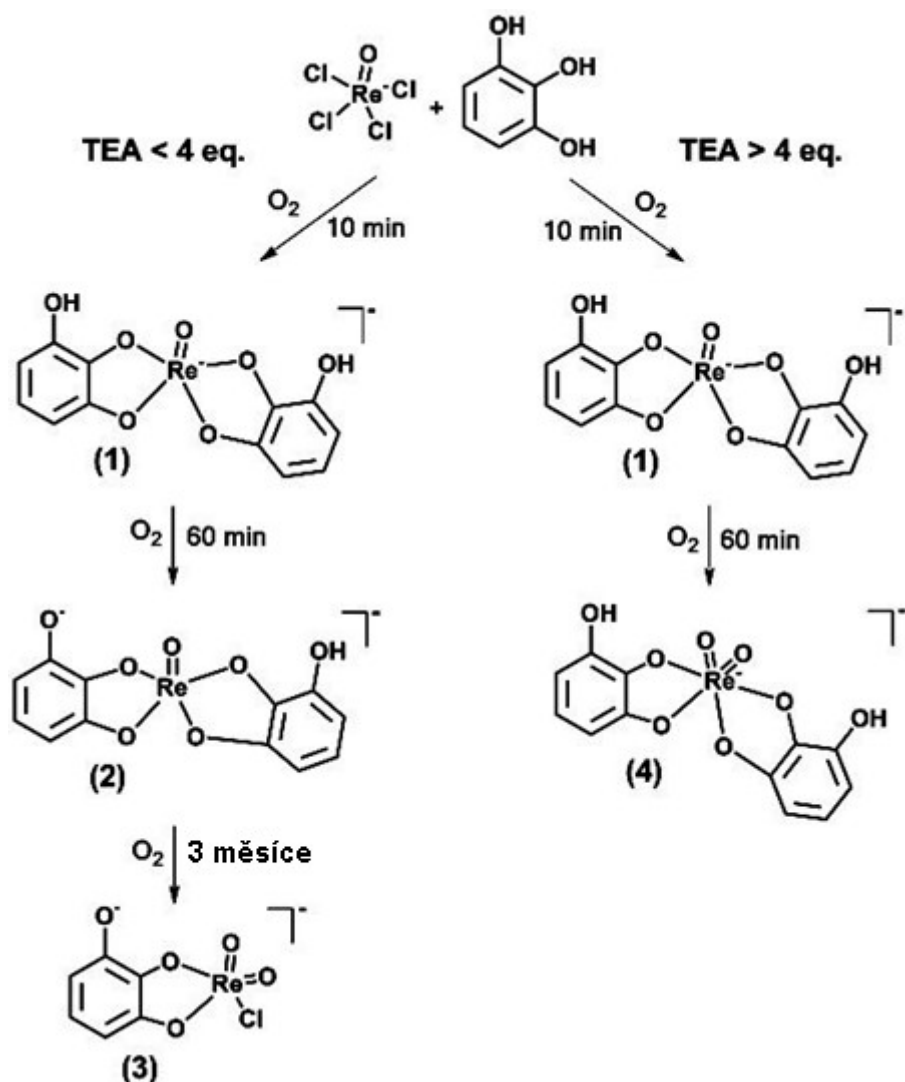
- Day, E. F., T. A. Payne, and C. A. Holt. 2007. Mass spectrometric study of dirhenium biscarboxylate: Purine dinucleotide complexes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21: 903–10. doi:10.1002/rcm.2910
- de Souza, E. J., A. G. A. Fernandes, P. I. S. Maia, S. S. Lemos, J. Ellena, U. Abram, and V. M. Deflon. 2010. Oxorhenium(V) complexes with 2,3-dihydroxynaphthalene. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* 636: 2467–70. doi:10.1002/zaac.201000156
- Dilworth, J. R., and S. J. Parrott. 1998. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chemical Society Reviews* 27: 43–55. doi:10.1039/a827043z
- Gerber, T. I. A., D. G. Luzipo, and P. Mayer. 2004. Formation of an oxo-free rhenium(v) complex with 2-aminophenol. *Journal of Coordination Chemistry* 57: 1393–98. doi:10.1080/00958970412331300069
- Gerber, T. I. A., D. G. Luzipo, and P. Mayer. 2006. Monodentate imido and bidentate aminophenolate coordination of 2-aminophenol in rhenium(V) complexes. *Journal of Coordination Chemistry* 59: 1055–62. doi:10.1080/00958970500410432
- Gerber, T. I. A., and P. Mayer. 2005. Versatility of bidentate aniline derivatives as ligands for rhenium (V) and technetium (V). *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences* 6: 165–68. doi:10.14494/jnrs2000.6.3_165
- Gerloch, M., and E. G. Constable. 1994. *Transition metal chemistry*. Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Henderson, W., and J. S. McIndoe. 2005. *Mass spectrometry of inorganic, coordination and organometallic compounds: Tools – Techniques – Tips*. Wiltshire, UK: Wiley.
- Henderson, W., B. K. Nicholson, and L. J. McCaffrey. 1998. Applications of electrospray mass spectrometry inorganometallic chemistry. *Polyhedron* 17: 4291–13. doi:10.1016/s0277-5387(98)00246-0
- Hori, H., J. Ishihara, K. Koike, K. Takeuchi, T. Ibusuki, and O. Ishitani. 1997. Electrospray mass-spectrometric detection of neutral rhenium bipyridine complexes using NaNO₃ as an ionization agent. *Chemistry Letters* 3: 273–74. doi:10.1246/cl.1997.273
- Hori, H., O. Ishitani, K. Koike, K. Takeuchi, and T. Ibusuki. 1996. Electrospray mass spectrometric detection of unstable rhenium complexes as reaction intermediates of photochemical CO₂-fixation. *Analytical Sciences* 12: 587–90. doi:10.2116/analsci.12.587
- Machura, B., and J. Kusz. 2008. Synthesis, spectroscopic characterisation, crystal and molecular structure of [ReOBr(quin-2-c)2] and [ReOCl(quin-2-c)2] complexes: DFT and TD-DFT calculations for [ReOBr(quin-2-c)2]. *Polyhedron* 27: 187–95. doi:10.1016/j.poly.2007.09.010
- Machura, B., M. Wolff, and I. Gryca. 2014. Rhenium(V) oxocomplexes [ReOX(N–O)2] and [ReOL(N – O)2]⁺ – Synthesis, structure, spectroscopy and catalytic properties. *Coordination Chemistry Reviews* 275: 154–64. doi:10.1016/j.ccr.2014.05.012
- Petroselli, G., M. K. Mandal, L. C. Chen, G. T. Ruiz, E. Wolcan, K. Hiraoka, H. Nonami, and R. Erra-Balsells. 2012. Mass spectrometry of rhenium complexes: A comparative study by using LDI-MS, MALDI-MS, PESI-MS and ESI-MS. *Journal of Mass Spectrometry* 47: 313–21. doi:10.1002/jms.2965
- Tisato, F., C. Bolzati, M. Porchia, and F. Refosco. 2004. Contribution of electrospray mass spectrometry for the characterization, design, and development of nitrido technetium and rhenium heterocomplexes as potential radiopharmaceuticals. *Mass Spectrometry Reviews* 23: 309–32. doi:10.1002/mas.20000
- Traeger, J. C. 2000. Electrospray mass spectrometry of organometallic compounds. *International Journal of Mass Spectrometry* 200: 387–401. doi:10.1016/s1387-3806(00)00346-8
- Tubaro, M., E. Marotta, P. Traldi, C. Bolzati, M. Porchia, F. Refosco, and F. Tisato. 2004. ESI/MSn in the structural characterisation of some nitrido-Re heterocomplexes. *International Journal of Mass Spectrometry* 232: 239–47. doi:10.1016/j.ijms.2003.11.005
- Volkert, W. A., and E. A. Deutsch. 1993. *Advances in metals in medicine*. State College, PA: JAI Press.

- Wan, K. X., I. Vidavsky, and M. L. Gross. 2002. Comparing similar spectra: From similarity index to spectral contrast angle. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 13: 85–88. doi:10.1016/s1044-0305(01)00327-0
- Wyatt, M. F. 2011. MALDI-TOFMS analysis of coordination and organometallic complexes: A nic(h)e area to work in. *Journal of Mass Spectrometry* 46: 712–19. doi:10.1002/jms.1957
- Wyatt, M. F., B. K. Stein, and A. G. Brenton. 2006. Characterization of various analytes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile matrix. *Analytical Chemistry* 78: 199–206. doi:10.1021/ac050732f

5.2 Analytická studie komplexů rhenia s aromatickými ligandy metodou UV/Vis spektrometrie a ESI-MS (komentář k publikaci II a III)

Cílem publikace II a III bylo detailní prostudování vzniku komplexů při reakci rheniového prekurzoru s aromatickými ligandy a optimalizace přípravy komplexů. Pro tyto účely byla využita technika ESI/MS a UV-Vis absorpční spektrometrie. Byly vyzkoušeny dvě alternativní metody přípravy: (1) reakce za laboratorní teploty s přidavkem triethylaminu jako akcelerátoru a (2) reakce za varu na olejové lázni po dobu 60 minut s následným zráním reakční směsi za laboratorní teploty. Jako rozpouštědlo byl použit acetonitril. Obě techniky přípravy poskytly v krátkém časovém intervalu rozdílné reakční meziprodukty. Při delším čase stání za laboratorní teploty však obě techniky poskytly stejné finální produkty. V rámci optimalizace syntézy požadovaných produktů byl detailně prozkoumán vliv přidavku triethylaminu (TEA) jako akcelerátoru reakce do reakční směsi na rychlost tvorby $\text{Re}^{+\text{VII}}$ komplexu se dvěma navázanými ligandy jako finálního produktu reakce.

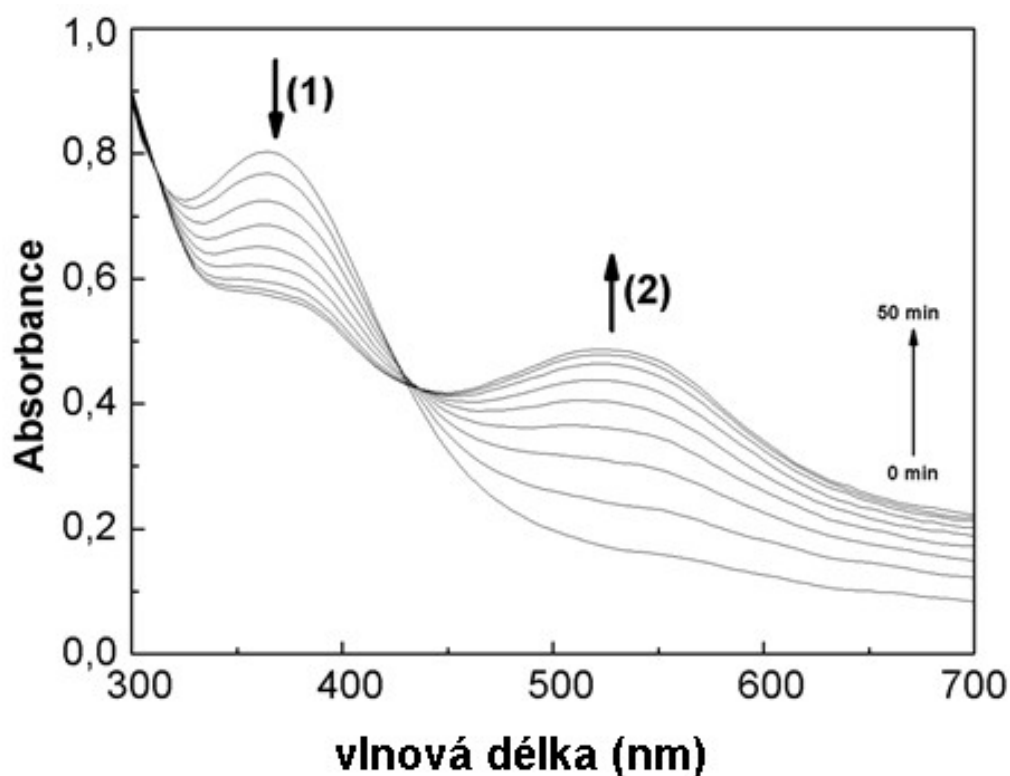
Při reakcích prováděných s 1,2,3-trihydroxybenzenem jako ligandem za laboratorní teploty v acetonitrilu s přidavkem akcelerátoru TEA se ukázal jako rozlišující přídavek TEA v nadbytku 4 ekvivalentů vzhledem k látkovému množství prekurzoru. Jak je ukázáno na obrázku 5.6, při přidavku TEA nižším než 4 eq. se vytvoří jako finální produkt 1,2,3-trihydroxybenzen-chloro-dioxorhenium^{+VII}, zatímco při přidavku vyšším než 4 eq. se stává dominantním produktem reakce bis(1,2,3-trihydroxybenzen)-dioxorhenium^{+VII}.



Obr. 5.6 Reakční schéma a výsledná struktura připravených komplexů rhenia s 1,2,3-trihydroxybenzenem v závislosti na nadbytku přidávaného akcelérátoru TEA do reakční směsi. Reakce probíhaly za přístupu vzduchu, příslušné reakční časy jsou uvedeny vedle šipek. Symbol O_2 naznačuje kyslíkaté prostředí reakce.

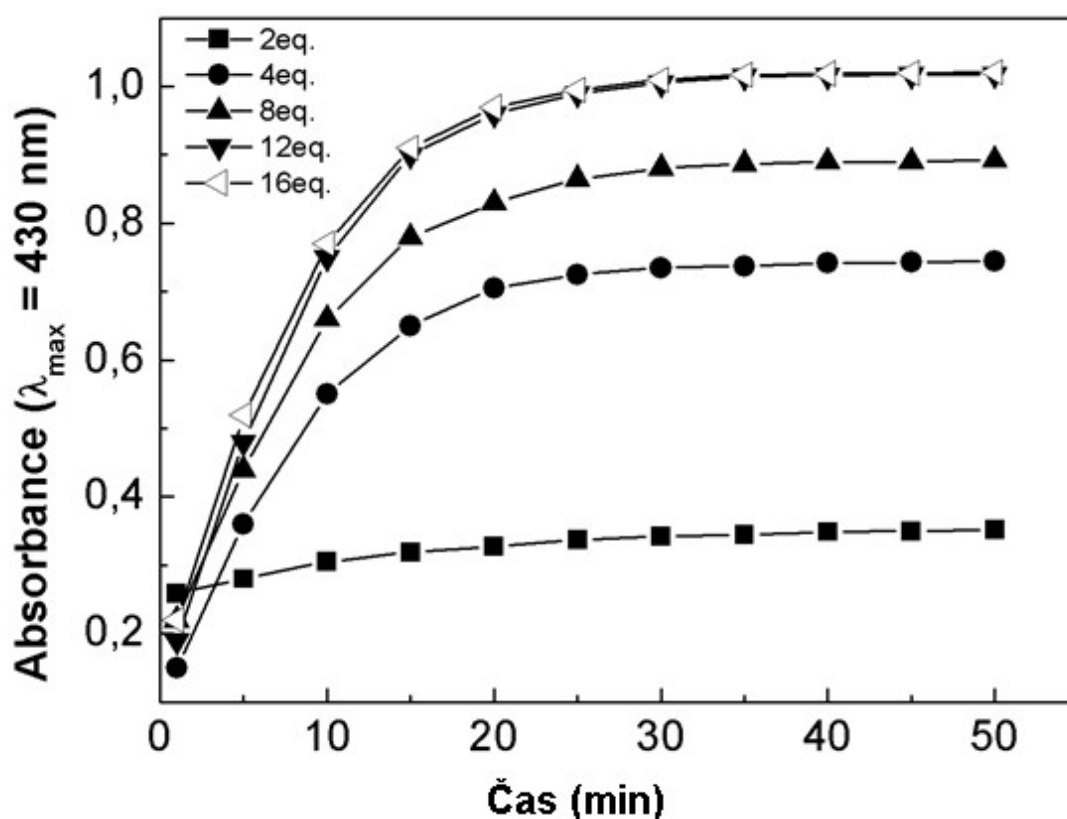
Akcelérátor TEA vystupuje v reakcích jako báze, která je schopná neutralizace chlorovodíku vzniklého jako vedlejší reakční produkt z rheniového prekurzoru. Nízký nebo nulový obsah TEA v reakční směsi významně snižuje rychlost reakce prekurzoru s ligandem a zvyšuje pravděpodobnost výměny ligandu za chloridové ionty. Při obou reakčních cestách dochází k postupné změně oxidačního čísla rheniového iontu z +V na +VII při zachování struktury a počtu vázaných ligandů.

Reakční směsi obsahující dominantní rheniové komplexy bis(1,2,3-trihydroxybenzen)-oxorhenium^{+V} (na obrázku 5.6 číslo **1**) a bis(1,2,3-trihydroxybenzen)-oxorhenium^{+VI} (na obrázku 5.6 číslo **2**) se díky rozdílnému oxidačnímu číslu rhenia výrazně liší svým zbarvením. Vzhledem k rozdílné barevnosti obou komplexů bylo možné sledovat přeměnu z komplexu **1** na komplex **2** metodou UV/Vis spektrometrie. Série absorpčních spekter snímaných v pětiminutových časových intervalech po dobu padesáti minut, uvedená na obrázku 5.7, dokumentuje přeměnu žlutě zbarveného komplexu **1** na červený komplex **2**. Reakce probíhá za laboratorní teploty v přítomnosti 2 ekvivalentů TEA.



Obr. 5.7 UV/Vis záznam přeměny komplexu bis(1,2,3-trihydroxybenzen)-oxorhenium^{+V} na bis(1,2,3-trihydroxybenzen)-oxorhenium^{+VI}. Reakční podmínky: 2 eq. TEA; časové intervaly $\Delta t = 5$ min

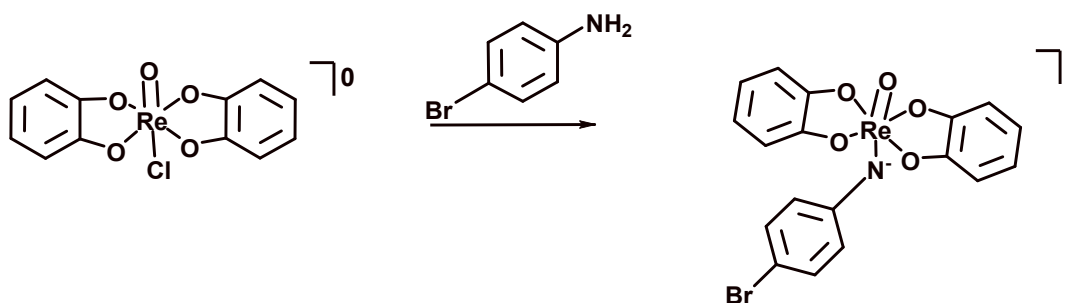
Vliv závislosti množství TEA přidaného do reakční směsi na rychlosti reakce přeměny komplexu **1** na komplex **4** byl sledován metodou UV/Vis spektrometrie na základě nárůstu absorbance komplexu bis(1,2,3-trihydroxybenzen)-dioxorhenium^{+VII} **4** při 430 nm. Vliv závislosti přídavku TEA na rychlost reakce byl zkoumán v rozmezí 2 - 16 ekvivalentů TEA vzhledem k látkovému množství prekursoru. Z obrázku 5.8 je patrné, že nejrychleji reakce probíhá při 12 nebo 16 ekvivalentech TEA, nicméně rozdíl mezi 12 a 16 ekvivalenty je téměř zanedbatelný. K největší změně v rychlosti reakce dochází mezi 2 a 8 ekvivalenty, kdy rozdíl v absorbancích odečítaných ve stejném časovém horizontu je téměř čtyřnásobný.



Obr. 5.8 Časová závislost absorbance odečtené při 430 nm, odpovídající absorpčnímu maximu komplexu bis(1,2,3-trihydroxybenzen)-dioxorhenium^{+VII}, v reakční směsi obsahující 2-16 ekvivalentů TEA. Počáteční koncentrace: 1,42 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ prekursor a 3,81 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ligand.

Všechny vzniklé komplexy v reakcích prekursoru s ligandy byly strukturálně charakterizovány metodou hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické resonance. Reakční schéma dokumentující reakci rheniového prekursoru s 1,2-dihydroxybenzenem jako ligandem včetně NMR spekter jednotlivých komplexů (necharakterizovaných v publikaci I) je ukázáno v sekci Přílohy II/1-2.

Stejně jako v případě reakcí rheniového prekursoru s 1,2,3-trihydroxybenzenem, i při reakcích s 1,2-dihydroxybenzenem hrálo důležitou roli množství přidaného triethylaminu jako akcelérátoru do reakční směsi. Rozdílovým z hlediska tvorby reakčních produktů se opět ukázal přídavek přebytku 4 ekvivalentů TEA vzhledem k látkovému množství rheniového prekursoru (reakční schéma v sekci Přílohy II/3). Při přídavku TEA vyšším než 4 ekvivalenty došlo k tvorbě finálního produktu bis(1,2-dihydroxybenzen)-dioxorhenia^{+VII}. Pokud byl přídavek TEA menší než 4 ekvivalenty, výsledným produktem reakce byl komplex bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium s rheniovým atomem v +VI oxidačním stupni. Tento komplex velmi zvolna přechází na komplex bis(1,2-dihydroxybenzen)-chloro-oxorhenia vzniklým pravděpodobně výměnou atomu kyslíku za atom chloru a změnou oxidační stupně rhenia na +VII. Vzhledem ke své elektroneutralitě nebylo možné tento komplex charakterizovat metodou ESI-MS přímo, ale až po jeho derivatizaci *p*-bromanilinem za vzniku komplexu N-(bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium)-parabromanilinu. Reakční schéma derivatizace je znázorněno na obrázku 5.9.



Obr. 5.9 Schéma reakce komplexu bis(1,2-dihydroxybenzen)-chloro-oxorhenium s *p*-bromanilinem za vzniku N-(bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium)-parabromanilinu vhodného k ESI-MS stanovení

Přibližné struktury v obou cestách zastoupených rheniových komplexů byly vytvořeny na základě získaných dat z hmotnostního spektrometru a NMR a překresleny do 3D podoby programem MolView (přiloženy v sekci Přílohy II/4-8).

Závěrem je možno konstatovat, že informace z publikací II a III přispěly ke znalosti reakčních mechanismů, kinetiky vzniku a stability rheniových komplexů s aromatickými ligandy. Výsledky ukázaly na ochotu primárně vzniklých rheniových komplexů přecházet v komplexy jiné a to v rámci oxidačních reakcí a výměnných reakcí ligandů. Výrazné rozdíly v barevnosti různých rheniových komplexů umožnily pro studium kinetiky jejich přeměn využít UV/Vis absorpční spektrofotometrii, jejíž výsledky vyznamně doplnily ESI-MS měření.

PUBLIKACE II

Název	<i>Analytical study of rhenium complexes with pyrogallol and catechol</i>
Autoři	Šticha Martin Kaliba David Jelínek Ivan Poláková Jana
Časopis	Chemical Papers
Volume:Issue	71:4
Stránky	819-830
Rok	2017

Analytical study of rhenium complexes with pyrogallol and catechol

Martin Štícha¹ · David Kaliba² · Ivan Jelínek² · Jana Poláková¹

Received: 14 April 2016 / Accepted: 8 September 2016 / Published online: 8 December 2016
© Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2016

Abstract Selected rhenium complexes with pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene) and catechol (1,2-dihydroxybenzene) as strongly bound ligands were prepared by a reaction of rhenium precursor tetrabutylammonium-tetrachlorooxorhenate with twofold molar excess of ligand in presence of various amounts of triethylamine. The structures of formed complexes and their consequent reaction products were estimated by means of mass spectrometry with electrospray ionization. The kinetics of reactions in course of complex formation and consequent decomposition were primarily followed by UV–Vis absorption spectra measurement, complemented by single or continuous electrospray mass spectrometry analyses.

Keywords Rhenium complexes · Mass spectrometry · ESI-MS · Structural analysis · UV–Vis absorption spectrometry · Reaction kinetics

Abbreviations

Symbols

SI Similarity index

Subscripts

PG	Pyrogallol
Cat	Catechol
Re	Rhenium
O	Oxygen
Cl	Chlorine
Bu	Butyl
ESI-MS	Mass spectrometry with electrospray ionization
TEA	Triethylamine
UV–vis	Ultraviolet–visible absorption spectrometry
EIC	Extracted ion current

Introduction

Rhenium complexes composed of β -emitting ^{186}Re and ^{188}Re isotopes coordinated with suitable organic ligand gain increased interest in radiopharmaceutical medicine. Besides suitable radiological properties given by a metal ion itself, detailed knowledge of overall chemical properties of formed complexes, namely their exact structures, chemical stabilities and possible degradation pathways are essential pre-requisites for their clinical application. It should be noted that substantial information is accessible from experiments with non-radioactive analogues. Present nuclear medicine frequently uses transition metal-based radiopharmaceuticals injected to patient's body in a form of short half-life radionuclide ion coordinated with suitable organic ligand (Abrams and Murrer 1993; Schrotterova and Nekovar 2006). Much alike other human drugs, radio-diagnostic agents must obey strict rules requesting detailed analytical information about the composition of applied formulation. As they are commonly administered in forms of reaction mixtures, the determination of their actual composition, depicting the structures of individual

✉ Martin Štícha
sticha@natur.cuni.cz

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

complexes and their degradation products, might be extremely difficult.

Rhenium complexes composed of β -emitting ^{186}Re and ^{188}Re isotopes coordinated with a suitable ligand start to play important role in radiopharmaceutical medicine, as targeted radio-diagnostics and palliative agents in bone antitumor therapy. Both metals possess close chemical properties (Gerloch and Constable 1994; Colton 1965). They show, in their compounds, a wide variety of oxidation states ranging from (–I) to (+VII) and form both cationic and anionic species with strong oxidizing to mild reducing properties. As other transition metals, they form stable coordination complexes with numerous inorganic and organic ligands, the stability of whose depend on actual redox states and properties of central metal ion and coordinated ligands. Perrhenate and pertechnetate are common starting material for the preparation of coordination complexes with organic ligands. Their ability to coordinate organic ligands and form stable complexes is insufficient; they have to be selectively reduced prior to complex formation. Reliable and reproducible procedure, yielding rhenium coordination complex with favorable chemical and pharmacological properties as a dominant reaction product still remains a crucial breakthrough waiting to be achieved. Successful attempt to eliminate reduction step and bind perrhenate ion in porphyrin inclusion complex has been described (Konirova et al. 2003); however, its clinical perspective has not been studied yet.

The spectrum of suitable analytical methods allowing to cover individual complexes arising and else decomposing in reaction mixture is rather restricted. As a consequence, there is a lack of exact analytical data describing individual chemical reactions between Re(V) species with various ligands and other components present in a reaction mixture. Accordingly, relevant data about the stabilities of the complexes and their possible decomposition routes are missing. Evidently, standard methods of structure analysis, such as X-ray diffractometry, nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared spectrometry (IR), are of limited use (Nicholson et al. 2003; Valliant et al. 2001; Shaker et al. 2010; Kowalczyk and Szyrkowska 2012), as they are not suitable for analyses in mixtures. Clinical practice often relies on thin-layer chromatography with radiochemical detection as a technique making it possible to distinguish between initial perrhenate and formed complex, with additional details remaining hidden. The use of more selective analytical techniques, such as high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis revealed more detailed information about intricacy of processes proceeding in a reaction mixture within the time span of its clinical applicability (Koudelkova and Jedínakova-Krizova 2003; Kohlíckova et al. 1999; Kohlíckova-Koudelkova et al. 2002).

Mass spectrometry with soft ionization techniques proved to be fast and reliable method for the structure characterization and quantification of various complexes. Electrospray ionization (ESI) usually provides mass spectra with dominant molecular ion and minor fragment ions (Henderson et al. 1998). As compared with NMR and IR techniques, electrospray mass spectrometry (ESI-MS) makes it possible to achieve substantially lower detection limits and is applicable to analytes in aqueous solutions (Hori et al. 1996, 1997; Fedorova et al. 2014; Tisato et al. 2004). Similarly, laser-induced photodesorption (LDI) and matrix-assisted photodesorption (MALDI) proved to effectively ionize the complexes, providing mass spectra with dominant molecular ions and low extent of fragmentation (Wyatt 2011; Wyatt et al. 2006). Atmospheric pressure photoionization (APPI) is, at present, the softest commercially available ionization technique that was successfully utilized for structure characterization of complexes (Van Berkel 2003). Low-energy UV lamp excitation light enables to generate intact molecular ions for kinetically labile analytes with negligible extent of fragmentation. The structure analysis of selected Re(+I) complexes by means of LDI, MALDI and ESI ionization can be found in Refs. (Petroselli et al. 2012; Day et al. 2007).

In our previous contribution (Sticha et al. 2015), we pointed out on suitability of low-resolution ESI-MS for fast and reliable structural identification of selected Re complexes in a mixture. We proved the existence of various complex species arising from reaction of Re(V) precursor with phenolic complex-forming ligands. The aim of this study is to investigate the kinetic behavior of major complex compounds arising from the reaction of tetrabutylammonium-tetrachlorooxorhenate with pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene) and catechol (1,2-dihydroxybenzene) as strongly bound ligands. Special aim is devoted to the study of subsequent chemical transformation of primarily formed Re(V) complexes leading to the variety of complex structures. ESI-MS kinetic data are compared to those obtained by conventional UV–Vis kinetic measurements. We believe that the acquired information on chemical structure of formed complexes and corresponding reaction rates will contribute to better knowledge of chemistry of Re coordination compounds with possible impact on proposal of diagnostic kits with improved properties.

Experimental

Materials and measurements

Tetrabutylammonium-tetrachlorooxorhenate [$(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)$] was purchased from Sigma-Aldrich (Gillingham, Dorset, UK). Pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene)

(99%) and catechol (1,2-dihydroxybenzene) (99%) ligands were purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Acetonitrile, HPLC-grade, was purchased from Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic). Triethylamine (TEA) and *p*-bromoaniline were purchased from Sigma-Aldrich (Gillingham, Dorset, UK) and used as a 10% (w/w) stock solution in acetonitrile. Electrospray tuning mix for ion trap was purchased from Agilent (Santa Clara, USA). Nitrogen used as a drying and nebulizing gas was delivered by LC-MS-NGM 11 nitrogen generator (Bruker Daltonics, Germany). Helium 4.6 was purchased from Linde Gas a.s. (Prague, Czech Republic).

Solid substances were weighted using Sartorius 7085011 microbalances (Sartorius GmbH, Gottingen, Germany).

Electrospray mass spectrometry experiments were conducted on an ion trap instrument Esquire 3000 (Bruker Daltonics, Germany) and controlled by the Esquire Control 5.3.11 software and data were processed via Data Analysis 3.3.56 software (Bruker Daltonics, Germany). ESI-MS data were collected in negative-ion mode at a scan range from *m/z* 300 to 650. In all ESI-MS measurements, the nebulizer gas pressure was 124.1 kPa at a flow rate of 5 L min⁻¹; the desolvation temperature was 300 °C and capillary voltage was adjusted to 4000 V. The sample solutions were delivered to nebulizer by a syringe pump (Cole Parmer, USA) at a flow rate of 8 μL min⁻¹.

UV-Vis absorption spectra were measured by Evolution 60 spectrometer (Thermo Scientific, USA), using 3-mL quartz cuvettes with 1 cm optical length and processed by means of VISIONlite Scan 5 software (Thermo Scientific, USA). The spectra were sequentially collected at selected time intervals in a range of 300–700 nm, with increment step 5 nm. The scheme, molecular formula and theoretical mass for each compound were collected by ChemSketch ACD labs (Canada) and IsotopePattern (Bruker Daltonics, Germany).

Preparation of complexes (I–IV) with pyrogallol ligand

Mixture of rhenium precursor tetrabutylammonium-tetrachlorooxorhenate [(*n*-Bu₄N)(ReOCl₄)] (1.76 mg, 1.0 μmol) and pyrogallol (0.76 mg, 2.0 μmol) was dissolved in acetonitrile (3 mL) at room temperature. After complete dissolution, 2–16 equivalents of TEA (8.4–52.5 μL of 10% TEA solution in acetonitrile) were added. Alternatively, for the purposes of long-term kinetic measurements, the reaction mixture without added TEA was prepared.

Preparation of complexes (V–IX) with catechol ligand

Reaction compounds [(*n*-Bu₄N)(ReOCl₄)] (1.76 mg, 1.0 μmol) and catechol (0.66 mg, 2.0 μmol) were dissolved in acetonitrile (3 mL) at room temperature. After complete dissolution, 2–16 equivalents of TEA (8.4–52.5 μL of 10% TEA solution in acetonitrile) were added. For ESI-MS determination of uncharged complex VII, *p*-bromoaniline (1.72 mg, 1.0 μmol) was added to the reaction mixture.

All prepared complexes are closer described in Table 1.

The similarity between the computed and experimental molecular ion isotopic clusters was evaluated on the basis of similarity indexes (SI) (Wan et al. 2002). Peak patterns with SI = 0 are identical. To obtain percentual expression of isotopic patterns similarity, values of 100-SI were evaluated. Theoretical isotopic patterns were generated via Data Analysis 3.3.56 software.

Table 1 Chemical names, labels and formulas of studied rhenium complexes

Entry	Complex	Label	Formula
I	Bis(1,2,3-trihydroxybenzene)oxorhenium	[Re ^V (O)(PG) ₂] ⁻	C ₁₂ H ₈ O ₇ Re
II	Bis(1,2,3-trihydroxybenzene)oxorhenium	[Re ^{VI} (O)(PG) ₂] ^{-a}	C ₁₂ H ₇ O ₇ Re
III	1,2,3-trihydroxybenzene-chloro-dioxorhenium	[Re ^{VI} Cl(O) ₂ (PG) ₂] ^{-a}	C ₆ H ₃ ClO ₅ Re
IV	Bis(1,2,3-trihydroxybenzene)dioxorhenium	[Re ^{VI} (O) ₂ (PG) ₂] ⁻	C ₁₂ H ₈ O ₈ Re
V	Bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium	[Re ^V (O)(Cat) ₂] ⁻	C ₁₂ H ₈ O ₅ Re
VI	Bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium	[Re ^{VI} (O)(Cat) ₂] ⁰	C ₁₂ H ₈ O ₅ Re
VII	Bis(1,2-dihydroxybenzene)-chloro-oxorhenium	[Re ^{VI} (O)Cl(Cat) ₂] ⁰	C ₁₂ H ₈ ClO ₅ Re
VIII	N-(bis(1,2-dihydroxybenzene)oxorhenium)- <i>p</i> -bromoaniline	[Re ^{VI} (O)(Cat) ₂ - <i>p</i> -BA] ^{-a}	C ₁₈ H ₁₂ BrNO ₅ Re
IX	Bis(1,2-dihydroxybenzene)dioxorhenium	[Re ^{VI} (O) ₂ (Cat) ₂] ⁻	C ₁₂ H ₈ O ₆ Re

^a Deprotonated ion

Results and discussion

Rhenium–pyrogallol complexes

As it is depicted in reaction scheme (Fig. 1), actual molar ratio of triethylamine (TEA) to rhenium precursor tetrabutylammonium-tetrachlororhenate $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ decisively alters the rate and course of chemical reactions (running at room temperature) yielding single complexes.

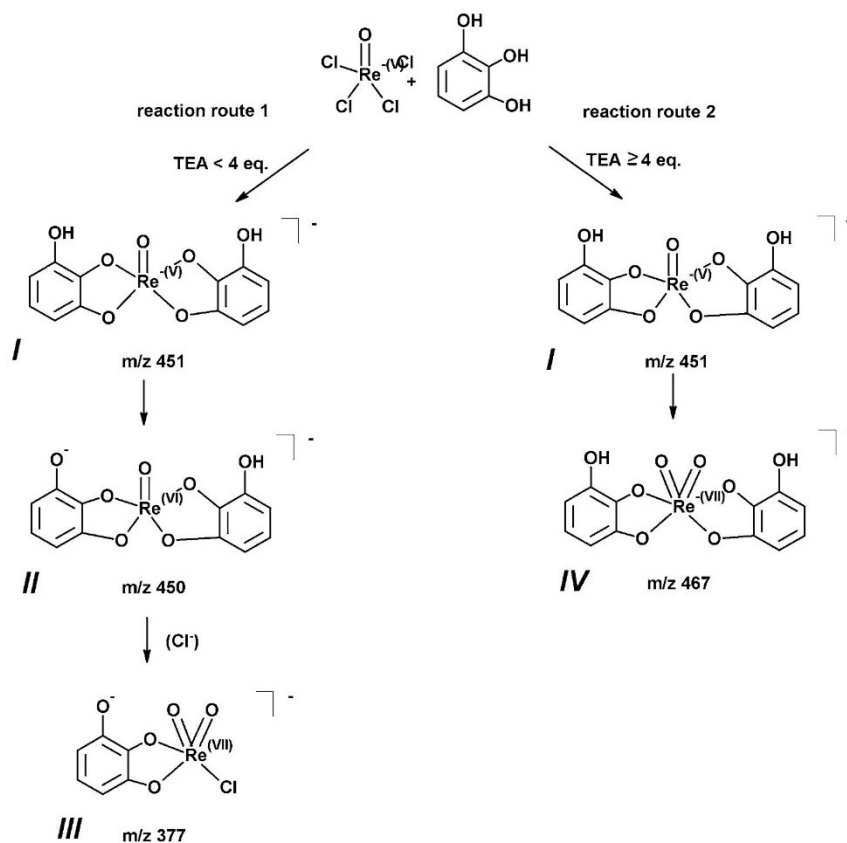
Based on the series of proved experiments, it was possible to conclude that molar ratio of TEA equal or higher than 4, yields $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ (compound I) as a dominant final reaction product synthesized in reaction of $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ and pyrogallol (PG), while lower TEA concentration leads to the formation of $[\text{Re}^{\text{VII}}\text{Cl}(\text{O})_2(\text{PG})]^-$ complex (III). Such observation is evidently related to the stoichiometry of complex-forming reaction and necessary amount of TEA for complete neutralization of hydrogen chloride as a reaction by-product. ESI-MS monitoring of the reaction of $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ with

twofold excess of PG in presence of two equivalents of TEA is shown in Fig. 2.

$[\text{Re}^{\text{V}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ complex (I) is formed almost immediately, followed by its exponential decay in favor to $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ (compound II) within 60 min. The same process is documented by UV–Vis absorption spectra (Fig. 3).

Initial yellowish color of the reaction mixture given by dominant $[\text{Re}^{\text{V}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ complex changes to carmine solution with prevailing $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ as a stable reaction intermediate. Within 60 min, the absorption maximum at 370 nm almost completely disappears in favor to arising 530 nm peak. Well-defined isosbestic point at 425 nm shows a simple reaction mechanism of $[\text{Re}^{\text{V}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ to $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ chemical transformation. Higher concentrations of TEA significantly accelerate subsequent oxidation to $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{PG})_2]^-$. As it follows from Fig. 4, prevailing $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ formed within 60 min in a reaction mixture with two TEA equivalents was completely oxidized to $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{PG})_2]^-$ when additional six equivalents of TEA were added.

Fig. 1 Scheme of possible reactions between precursor $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ and pyrogallol in presence of various amounts of TEA



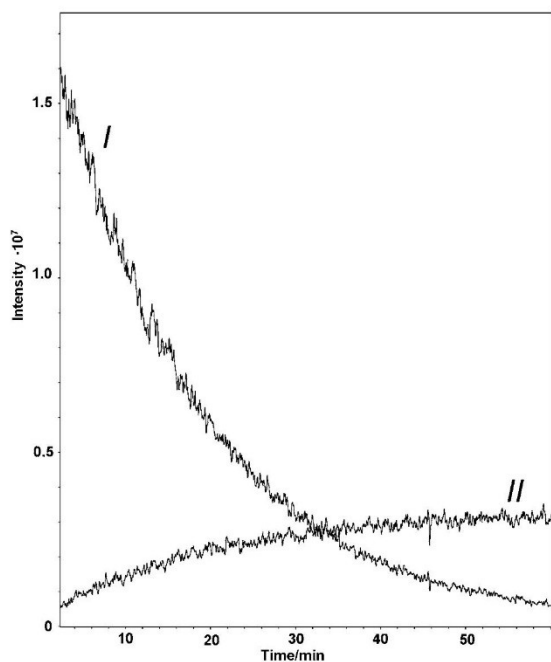


Fig. 2 Time evolution of the ESI-MS signals for a reaction of $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ with pyrogallol in acetonitrile; two equivalents of TEA are added to reaction mixture. Extracted ion current (EIC) at m/z 451 exponentially decreases in favor to EIC at m/z 450, as complex I is converted to II. Initial concentration: $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ (0.018 mg, 0.01 μmol) and pyrogallol (0.008 mg, 0.02 μmol)

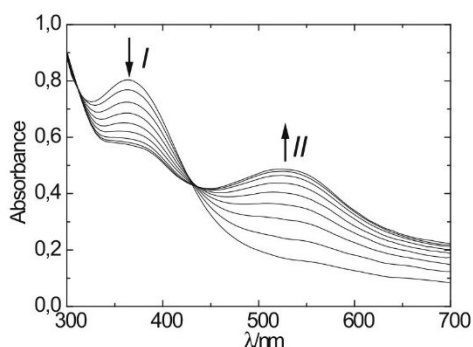


Fig. 3 UV-Vis absorption spectra depicting the conversion of a yellowish complex I to carmine-colored complex II; two equivalents of TEA are present in reaction mixture. Arrows indicate increase and/or decrease of absorption maxima of both species. Spectra are collected within 60 min and shown at time differences 6 min. Initial concentration: $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ (1.76 mg, 1.0 μmol) and pyrogallol (0.76 mg, 2.0 μmol)

Simultaneously arising absorption maxima at 430 and 560 nm indicate the formation of stable brown-colored $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{PG})_2]^-$. More detailed dependence of the rate of reaction yielding $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{PG})_2]^-$ complex on the

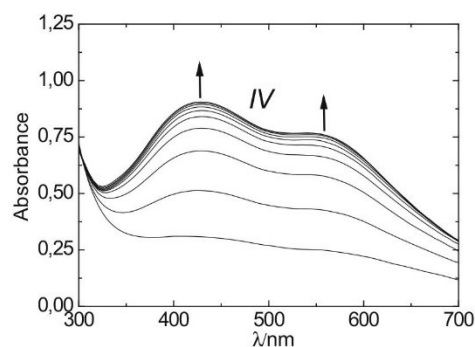


Fig. 4 UV-Vis absorption spectra depicting the conversion of carmine complex II to brown-colored complex IV; eight equivalents of TEA are present in reaction mixture. Arrows indicate increase and/or decrease of absorption maxima of both species. Spectra are collected within 60 min and shown at time differences 6 min. Initial concentration: $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ (1.76 mg, 1.0 μmol) and pyrogallol (0.76 mg, 2.0 μmol)

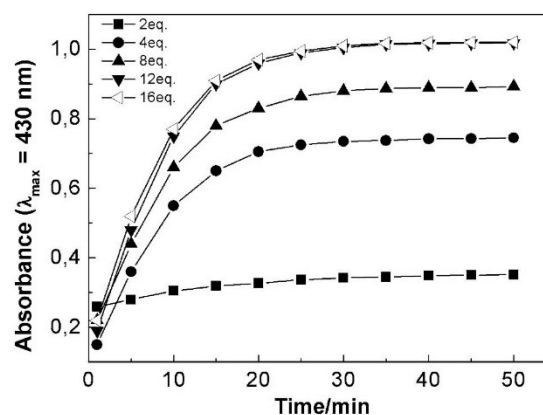


Fig. 5 Time-based dependencies of the height of absorption maximum at $\lambda = 430$ nm (λ_{max} of compound IV) in a $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ -PG reaction mixture with 2–16 equivalents of TEA added. Initial concentration: $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ (1.76 mg, 1.0 μmol) and pyrogallol (0.76 mg, 2.0 μmol)

molar excess of TEA is elsewhere documented in Fig. 5. Time-based dependence of the height of absorption maximum at 430 nm confirms the significant influence of TEA up to the molar excess of 12 equivalents; higher concentrations do not else accelerate the reaction.

Different reaction routes were observed within long-term UV-Vis monitoring of the reaction in absence of TEA and were collected over 3 months at time 0; 0.5; 1.0; 4.8; 5.6; 6.9; 18.8; 43.6; 219; 381; 573; 693; 1076 and 2542 h. As it is visible in Fig. 6 part (a), the formation of $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{PG})_2]^0$ complex is significantly prolonged; the maximum peak height at 530 nm is achieved within tens of hours.

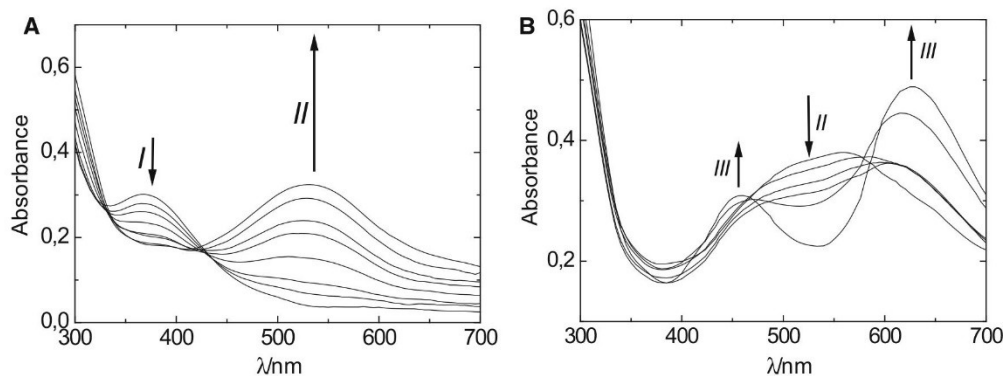


Fig. 6 UV-Vis absorption spectra depicting the reaction of $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ with pyrogallol in absence of TEA. Immediately formed yellow complex I ($\lambda_{\text{max}} = 370$ nm) is converted to carmine complex II ($\lambda_{\text{max}} = 530$ nm). *Arrows* indicate increase and/or

decrease of absorption maxima of both species. Spectra are shown within the time intervals of 0.0–43.6 h (a) and 219–2542 h (b). Initial concentration: $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ (1.76 mg, 1.0 μmol) and pyrogallol (0.76 mg, 2.0 μmol)

Further long-term conversion of $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{PG})_2]^0$ involves ligand exchange reaction with Cl^- ions as a by-product of the reaction between $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ and PG. The oxidation of rhenium ion is accompanied by a cleavage of a single ligand, yielding blue–green $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2\text{Cl}(\text{PG})]^0$ as a final reaction product. This is evident from Fig. 6 part (b) where absorption maximum at 530 nm diminishes in favor to simultaneously arising maxima at 460 and 630 nm.

The structures of the complexes arising in $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ –PG reaction mixture were confirmed with ESI-MS spectra shown in Fig. 7. Spectrum A reflects the composition of a reaction mixture with two equivalents of TEA immediately after its initialization. Dominant molecular ion cluster of $[\text{Re}^{\text{V}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ at m/z 451 was observed. Spectrum B reflects the composition of the same reaction mixture 60 min after its initialization. Dominant peak cluster at m/z 450 corresponds to prevailing deprotonated $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ complex. Minor peak cluster at m/z 467, visible both in spectra A and B, corresponds to traces of $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{PG})_2]^-$ complex at early stages of its formation. In spectrum C, peak cluster at m/z 467 confirms the presence of $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{PG})_2]^-$ as a major reaction mixture constituent in a reaction mixture with eight equivalents of TEA, 60 min after its initialization. Peak cluster at m/z 343 corresponds to a fragment ion $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{PG})]^-$ as a product of elimination of a single ligand moiety. The last spectrum D reflects the composition of the same reaction mixture after 3 months. Peak cluster at m/z 377 documents the presence of deprotonated $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2\text{Cl}(\text{PG})]^-$ as a final and else stable reaction product. Elemental composition of all observed Re–PG complexes

was verified by a comparison of theoretical and experimental molecular ion isotopic patterns, that all possess close resemblance.

Rhenium–catechol complexes

Comparative kinetic measurements monitoring the formation and subsequent chemical transformations of the complexes arising in catechol (Cat)– $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ reaction mixture were performed. As in previous experiments, the decisive role of TEA on complex formation and consecutive transformations was confirmed. Proposed reaction scheme based on UV-Vis and ESI-MS measurements, described below, is shown in Fig. 8. Molar ratio of TEA to $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ higher than four equivalents immediately yields $[\text{Re}^{\text{V}}(\text{O})(\text{Cat})_2]^-$ (compound V) that is consequently converted to stable $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{Cat})_2]^-$ (compound IX) as a final oxidation product. Corresponding reaction rates are comparable to those observed with PG as a ligand.

Absorption spectra shown in Fig. 9 document the rate of $[\text{Re}^{\text{V}}(\text{O})(\text{Cat})_2]^-$ to $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{Cat})_2]^-$ complex oxidation in presence of eight equivalents of TEA. The conversion to $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{Cat})_2]^-$ is accomplished within 60 min; the initial pale yellow color of reaction mixture stains to deep magenta as the concentration of oxidized product with absorption maxima at 365, 460 and 540 nm increases.

The difference between Cat and PG ligands, in terms of the structures of formed complexes and the rates of individual reactions, becomes significant for TEA concentrations lower than four equivalents, markedly, in its absence in reaction mixture. As it is evident from UV-Vis

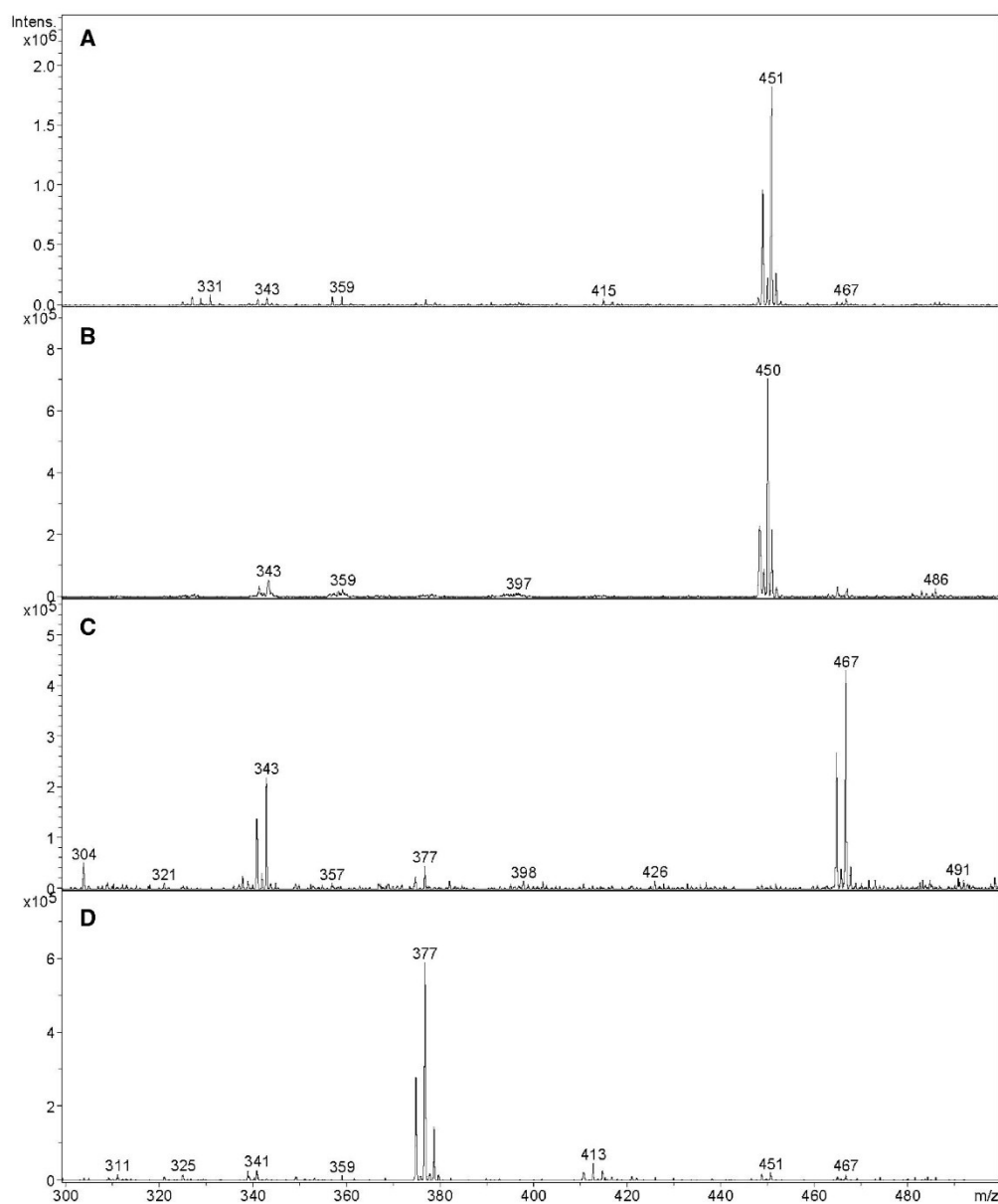


Fig. 7 Directly injected negative ESI-MS spectra reflecting the composition of $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]\text{-PG}$ reaction mixture sampled and analyzed in a stage with **a** prevailing complex I; **b** prevailing

complex II; **c** prevailing complex IV and **d** prevailing complex III. Details are given in a supporting text

absorption spectra shown in Fig. 10, the rate of the conversion of initially formed $[\text{Re}^{\text{V}}(\text{O})(\text{Cat})_2]^-$ to $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{Cat})_2]^0$ intermediate (compound VI) ($\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$) in presence of two equivalents of TEA is significantly prolonged.

Unlike pyrogallol, catechol lacks the free and dissociable hydroxyl group after complexation with rhenium; therefore, $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{Cat})_2]^0$ intermediate remains uncharged in ESI, APPI and APCI and its structural characterization by MS is impossible. Its presence in reaction

Fig. 8 Scheme of possible reactions between $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ and catechol in presence of various amounts of TEA

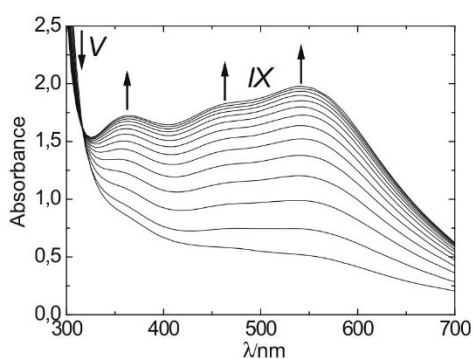
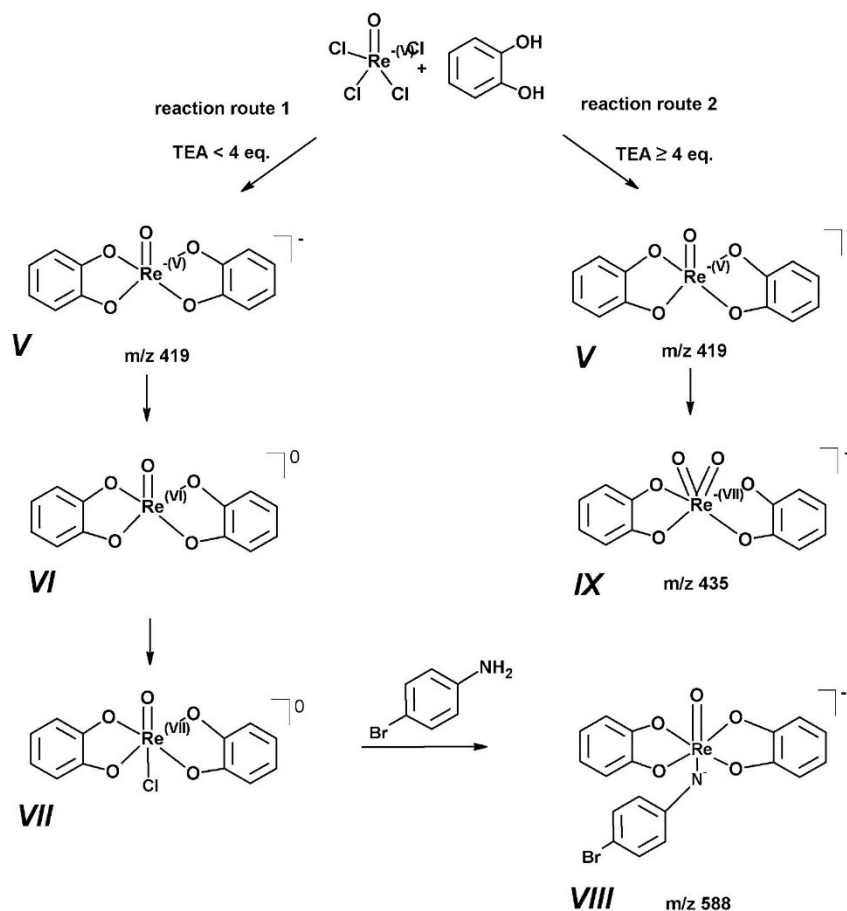


Fig. 9 UV-Vis absorption spectra depicting the conversion of pale yellow complex V to deep magenta complex IX; eight equivalents of TEA are present in reaction mixture. Arrows indicate an increase of absorption maxima at $\lambda = 365, 460$ and 540 nm, characteristic for complex IX. Spectra are collected within 60 min and shown at time differences 6 min. Initial concentration: $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ (1.76 mg, $1.0 \mu\text{mol}$) and catechol (0.66 mg, $2.0 \mu\text{mol}$)

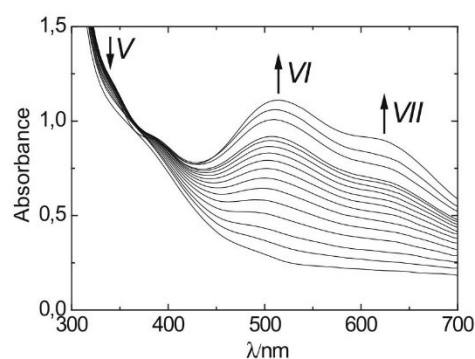


Fig. 10 UV-Vis absorption spectra depicting the conversion of a complex V to purple complex VI ($\lambda_{\text{max}} = 510$ nm). The second arising absorption maximum at $\lambda = 620$ nm indicates the formation of complex VII as a product of concomitant Re oxidation and ligand-exchange reaction; two equivalents of TEA are present in reaction mixture. Arrows indicate increase and/or decrease of absorption maxima of both species. Spectra are collected within 60 min and shown at time differences 6 min. Initial concentration: $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ (1.76 mg, $1.0 \mu\text{mol}$) and catechol (0.66 mg, $2.0 \mu\text{mol}$)

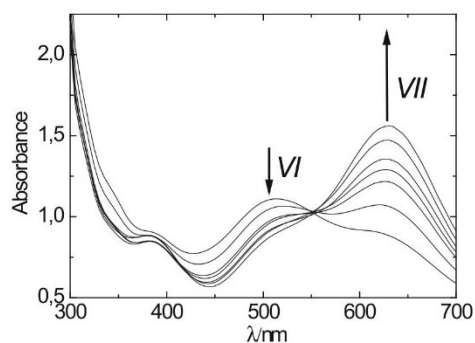


Fig. 11 UV-Vis absorption spectra depicting the long-term transformation of complex VI to blue complex VII ($\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$). Arrows indicate increase and/or decrease of absorption maxima of both species. Spectra are shown within the time interval of 0.0–43 h. Initial concentration: $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ (1.76 mg, 1.0 μmol) and catechol (0.66 mg, 2.0 μmol)

mixture is presumed entirely from a similarity between absorption spectra describing the formation of deprotonated $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{PG})_2]^-$ and those corresponding to the formation of $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{Cat})_2]^0$ analogue. Its further and relatively slow oxidation is accompanied by a ligand-exchange reaction with residual Cl^- ions present in the reaction mixture, yielding $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]^0$ (compound VII) as a final and stable reaction product. Its formation documents the rise of second maximum at 620 nm. Rate and overall extent of the conversion of $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{Cat})_2]^0$ to $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]^0$ is documented in a series of absorption spectra shown in Fig. 11. Absorption maximum at 510 nm diminishes in favor to increasing maximum at 620 nm. The color of reaction mixture consequently changes from magenta to blue. It should be noted that complex $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]^0$ is also neutral; however, its ESI-MS structure identification is possible after the reaction with *p*-bromoaniline yielding complex $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{-}p\text{-BA}]^-$ (compound VIII) as an ESI-ionizable reaction product.

ESI-MS spectra depicting the structure of complexes arising in $\text{Cat}-[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]$ reaction mixture are shown in Fig. 12. Spectrum A reflects the composition of a reaction mixture with eight equivalents of TEA immediately after its initialization. Abundant molecular ion cluster at m/z 419 reflects the dominance of $[\text{Re}^{\text{V}}(\text{O})(\text{Cat})_2]^-$ complex. Spectrum B with a dominant ion cluster at m/z 435 and fragment ion at m/z 327 documents the composition of the same reaction mixture 60 min after its initialization, where complex $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{Cat})_2]^-$ predominates. Spectrum C reflects the final composition of a reaction mixture with two equivalents of TEA, where the presence of $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]^0$ is confirmed by a domi-

nant molecular ion cluster at m/z 588, and fragment at m/z 480, corresponding to reaction product with *p*-bromoaniline.

Elemental composition of all observed complexes was verified by a comparison of theoretical and experimental molecular ion isotopic patterns, that all possess close resemblance. Table 2 summarizes theoretical monoisotopic, and obtained masses of rhenium complexes observed and identified in negative ESI-MS spectra complemented by solution colors, oxidation state of individual rhenium complexes and calculated similarity index. As it is evident from Table 2, the color of reaction mixture is determined by the prevailing complex in solution. Characteristic isotopic clusters were observed for all molecular species. The values 100-SI given in Table 2 indicate significant conformity between calculated and experimental spectra and correct assignment of elemental composition to m/z values of observed ions.

Conclusions

This study documents the diversity of chemical reactions between rhenium precursor tetrabutylammonium-tetrachlorooxorhenate and pyrogallol (PG) or catechol (Cat) as strongly bound, structurally similar ligands. Irrespective of the selected ligand, observed reactions can be diversified to fast ones, involving immediate formation of $\text{Re}(\text{V})$ complex, and the slower ones, involving oxidation of central rhenium ion accompanied with possible ligand-exchange reactions. While the former mentioned do not depend on the actual ligand structure, the later ones show the dependence on exact ligand structure and the actual composition of a reaction mixture.

The presence of triethylamine (TEA) in reaction mixture plays a decisive role in observed reaction schemes and their actual rates. TEA molar ratio higher than four equivalents results in formation of $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{PG})_2]^-$ and $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2(\text{Cat})_2]^-$ complexes as dominant reaction products. Lower amount or even the absence of TEA decelerates the rates of the reactions and increases the probability of ligand-exchange reactions. Within long-term reaction monitoring with less than four equivalents of TEA, we identified deprotonated $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})_2\text{Cl}(\text{PG})]^-$ and $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]^0$ as dominant and stable reaction products.

The absence of free chargeable group in a complex prohibits its structure identification with ESI-MS. Unlike pyrogallol complexes, $\text{Re}(\text{VI})$ and $\text{Re}(\text{VII})$ catechol analogues remain often uncharged and, thus, hidden for ESI-

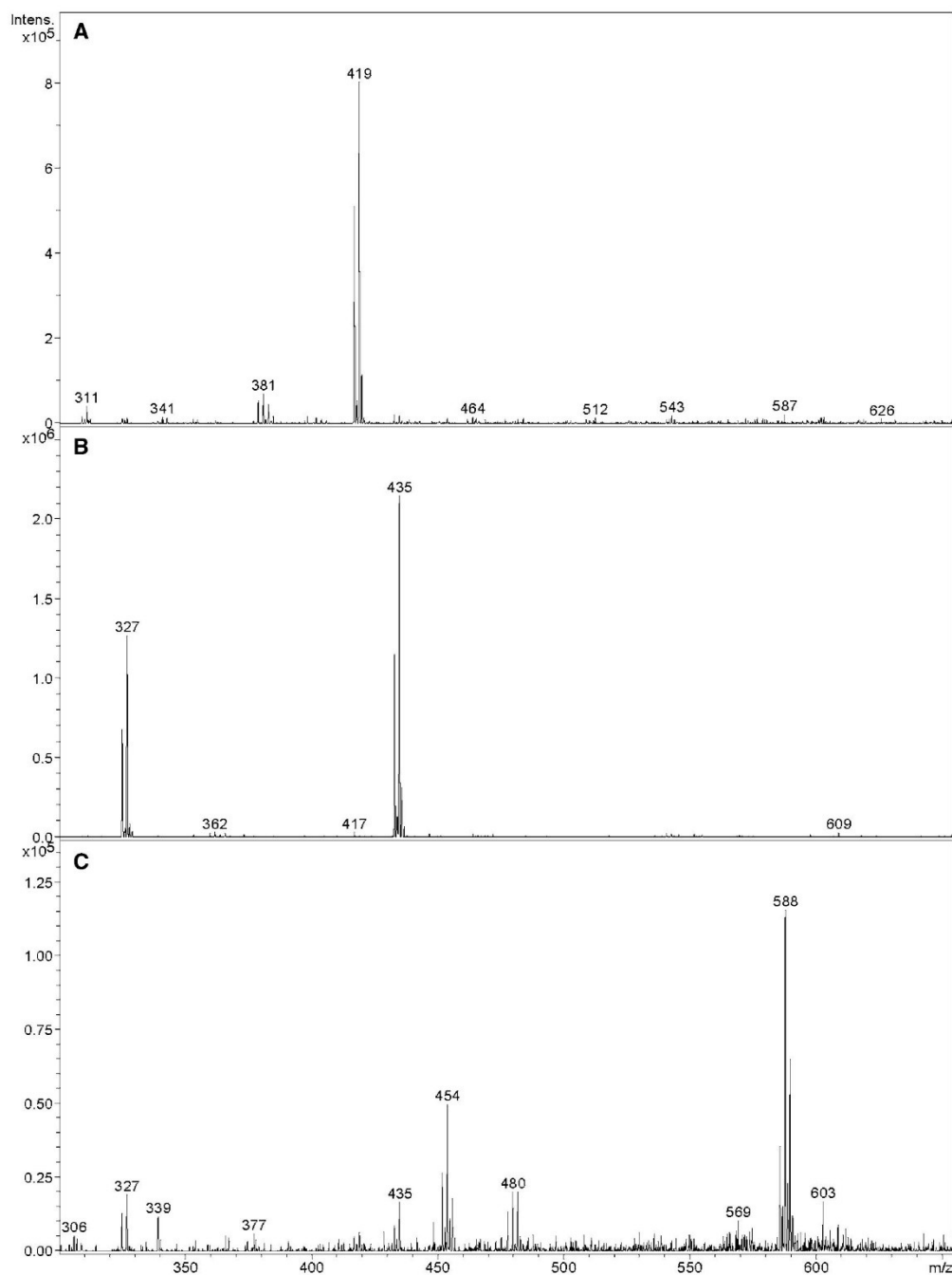


Fig. 12 Directly injected negative ESI-MS spectra reflecting the composition of $[(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)]\text{-Cat}$ reaction mixture sampled and analyzed in a stage with **a** prevailing complex V; **b** prevailing

complex IX; **c** prevailing complex VII identified after its derivatization with *p*-bromoaniline as complex VIII

Table 2 Theoretical monoisotopic and measured molecular ion masses of studied rhenium complexes

Entry	Theoretical monoisotopic m/z	Measured m/z	Rhenium oxidation state	Solution color	Similarity index/%
I	450.98	450.8	V	Yellowish	91.7
II	449.97	449.8	VI	Carmine	91.2
III	376.92	376.9	VII	Blue–green	90.4
IV	466.98	466.9	VII	Brown	97.8
V	418.99	418.8	V	Pale yellow	96.1
VIII	587.95	587.7	VII	Yellowish	96.7
IX	434.99	434.8	VII	Deep magenta	95.7

Additional descriptors covering the properties of individual complexes (Re oxidation state, observed color) and reliability of MS structure identification (similarity index) are enclosed

MS. However, the final $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]^0$ complex was successfully converted to a chargeable product via derivatization with *p*-bromoaniline.

Acknowledgements This research was carried out within the framework of the project of the Specific University Research (SVV 260317). The Norwegian Financial Mechanism project CZ01116 is gratefully acknowledged.

References

- Abrams MJ, Murrer BA (1993) Metal compounds in therapy and diagnosis. *Science* 261:725–730. doi:10.1126/science.8102010
- Colton R (1965) The chemistry of rhenium and technetium. Interscience, London
- Day EF, Payne TA, Holt CA (2007) Mass spectrometric study of dirhenium bis-carboxylate:purine dinucleotide complexes. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21:903–910. doi:10.1002/rcm.2910
- Fedorova G, Nebesky V, Randak T, Grabic R (2014) Simultaneous determination of 32 antibiotics in aquaculture products using LC–MS/MS. *Chem Pap* 68:29–36. doi:10.2478/s11696-013-0428-3
- Gerloch M, Constable EG (1994) Transition metal chemistry. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Henderson V, Nicholson BK, McCaffrey LJ (1998) Applications of electrospray mass spectrometry in organometallic chemistry. *Polyhedron* 17:4291–4313. doi:10.1016/S0277-5387(98)00246-0
- Hori H, Ishitani O, Koike K, Takeuchi K (1996) Electrospray mass spectrometric detection of unstable rhenium complexes as reaction intermediates of photochemical CO₂-fixation. *Anal Sci* 12:587–590. doi:10.2116/analsci.12.587
- Hori H, Ishihara J, Koike K, Takeuchi K, Ibusuki T, Ishitani O (1997) Electrospray mass spectrometric detection of neutral rhenium bipyridine complexes using NaNO₃ as an ionization agent. *Chem Lett* 3:273–274. doi:10.1246/cl.1997.273
- Kohlíckova M, Jedinakova-Krizova V, Konirova R (1999) Chromatographic study of ¹⁸⁶Re complexes with various ligands. *J Radioanal Nucl Chem* 242:545–549. doi:10.1007/BF02345591
- Kohlíckova-Koudelkova M, Jedinakova-Krizova V, Deyl Z (2002) Study of perrhenate reduction by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23:245–248. doi:10.1002/1522-2683(200202)23:2<245:AID-ELPS245>3.0.CO;2-D
- Konirova R, Ernestova M, Jedinakova-Krizova V, Kral V (2003) Radioactive labeled porphyrin derivatives. *Czech J Phys* 53:755–761. doi:10.1007/s10582-003-0098-4
- Koudelkova M, Jedinakova-Krizova V (2003) Capillary electrophoretic and thin-layer chromatographic characterization of rhenium complexation with 1-hydroxyethylidenediphosphonic acid. *J Chromatogr A* 990:317–323. doi:10.1016/S0021-9673(02)01798-3
- Kowalczyk L, Szykowska MI (2012) Oxidation of ammonia using modified TiO₂ catalyst and UV–vis irradiation. *Chem Pap* 66:607–611. doi:10.2478/s11696-012-0159-x
- Nicholson T, Kramer DJ, Davison A, Jones AG (2003) The substitution chemistry of a useful new synthon with neutral donor ligands. The reactions of [TcCl₃(N = NPh₂)(PPh₃)₂] with phosphine ligands. The X-ray crystal structures of [TcCl₂(N = NPh₂)(PMe₂Ph)₃][PF₆], [TcCl(N = NPh₂)(dppf)₂][PF₆]⁺ and [TcCl₂(N = NPh₂)(TRIPHOS)] [BPh₄]. *Inorg Chim Acta* 353:177–182. doi:10.1016/S0020-1693(03)00228-7
- Petroselli G, Mandal MK, Chen LC, Ruiz GT, Wolcan E, Hiraoka K, Nonami H, Erra-Balsells R (2012) Mass spectrometry of rhenium complexes: a comparative study by using LDI-MS, MALDI-MS, PESI-MS and ESI-MS. *J Mass Spectrom* 47:313–321. doi:10.1002/jms.2965
- Schrotterova D, Nekovar P (2006) Extraction of Re(VII) by neutral and basic extractants. *Chem Pap* 60:427–431. doi:10.2478/s11696-006-0078-9
- Shaker SA, Khaledi H, Mohd Ali H (2010) Spectroscopic investigations and physico-chemical characterization of newly synthesized mixed-ligand complexes of 2-methylbenzimidazole with metal ions. *Chem Pap* 65:299–307. doi:10.2478/s11696-011-0003-8
- Sticha M, Jelinek I, Polakova J, Kaliba D (2015) Characterization of rhenium(V) complexes with phenols using mass spectrometry with selected soft ionization techniques. *Anal Lett* 48:2329–2342. doi:10.1080/00032719.2015.1038552
- Tisato F, Bolzati C, Porchia M, Refosco F (2004) Contribution of electrospray mass spectrometry for the characterization, design, and development of nitrido technetium and rhenium heterocomplexes as potential radiopharmaceuticals. *Spectrom Rev* 23:309–332. doi:10.1002/mas.20000
- Valliant JF, Riddoch RW, Hughes DW, Roe DG, Farconier TK, Thornback JR (2001) The solid phase synthesis and NMR spectroscopy of a ⁹⁹Tc chelate–bombesin derived peptide conjugate. *Inorg Chim Acta* 325:155–163. doi:10.1016/S0020-1693(01)00637-5
- Van Berkel GJ (2003) An overview of some recent developments in ionization methods for mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom* 9:539–562. doi:10.1255/ejms.586
- Wan KX, Vidavsky I, Gross ML (2002) Comparing similar spectra: from similarity index to spectral contrast angle. *J Am Soc Mass Spectrom* 13:85–88. doi:10.1016/s1044-0305(01)00327-0

- Wyatt MF (2011) MALDI–TOFMS analysis of coordination and organometallic complexes: a nic(h)e area to work in. *J Mass Spectrom* 46:712–719. doi:[10.1002/jms.1957](https://doi.org/10.1002/jms.1957)
- Wyatt MF, Stein BK, Brenton AG (2006) Characterization of various analytes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and 2-[(2*E*)-3-(4-*tert*-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile matrix. *Anal Chem* 78:199–206. doi:[10.1021/ac050732f](https://doi.org/10.1021/ac050732f)

PUBLIKACE III

Název	<i>Synthesis and characterization of rhenium complexes of <u>1,2,3-trihydroxybenzene</u> as potential antitumor agents</i>
Autoři	Kaliba David Štícha Martin Jelínek Ivan
Časopis	Transition Metal Chemistry
Volume:Issue	42
Stránky	211-218
Rok	2017

Synthesis and characterization of rhenium complexes of 1,2,3-trihydroxybenzene as potential antitumor agents

David Kaliba¹ · Martin Sticha² · Ivan Jelinek¹

Received: 9 November 2016 / Accepted: 27 January 2017 / Published online: 11 February 2017
© Springer International Publishing Switzerland 2017

Abstract Oxorhenium(V) complexes composed of β -emitting ^{186}Re and ^{188}Re isotopes are of current interest in radiopharmaceutical medicine. Rhenium complexes of 1,2,3-trihydroxybenzene were prepared by reactions of a Re(V) precursor (tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenate) with twofold molar excess of the ligand in acetonitrile. The structural formulae of the complexes and their consequent reaction products, as well as those of the final reaction products bis(1,2,3-trihydroxybenzene)-dioxorhenium(VII) and 1,2,3-trihydroxybenzene-chloro-dioxorhenium(VII), synthesized in two different reactions differing in the amount of triethylamine added to the reaction mixture, were estimated by means of physicochemical and spectroscopic methods. ESI-MS spectra in negative mode were also obtained. The reactions during the course of complex formation and consequent decomposition were primarily followed by ESI-MS, and time-dependent ESI-MS signals were recorded and compared to those obtained by UV/Vis absorption spectroscopy.

Introduction

Current nuclear medicine frequently uses transition metal-based radiopharmaceuticals injected into the patient's body in the form of a short half-life radionuclide coordinated by

a suitable organic ligand [1]. Oxorhenium(V) complexes of β -emitting rhenium isotopes (^{186}Re and ^{188}Re) are beginning to play an important role in radiopharmaceutical medicine. Because of their similarity to technetium analogues already used in medicine, many tasks concerning the preparation and clinical utilization of such complexes have been already solved. Re and Tc have almost identical chemical properties [2, 3]. Their complexes show a wide variety of oxidation states, ranging from (–I) to (+VII), and form both cationic and anionic species with strongly oxidizing to mildly reducing properties. Coordination compounds of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ are well established in nuclear diagnostics, while ^{186}Re and ^{188}Re analogues seem to be utilizable in bone antitumor therapy [3].

The range of suitable analytical methods for determination of individual complexes in reaction mixtures is rather restricted. As a consequence, there is a lack of exact analytical data describing individual chemical reactions between Re(+V) species with a ligand and additional components present in a reaction mixture. Accordingly, relevant data on the stabilities of such complexes and their possible decomposition routes are missing. Concerning the analysis of transition metal complexes in terms of their exact structures and stabilities, most information has come from kinetic studies related to their catalytic properties [4–7]. Based on such kinetic studies, the rhenium core has been recognized as an effective catalytic center for oxygen transfer reactions or in ammonia synthesis [8–10].

Pyridine, γ -picoline, and α -chloropyridine have been examined as ligands for stable complexes formed from Re(V) precursor. Kinetic studies of the formation and consequent degradation of the complexes were based on analysis by infrared spectrometry [11]. The effects of various nucleophiles, pyridine *N*-oxides, triaryl phosphates, 2,7-nonadiyne and glucose as rhenium complex-forming

✉ David Kaliba
kalibad@natur.cuni.cz

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 8, 123 48 Prague, Czech Republic

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 8, 123 48 Prague, Czech Republic

ligands were monitored *in vitro* and *in vivo*, and corresponding structure investigations were presented [12–14].

Metal complexes for use in human medicine can be characterized by a wide spectrum of analytical methods, depending on the required information; the changes in rhenium oxidation states can be monitored by electroanalytical and spectrometric methods [15–17]. Quantification of the components in complex-forming reaction mixtures is usually achieved by means of TLC, HPLC and capillary zone electrophoresis (CZE) [18–24]. Structural characterization of such complexes utilizes common methods, such as X-ray crystallography, NMR and IR [25–27]. Mass spectrometry with soft ionization techniques has also proved to be a suitable method for the analysis of various complexes. Electrospray ionization usually provides mass spectra with dominant molecular ion and minor fragment ions [28, 29]. Compared with NMR and IR, ESI-MS can achieve substantially lower detection limits and is applicable to analytes in aqueous solution [30–32].

In our previous contribution, we pointed out the suitability of low-resolution ESI-MS for fast and reliable structural identification of selected rhenium complexes in mixtures [33]. We discovered that the stabilities of rhenium compounds, especially with aromatic ligands, depended on the presence of oxygen as well as on the presence of additional compounds (accelerants) binding HCl formed as a by-product. The goal of this study was to investigate the products of reaction of the rhenium precursor tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenate and aromatic ligand 1,2,3-trihydroxybenzene in acetonitrile under various conditions, in particular the amount of triethylamine added to the reaction mixture as an accelerant. The products have been characterized by electrospray mass spectrometry, NMR and IR spectroscopy. Special attention is paid to the subsequent transformations of initial product complexes, leading to a variety of final products. The ESI-MS extracted ion current data are compared to those obtained by conventional UV/Vis absorption spectroscopy measurements. We hope that information on the chemical structures of such complexes and their subsequent reaction products, along with additional data on the complex-forming reactions, will contribute to the development of new rhenium diagnostic kits with improved clinical properties.

Experimental

Materials and instrumentation

Tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenate ((n-But₄)[ReOCl₄]) and trimethylamine (TEA) were purchased from Sigma–Aldrich, ligand 1,2,3-trihydroxybenzene (PG) was

purchased from Alfa Aesar, acetonitrile for NMR (CD₃CN) 99.8% purity was purchased from Euriso-top, acetonitrile HPLC grade was purchased from Lach-Ner, and electrospray tuning mix for mass spectrometry with ion trap was purchased from Agilent. All other reagents used in the synthesis were commercially available and used without further purification.

Electrospray mass spectrometry experiments were conducted on an ion trap instrument Esquire 3000 Bruker Daltonics. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on CD₃CN solutions on a Bruker Varian (300.54 and 100.11 MHz) NMR spectrometer. The ¹H and ¹³C chemical shifts δ are given in ppm. Coupling constants J refer to J_{HH} in ¹H and J_{CC} in ¹³C NMR unless denoted otherwise. IR spectra were recorded on a NICOLET 380 FTIR Thermo Scientific instrument using KBr disks. UV/Vis absorption spectra were recorded on a Thermo Evolution 60 UV/Vis absorption spectrometer using 3-ml glass or plastic cuvettes with a 1 cm length.

Synthesis of complex (1)

A mixture of (n-But₄)[ReOCl₄] (0.88 mg, 1.42 μmol) and PG (0.48 mg, 3.81 μmol) in acetonitrile (3 ml) was stirred at room temperature under air. After 10 min, 2–16 equivalents of TEA (8.4–52.5 μl of 10% TEA solution in acetonitrile) were added. The resulting yellow color solution contained major complex bis(1,2,3-trihydroxybenzene)-oxorhenium(V) (**1**). Complex was characterized in solution. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃CN): δ = 9.94 (bs, 2H), 6.56 (m, 2H), 6.35 (m, 4H) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃CN): δ = 108.8, 59.9, 47.6, 24.7, 20.8, 14.1, 9.50 ppm.

Synthesis of complex (2)

When the procedure for complex (**1**) was used with a small amount of TEA (0–4 equivalents, 0–16.8 μl), the complex bis(1,2,3-trihydroxybenzene)-oxorhenium(VI) (**2**) was formed itself as an intermediate in the reaction with air access after 60 min of standing in air at room temperature. The resulting color of the solution was cyan. Complex (**2**) was characterized in solution and provides shifts at ¹H-NMR (300 MHz, CD₃CN): δ = 9.93 (bs, 2H), 6.56 (m, 2H), 6.35 (m, 4H) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃CN): δ = 108.8, 59.8, 47.6, 24.8, 20.8, 14.21, 9.51 ppm.

Synthesis of complex (3)

The reaction of (n-But₄)[ReOCl₄] (0.88 mg, 1.42 μmol) with PG (0.48 mg, 3.81 μmol) in acetonitrile (3 ml) was performed at room temperature with 0–4 equivalents of TEA (0–16.8 μl). The final green solution of 1,2,3-

trihydroxybenzene-chloro-dioxorhenium(VII) (**3**) as the major complex was obtained from the cyan solution of complex (**2**) after 3 months of standing in a closed flask with slight air access. Complex (**3**) was characterized in solution and provides shifts at: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3CN): $\delta = 7.05$ (m, 2H), 5.36 (m, 4H) and 5.20 (m, 2H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN): $\delta = 70.6, 28.7, 4.21, 4.14$ ppm.

Synthesis of complex (**4**)

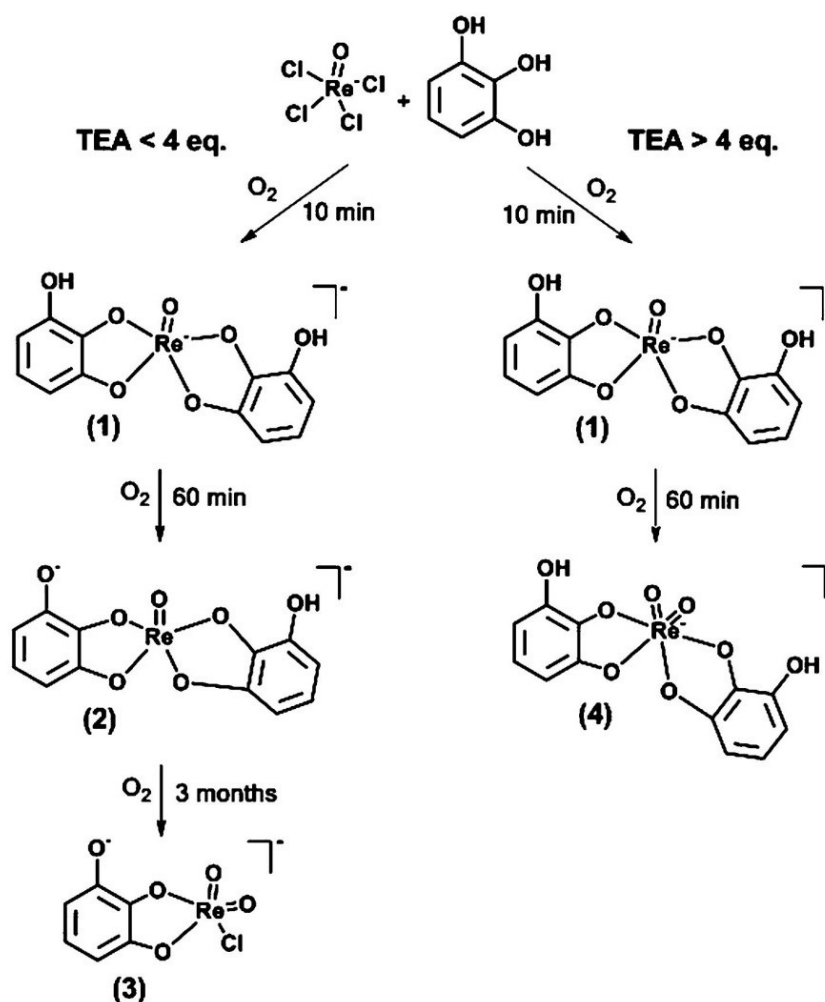
The reaction of $(n\text{-But}_4)[\text{ReOCl}_4]$ (0.88 mg, $1.42 \mu\text{mol}$) with PG (0.48 mg, $3.81 \mu\text{mol}$) in acetonitrile (3 ml) was performed at room temperature, and after 10 min, 16 equivalents of TEA (52.5 μl of 10% TEA solution in acetonitrile) were added. The resulting yellow-colored solution containing the major compound (**1**) changed in the presence of TEA to a brown solution with bis(1,2,3-

trihydroxybenzene)-dioxorhenium(VII) (**4**) as the major complex after 60 min. After evaporation of acetonitrile, the crude product was recrystallized from state solvent used for recrystallization of (**4**) to obtain 0.63 mg of a yellow solid with 90% yield. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3CN): $\delta = 7.61$ (m, 2H), 7.23 (m, 2H), 3.06 (bs, 2H), 1.59 (m, 2H), 0.96 (m, 2H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN): $\delta = 147.3, 130.7, 127.0, 124.7, 111.1, 59.6, 24.6, 20.7, 14.21$ ppm. IR (KBr, cm^{-1}): 722(s), 779(s), 1476(s), 1521(s), 2681(s), 2959(s), 3228(s).

Results and Discussion

As depicted in Scheme 1, the molar ratio of TEA to precursor decisively alters the rate and course of the subsequent chemical reactions yielding single complexes. Based

Scheme 1 Structures and labels of the prepared Re complexes (**1**)–(**4**) with reaction times. The presence of air is signified by O_2



on a series of experiments, it was possible to conclude that TEA molar ratios higher than 4 equivalents yield complex (4) as a final reaction product, while lower TEA concentrations lead ultimately to complex (3). TEA acts as a base, which neutralizes HCl (a reaction by-product). Lower amounts or even the absence of TEA lowers the rates of the reactions and so increases the probability of ligand exchange reactions, thus playing a decisive role in the sequence of complex-forming reactions. The reaction routes involve oxidation of the rhenium center from its initial oxidation state of +V to +VII, while the ligand remains chemically unaltered.

As it is evident from Table 1, the color of the reaction mixture is determined by the prevailing complex in solution. Table 1 also summarizes the theoretical monoisotopic and obtained masses of the complexes obtained by electrospray mass spectrometry.

An electrospray mass spectrometry extracted ion current (EIC) study of the reaction between the precursor with twofold excess of PG plus 2 equivalents of TEA is shown in Fig. 1. Complex (1) is formed almost immediately, followed by its exponential decay in favor of complex (2) within 60 min. Time-based ESI-MS measurements enabled us to specify different reaction pathways yielding alternative rhenium complexes. Mass spectrometry with electrospray ion source is suitable for the observation of previously selected ions. In this case, for the chemical transformation (1) → (2), the selected ions were measured at m/z 451 and 450, respectively. The relative abundance of (1) with m/z 451 exponentially decreases with time, because of the decrease in its concentration. Conversely, the relative abundance of (2) (m/z 450) increases with time, reflecting its increasing concentration in solution.

Due to the presence of O-substituted aromatic ligands, the complexes studied in this work show strong absorptions in the UV/Vis region. The dominance of complex (1) immediately after mixing the reactants and the dominance of (2) within 60 min is also revealed by the complementary UV/Vis transition study shown in Fig. 2. The yellowish color of the initial reaction mixture, corresponding to the major product (1), gradually converts to a cyan-colored solution in which (2) prevails as a stable reaction

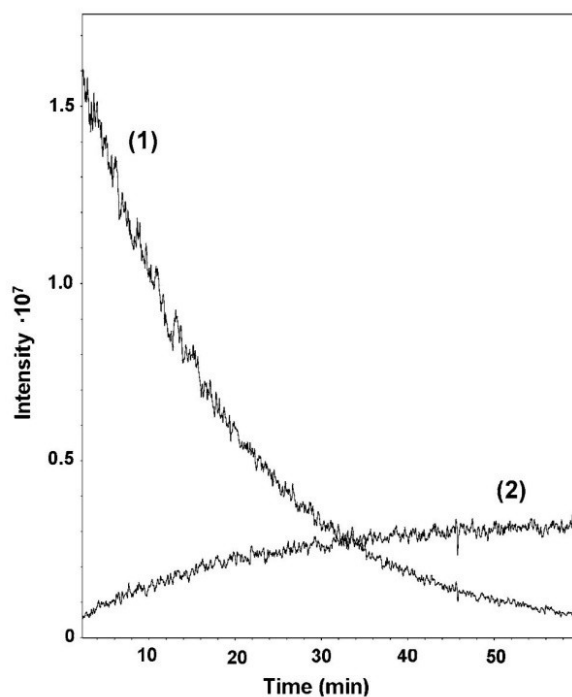


Fig. 1 Time evolution of the ESI-MS signals for the reaction of $[\text{ReOCl}_4]^-$ with PG and 2 equivalents of TEA

intermediate; the absorption maximum of (1) at 370 nm almost completely disappears, in favor of peak at 530 nm connected with the rising concentration of (2) in 60 min. A well-defined isosbestic point at 425 nm points at a simple transformation of (1) into (2).

Higher concentrations of TEA (more than 4 equivalents) significantly accelerate conversion to final complex (4). For TEA equivalents higher than 4, it proved to be impossible to detect (2) as an intermediate. UV/Vis transition measurements in the presence of 8 equivalents of TEA in the reaction mixture are shown in Fig. 3. The new rhenium complex (4) can be prepared after 60 min of standing at laboratory temperature. Simultaneous increases in absorption maxima at 430 and 560 nm indicate the formation of the brown-colored complex (4).

Table 1 Formulae, theoretical monoisotopic and experimentally obtained masses of rhenium complexes observed in negative ESI-MS spectra, together with solution colors and oxidation states of individual rhenium complexes

Complex	Formula	Theoretical monoisotopic (m/z)	Measured (m/z)	Oxidation state	Solution color
1	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_7\text{Re}$	450.9	451	V	Yellow
2	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{O}_7\text{Re}^{\text{a}}$	449.9	450	VI	Cyan
3	$\text{C}_6\text{H}_4\text{ClO}_5\text{Re}^{\text{a}}$	376.8	377	VII	Green
4	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_8\text{Re}$	466.9	467	VII	Brown

^a Detected as the deprotonated molecule

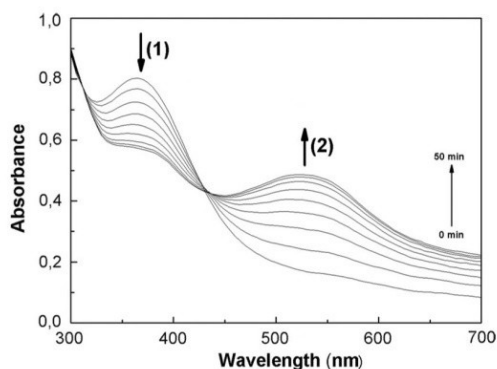


Fig. 2 UV/Vis absorption spectra for conversion of *yellow* complex (1) into *cyan* colored (2); 2 equivalents of TEA; time intervals $\Delta t = 5$ min

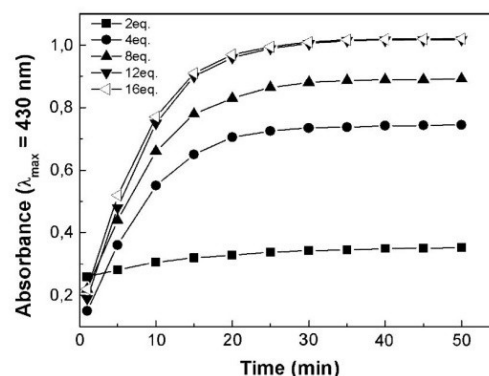


Fig. 4 Time dependencies of absorbances at $\lambda = 430$ nm, corresponding to absorption maximum of (4), in reaction mixtures with 2–16 equivalents of TEA (initial concentrations 1.42 μmol precursor and 3.81 μmol PG)

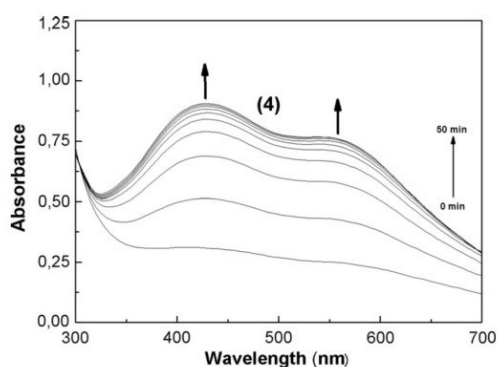


Fig. 3 UV/Vis absorption spectra for conversion of *yellow* complex (1) to *brown* complex (4); 8 equivalents of TEA; time intervals $\Delta t = 5$ min

The dependence of the rate of formation of complex (4) on the molar excess of TEA in the reaction mixture is shown in Fig. 4. The time dependence of the height of the absorption peak at 430 nm confirms the significant influence of TEA on the $\text{Re(V)}\text{--Re(VII)}$ reaction rate. However, more than 12 equivalents of TEA do not further accelerate the reaction. The rate of the complex formation reaction yielding complex (4) depends significantly on the addition of TEA as a base, binding Cl^- ions which are the reaction by-product. From Fig. 4, showing the increase in the absorption maximum at 430 nm when the reaction is exposed to air, depending on TEA addition (2–16 equivalents), it can be seen that the rate of reaction significantly increases with increasing excess of TEA. It is evident that reaction rate is the highest for 12 or 16 equivalents of TEA; however, the most significant change in the rate was observed in the interval of 2–8 equivalents of TEA, such that the difference in absorbance of the solution between 2 and 8 equivalents is almost fourfold.

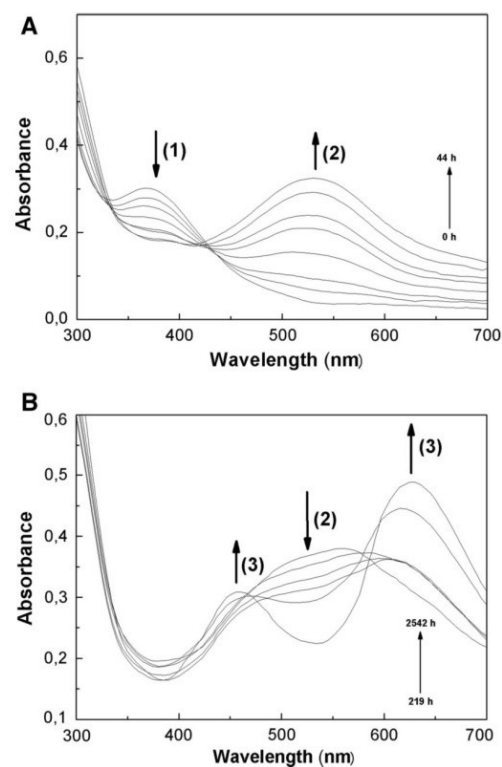
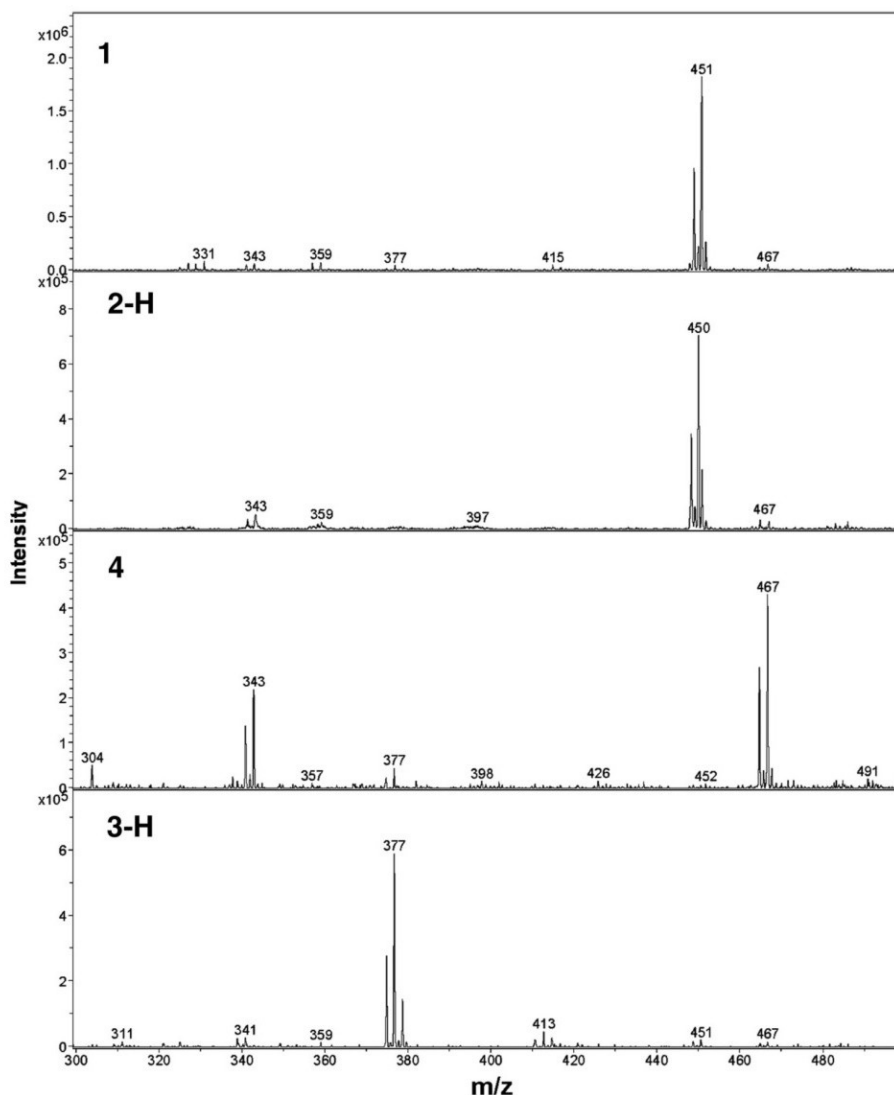


Fig. 5 UV/Vis absorption spectra for conversion of the *yellow* complex (1) to the *purple* (2) at $t = 0\text{--}43.6$ h (a) and long-term transformation of (2) to the *green* oxidized product (3) at $t = 219\text{--}2542$ h (b)

A different reaction scheme was observed during long-term monitoring of the reaction in the absence of TEA. Data were collected for 3 months, at times of 0, 0.5, 1.0, 4.8, 5.6, 6.9, 18.8, 43.6, 219, 381, 573, 693, 1076 and

Fig. 6 Direct injected negative ESI-MS spectra for complexes (1), (2-H), (4) and (3-H)



2542 h. Compared to the reaction in the presence of TEA, production of (2) is significantly prolonged, such that the maximum peak height is achieved within 10 h (Fig. 5A at $t = 0$ –43.6 h). Further long-term conversion of (2) in the absence of TEA is possibly altered by the presence of Cl^- as a by-product. As it is evident from Fig. 5b at $t = 219$ –2542 h, the absorption maximum at 530 nm diminishes in favor of simultaneously arising maxima at 460 and 630 nm, in accordance with the increasing concentrations of green complex (3).

The structures of the complexes dominating in the precursor–PG reaction mixture under the selected conditions and time intervals were confirmed by ESI-MS, as shown in Fig. 6. Spectrum 1 reflects the composition of a reaction

mixture with two equivalents of TEA immediately after its initialization. A dominant molecular ion cluster from complex (1) was observed. Spectrum 2-H reflects the composition of the same reaction mixture 60 min after initialization. The dominant peak cluster at m/z 450 corresponds to complex (2), detected as a deprotonated molecule. The peak m/z 451 is slightly higher than would correspond to the isotopic contribution, because of the presence of unconverted (1). The minor peak cluster at m/z 467 visible in both spectra 1 and 2-H corresponds to traces of complex (4) at early stages of its formation. In spectrum 4, the peak cluster at m/z 467 confirms the presence of (4) as a major constituent in the reaction mixture with 8 equivalents of TEA in 60 min after its initialization. The

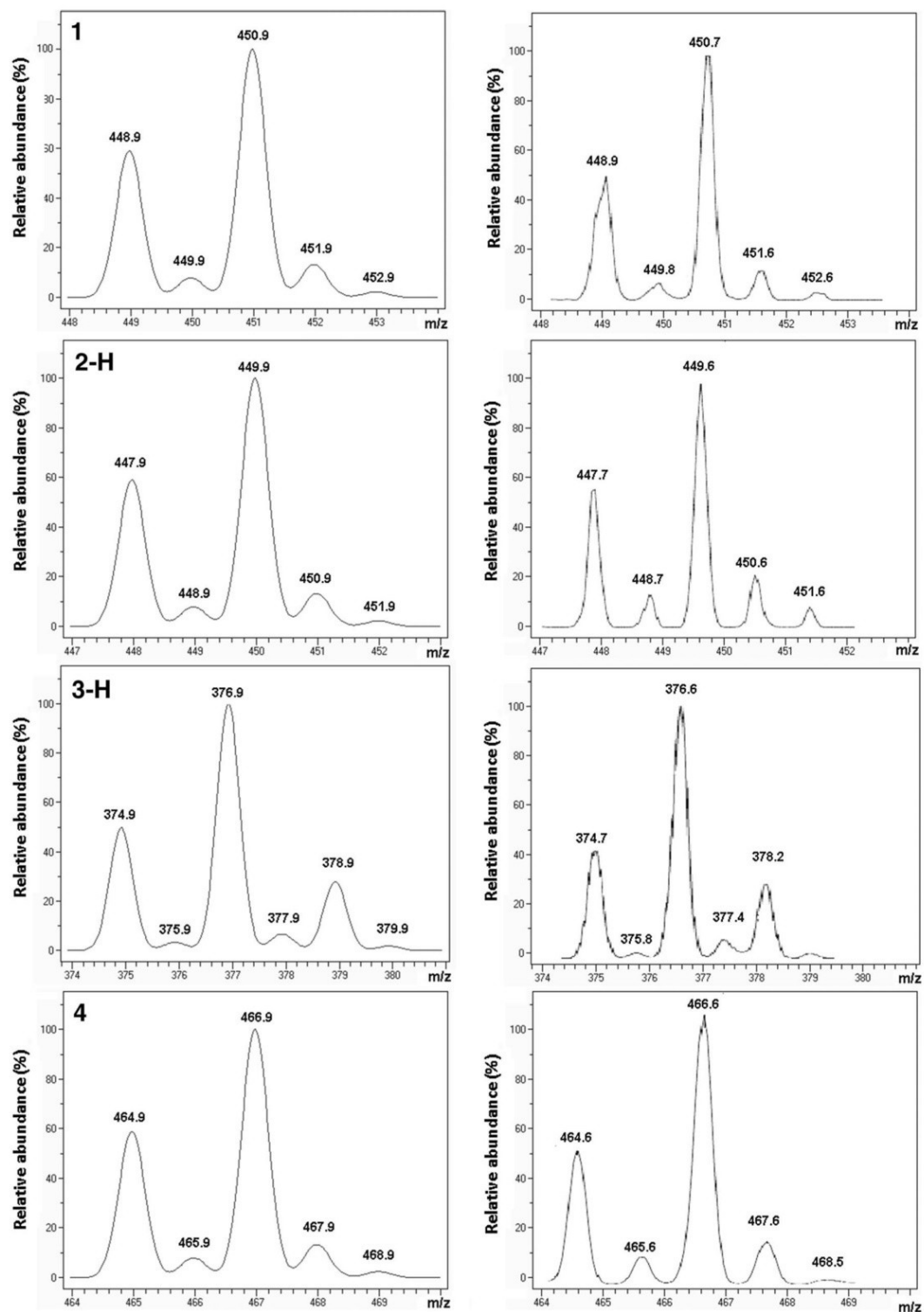


Fig. 7 Theoretical monoisotopic (left) and experimental (right) isotopic patterns of complexes (1), (2-H), (3-H) and (4) molecular ion clusters

peak cluster at m/z 343 corresponds to a fragment ion with one ligand still attached to rhenium, as a result of the elimination of one ligand moiety. The final spectrum 3-H reflects the composition of the same reaction mixture 3 months after initialization. The peak cluster at m/z 377 indicates the presence of **(3)** as final complex detected as the deprotonated molecule. Its structure, together with those of all the other complexes, was also confirmed by a comparison of theoretical and experimental isotopic patterns, which all show good agreement (see Fig. 7). The theoretical isotopic patterns were calculated from the monoisotopic masses of the atoms by Bruker Daltonics Isotopic Pattern. Complexes **(2)** and **(3)** were detected as deprotonated molecules, labeled as 2-H and 3-H.

Conclusion

The present study documents the complexity of chemical reactions between tetrabutylammonium tetrachloro-orhenate as Re(V) precursor and 1,2,3-trihydroxybenzene as a strongly binding ligand. The observed reactions can be divided into a group of fast processes, involving initial and immediate reaction between the precursor and 1,2,3-trihydroxybenzene, and consequent transformations of complex **(1)** to **(2)** as an intermediate and finally **(4)** and slower processes, involving backward reactions with reaction byproducts. Triethylamine plays a decisive role in the sequence of complex formation reactions. TEA molar ratios higher than 4 equivalents result in the formation of complex **(4)**, while lower amounts or even the absence of TEA significantly decelerate the rate of reactions and also increase the probability of ligand exchange reactions, namely the cleavage of 1,2,3-trihydroxybenzene and relinkage of chloride. In a long-term monitoring of the reaction mixture without added TEA, **(3)** was identified as the major reaction product. The ability of rhenium to bind 1,2,3-trihydroxybenzene as a ligand is preserved, irrespective of its actual oxidation number. This observation is interesting from the perspective of relatively rare information about Re(VII) complexes with organic ligands and also the possible role of Re(VI) and Re(VII) complexes in medical applications. Based on observed electrospray mass spectra of Re(VII) complexes with abundant molecular ions and observed long-term stability even in aqueous solutions, their high chemical stability was presumed. In general, preparation of Re(VII) complexes directly from its highest oxidation state is usually impossible and successive oxidation of lower oxidation state complexes is the only way of their preparation.

Acknowledgements This research was carried out within the framework of the project of the Specific University Research (SVV).

References

- Abrams MJ, Murrer MA (1993) *Science* 261:725–730
- Gerloch M, Constable EG (1994) *Transition metal chemistry*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Colton R (1965) *The chemistry of rhenium and technetium*. Interscience, London
- Wojcicki A, Basolo F (1961) *J Am Chem Soc* 83:520–525
- Angelici RJ, Basolo F (1962) *J Am Chem Soc* 84:2495–2499
- Angelici RJ, Basolo F (1963) *Inorg Chem* 2:728–731
- Hieber W, Fuchs H (1941) *Z Anorg Allg Chem* 248:256–268
- McPherson LD, Drees M, Khan SI, Strassner T, Abu-Omar MM (2004) *Inorg Chem* 43:4036–4050
- Lente G, Espenson JH (2000) *Inorg Chem* 39:4809–4814
- Gable KP, Brown EC (2003) *J Am Chem Soc* 125:11018–11026
- Zingales F, Sartorelli U, Canziani F, Raveglia M (1966) *Inorg Chem* 6:154–157
- Casey CHP, Nash JR, Yi CHS, Selmecky AD, Chung S, Powell DR, Hayashi RK (1997) *J Am Chem Soc* 120:722–733
- Wang Y, Espenson JH (2002) *Inorg Chem* 41:2266–2274
- Dixon JN, Espenson JH (2002) *Inorg Chem* 41:4727–4731
- Holder GN, Bottomley LA (1992) *Inorg Chim Acta* 194:133–137
- van Kirk CHC, Bereau V, Abu-Omar MM, Evans DH (2003) *J Electroanal Chem* 541:31–38
- Duatti A, Rossi R, Magon L (1983) *Transit Met Chem* 8:170–174
- Koudelkova M, Jedinakova-Krizova V (2003) *J Chromatogr A* 990:317–323
- Kohlickova-Koudelkova M, Jedinakova-Krizova V, Deyl Z (2002) *Electrophoresis* 23:245–248
- Kohlickova M, Jedinakova-Krizova V (1999) *Konirova. J Radioanal Nucl Chem* 242:545–549
- Wu L, Zhou L, Liu DQ, Vogt FG, Kord AS (2011) *J Pharm Biomed Anal* 54:331–336
- Burns RB, Burton RW, Albon SP, Embree L (1996) *J Pharm Biomed Anal* 14:367–372
- Das S, Chakraborty I (2006) *Transit Met Chem* 31:181–185
- Nicholson T, Kramer DJ, Davison A, Jones AG (2001) *Inorg Chim Acta* 316:110–112
- Valliant JF, Riddoch RW, Hughes DW, Roe DG, Farconnier TK, Thornback JR (2001) *Inorg Chim Acta* 352:155–163
- Donghi D, Maggioni D (2014) *Álfonso G, Beringhelli T. J Organomet Chem* 751:462–470
- Machura B, Dziegielewski JO, Michalik S (2003) *Transit Met Chem* 28:939–947
- Bogado AL, Barbosa MIF, de Souza GD, Trappi MA, Filho ER, Ueno LT, Machado AEH, Batista AA (2010) *J Organomet Chem* 695:1708–1714
- Hori H, Ishitani O, Koike K, Takeuchi K (1996) *Anal Sci* 12:587–590
- Hori H, Ishihara J, Koike K, Takeuchi K, Ibusuki T, Ishitani O (1997) *Chem Lett* 3:273–274
- Tisato F, Bolzati C, Porchia M, Refosco F (2004) *Spectrum Rev* 23:309–332
- Mirkhani V, Kia R, Milic D, Vartooni AR, Matkovic-Calogovic D (2010) *Transit Met Chem* 35:81–87
- Sticha M, Jelinek I, Polakova J, Kaliba D (2015) *Anal Lett* 48:2329–2342

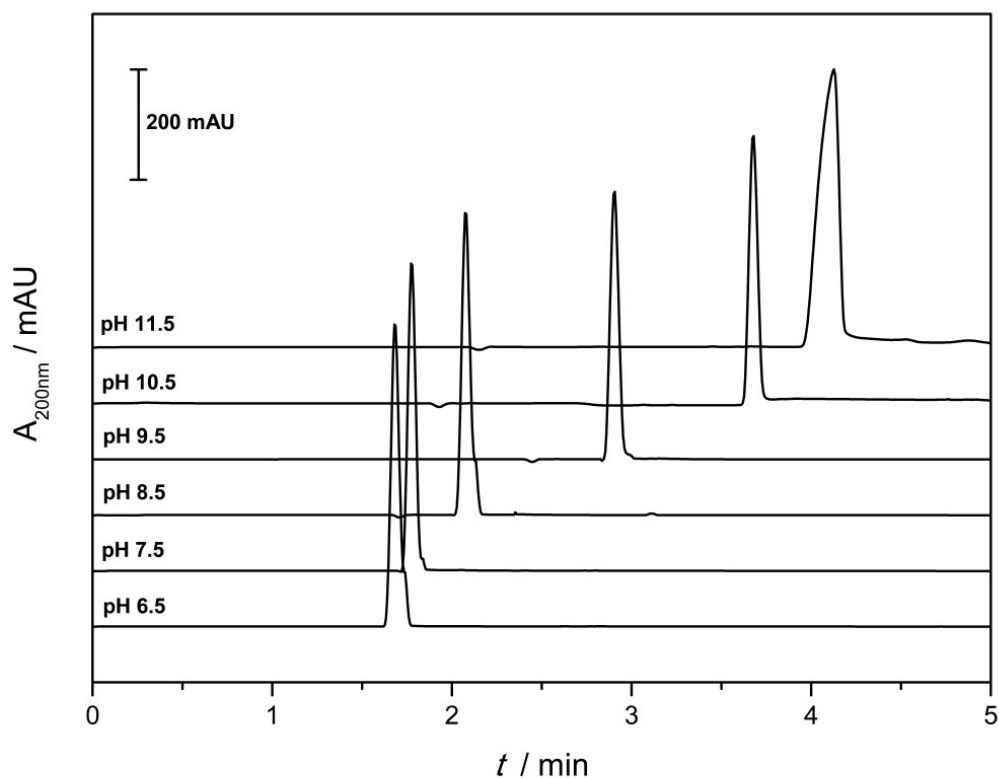
5.3 Separace reakční směsi obsahující rheniové komplexy s aromatickými ligandy metodou kapilární zónové elektroforézy (komentář k publikaci IV)

Analytická kontrola radiofarmak zahrnuje stanovení radionuklidické, radiochemické a chemické čistoty připravené substance. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) s radiometrickou detekcí byla po mnoho let využívána k analýze rheniových radiofarmak, zejména pro stanovení výtěžku radiochemické komplexace. Výhodou TLC je její rychlost a instrumentální nenáročnost, nepatří však mezi techniky s vysokou separační účinností schopnou rozlišit a selektivně kvantifikovat strukturně blízké analyty. Elektromigrační metody (např. kapilární zónová elektroforéza) jsou vhodným kandidátem k separaci reakční směsi obsahující rheniové nebo techneciové komplexy [137, 138, 140]. Kapilární elektroforéza s hmotnostním detektorem byla také úspěšně využita ke strukturální charakterizaci rheniového komplexu s glycyglylcysteinem a cysteinglycynem syntetizovaných v ligand vyměňujících reakcích [232].

Cílem publikace IV je vývoj a částečná validace metody kapilární zónové elektroforézy pro separaci složek reakční směsi během přípravy rheniového komplexu, vznikajícího při reakci rheniového prekursoru tetrabutylamonium tetrachloroxorhenatu s ligandem 1,2,3-trihydroxybenzenem v přítomnosti 16 ekvivalentů TEA.

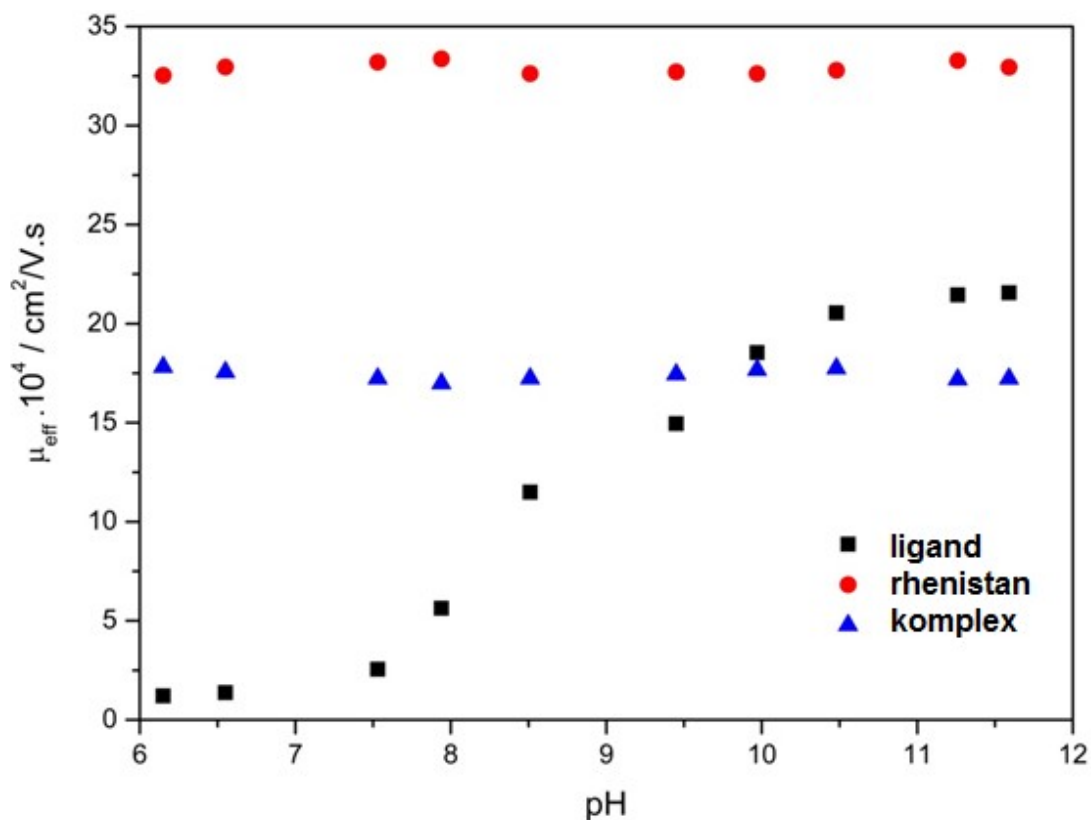
Reakční směs obsahující dominantní rheniový komplex bis(1,2,3-trihydroxybenzen)dioxorhenium^{+VII} (postup přípravy dle publikace II a III) byla separována metodou CZE s DAD detekcí v borátových a fosfátových nosných elektrolytech.

Vliv pH nosného elektrolytu na efektivní elektroforetickou mobilitu jednotlivých složek reakce byl zkoumán v rozmezí hodnot 6,50 – 11,70 pro fosfátový a 6,50 - 11,50 pro borátový nosný elektrolyt. Koncentrace ko-iontů nosných elektrolytů byla upravována v rozmezí 5 – 10 mmol dm⁻³ tak, aby vodivost nosných elektrolytů byla konstantní. Rheniový komplex, 1,2,3-trihydroxybenzen (ligand v nadbytku) i rhenistan (rozkladný produkt) migrují jako anionty. Dle předpokladu byla změna efektivní elektroforetické mobility při změně pH pozorována pouze u ligandu, který má charakter slabé kyseliny. Vliv pH na migrační čas 1,2,3-trihydroxybenzenu v borátovém nosném elektrolytu je ukázán na obrázku 5.10. Téměř symetrické píky pozorované v slabě kyselých a slabě zásaditých nosných elektrolytech se mění na tvar frontujícího trojúhelníku při silně alkalickém pH.



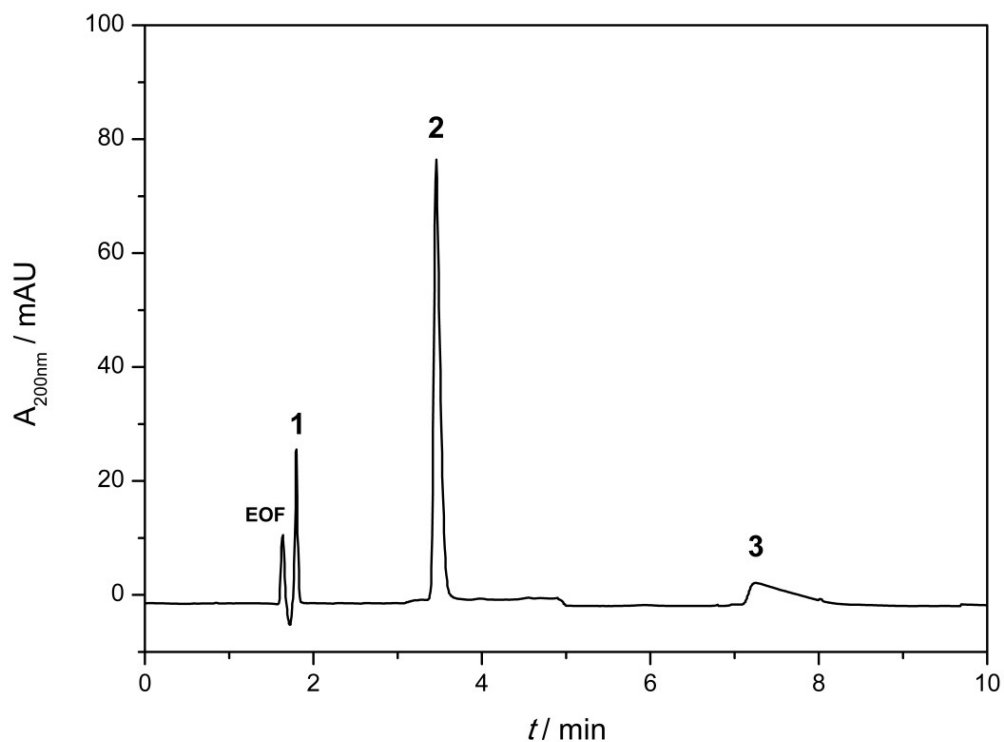
Obr. 5.10 Vliv pH na migrační čas ligandu 1,2,3-trihydroxybenzenu v borátovém nosném elektrolytu ($5 - 10 \text{ mmol dm}^{-3}$) v rozmezí hodnot pH 6,50 – 11,50. CZE podmínky: $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 25 kV , $16 - 30 \text{ } \mu\text{A}$, detekce při 200 nm . Počáteční koncentrace ligandu $0,20 \text{ mg ml}^{-1}$.

Sledování průběhu efektivní elektroforetické mobility sledovaných látek na pH (Obr. 5.11) ukázala, že vzniklý komplex i rhenistan mají jako silné elektrolyty prakticky konstantní hodnotu elektroforetické pohyblivosti ve sledovaném intervalu pH. Ligand vykazuje jakožto slabá kyselina charakteristický sigmoidní charakter, ze kterého je možné odečíst zdánlivou hodnotu jeho disociační konstanty. Odečtená hodnota pK_a 9,20 je nižší než tabelovaná hodnota [233], pravděpodobně v důsledku tvorby komplexu s borátovým ko-iontem. Obrázek závislosti efektivní pohyblivosti složek reakční směsi na pH fosfátového pufru je ukázán v sekci Přílohy IV/1.



Obr. 5.11 Závislost efektivní pohyblivosti nezreagovaného ligandu, rhenitanu a komplexu na měnící se hodnotě pH v 10 mmol dm⁻³ borátovém pufru. CZE podmínky: 25 °C, 25 kV, 12 - 30 μA, detekce 200 nm. Počáteční koncentrace složek reakce: ligand (0,16 mg ml⁻¹), prekursor (0,29 mg ml⁻¹).

Elektroforetická separace sledovaných složek reakční směsi je možná v borátových i fosfátových nosných elektrolytech v celém sledovaném rozsahu pH. Opakovaná měření prokázala, že z hlediska dosažitelné citlivosti, separační účinnosti a minimální doby analýzy je výhodné použít neutrální či slabě bazický borátový nosný elektrolyt. Výsledný elektroferogram dokumentující separaci sledovaných složek reakční směsi v borátovém pufru o pH 7,50 je ukázán na obrázku 5.12. V tomto nosném elektrolytu byly určeny i základní validační parametry stanovení sledovaných složek reakční směsi. Hodnoty koeficientu determinace, limitu detekce, limitu kvantifikace a lineárního rozsahu, vypočtené pro ligand a prekursor, jsou uvedeny v tabulce 5.3.



Obr. 5.12 Elektroferogram reakční směsi obsahující ligand (1), komplex (2) a rhenistan (3) po 60 minutách reagování a přidavku 16 ekvivalentů triethylaminu v 10 mmol dm⁻³ borátovém pufru (pH 7,50). CZE podmínky: 25 °C, 25 kV, 20 μA, detekce při 200 nm. Počáteční koncentrace: ligand (0,16 mg ml⁻¹), prekursor (0,29 mg ml⁻¹)

Tab. 5.3 Validační parametry pro CZE analýzu reakční směsi obsahující rheniový komplex

Analyt	R ²	Lineární rozsah (μg μl ⁻¹)	LOD (μg μl ⁻¹)	LOQ (μg μl ⁻¹)	Standardní chyby směrnice	Standardní chyby úseku
Rhenistan	0,989	1 – 10	0,152	0,458	124,5	10,1
Ligand	0,992	1 - 10	0,184	0,543	99,8	15,7

Data získaná metodou kapilární zónové elektroforézy ukázala, že reakční směs obsahující rheniový komplex, nezreagovaný ligand a prekursor je možné úspěšně rozseparovat na jednotlivé složky reakce v borátovém i fosfátovém pufru. Všechny složky reakce bylo možné odělit od sebe během 10 minut. Kapilární elektroforéza také prokázala chování výsledného komplexu a prekursoru jako silného elektrolytu, jejichž elektroforetická pohyblivost není závislá na pH nosného elektrolytu. Hodnoty limitu detekce a limitu kvantifikace odpovídají dříve publikovaným vědeckým pracem věnujícím se separaci rheniového komplexu s odlišným ligandem. Data získaná kapilární elektroforézou mohou napomoci rychlejší separaci komerčně dostupné reakční směsi a tedy i možnosti kontroly vzniku a výtěžku výsledného komplexu před vlastní aplikací do těla pacienta.

PUBLIKACE IV

Název	<i>Application of capillary electrophoresis to the separation of rhenium complex of <u>1,2,3-trihydroxybenzene</u></i>
Autoři	Kaliba David Štícha Martin Jelínek Ivan Poláková Jana Radová Jana
Časopis	Monatshefte für Chemie
Volume:Issue	148
Stránky	1619-1624
Rok	2017

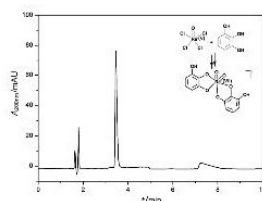
Application of capillary electrophoresis to the separation of rhenium complex of 1,2,3-trihydroxybenzene

David Kaliba¹ · Martin Štícha² · Ivan Jelínek¹ · Jana Poláková² · Jana Radová¹

Received: 26 January 2017 / Accepted: 10 April 2017 / Published online: 4 July 2017
© Springer-Verlag Wien 2017

Abstract A capillary zone electrophoretic method has been developed for a separation of a reaction mixture of a rhenium complex. The rhenium complex was synthesized in a reaction of a rhenium precursor and 1,2,3-trihydroxybenzene in acetonitrile with triethylamine addition. The capillary electrophoretic method has been used for the separation in borate and phosphate buffer (pH 6.30–11.80). All components in the reaction mixture (unreacted precursor, ligand, and final rhenium complex) have been determined by capillary zone electrophoresis with UV–Vis detection in an aqueous running electrolyte within 10 min. Dependencies of effective electrophoretic ion mobility on the pH value have been determined for the ligand, unreacted precursor, and final complex in both electrolytes.

Graphical abstract



Keywords Capillary zone electrophoresis · Coordination chemistry · Metal complexes · Organometallic compounds · Transitions metal compounds

Introduction

Medical inorganic chemistry is rapidly developing. It offers new possibilities in pharmaceutical industries, which have been traditionally dominated by organic chemistry so far. In developing diagnostics radiopharmaceuticals, a rising attention is paid to the incorporation of radionuclides with optimal decay characteristics into tracer molecules. In this respect, technetium-99 m is an ideal choice (γ -emitter, $E_{\text{MAX}} = 140$ keV, $t_{1/2} = 6$ h). It is well established in nuclear medicine and available from commercial $^{99}\text{Mo}/^{99}\text{Tc}$ generator columns [1–5]. Furthermore, the radionuclides of rhenium, the Group 7 congener of Tc, are β -emitters with suitable properties for therapeutic applications (^{186}Re , $E_{\text{MAX}} = 1.07$ MeV, $t_{1/2} = 90$ h, ^{188}Re , $E_{\text{MAX}} = 2.12$ MeV, $t_{1/2} = 17$ h) [6, 7]. In addition, the rhenium isotopes possess approximately the same photon emission energy as that of $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Owing to this property, it is possible to monitor the biodistribution of rhenium radiopharmaceuticals with the same equipment employed for the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ agents [8]. The oxidation state +V has been investigated most commonly among the numerous oxidation states of technetium and rhenium, owing to its diverse coordination chemistry.

Transition metal-oxo-complexes show a fascinating variety of structures and reactivities. There is a considerable interest in the chemistry of inorganic compounds containing an oxygen atom that is multiply bonded to a transition metal. Oxo-complexes are catalysts for organic reactions, provide a model for active sites in heterogenous

✉ David Kaliba
kalibad@natur.cuni.cz

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

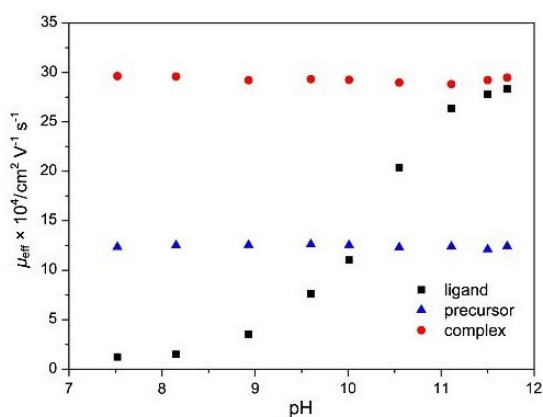


Fig. 2 Dependence of the migration times of the unreacted precursor, unreacted ligand, and complex upon the pH of 10 mmol phosphate buffer. CE conditions: 25 °C, 25 kV, 13–25 μ A, and 200 nm detection. Initial concentration conditions: ligand (0.16 mg cm^{-3}) and precursor (0.29 mg cm^{-3})

mobility of the complex **1** remains constant within the studied pH range. Obviously, the same characteristic was observed for the precursor. PG behaves as a weak acid and provides a characteristic sigmoidal dependence. Its point of inflection at pH 10.20 correlates with the tabulated pK value of PG [23].

Separation in borate buffers

The effective ion mobility dependencies on the pH value for the complex **1**, perhenate, and PG within the pH interval 6.20–11.60 are shown in Fig. 3. In case of the perhenate and the complex **1**, the dependencies are linear with zero slopes. A slight increase of an effective electrophoretic mobility of the complex **1** for the highest pH values indicates a possible dissociation of PG ligands non-coordinated hydroxyl group. PG behaves as a weak acid. However, the rate of PG dissociation and ionic mobility is significantly shifted, compared to the measurements in the phosphate buffers. This difference can be explained by a formation of a complex with boric acid promoting PG acidic character. A borate buffer of pH 7.50 was selected for the compounds' reasonable migration time, better separation, greater absorbance, and fairly good peak shapes. All components were separated and quantified in the borate buffer (pH 7.50), as displayed in Fig. 4.

Linearity

The calibration curves were plotted (concentration vs. peak area) in the concentration range from 1.000 to 10.00 $\mu\text{g mm}^3$ for the rhenium precursor and PG. The

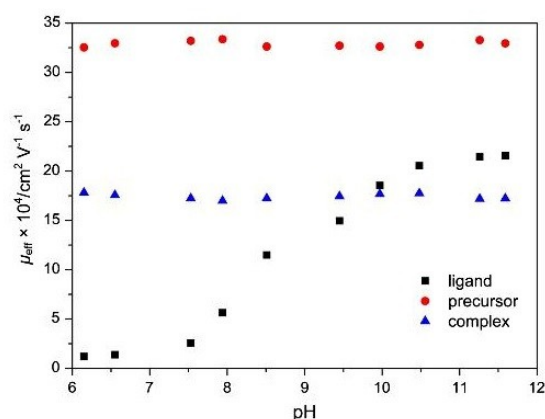


Fig. 3 Dependence of the migration times of the unreacted precursor, unreacted ligand, and complex upon the pH of 10 mmol borate buffer. CE conditions: 25 °C, 25 kV, 12–30 μ A, and 200 nm detection. Initial concentration conditions: ligand (0.16 mg cm^{-3}) and precursor (0.29 mg cm^{-3})

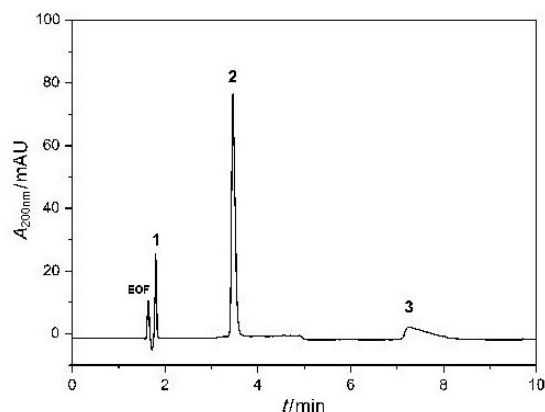


Fig. 4 Electropherogram of the standard mixture solution containing PG (**1**), complex (**2**), and unreacted precursor (**3**) after 60 min of reacting with the addition of 16 equivalents of TEA. 10 mmol borate buffer, pH 7.50. CE conditions: 25 °C, 25 kV, 13–25 μ A, and 200 nm detection. Initial concentration conditions: ligand (0.16 mg cm^{-3}) and precursor (0.29 mg cm^{-3})

linearity of the calibration curves for the final complex has not been developed. The response was linear with the coefficient of determination (R^2) = 0.989 for the rhenium precursor and 0.992 for the PG. Regression equations, linear ranges, and values of coefficient of determination are shown in Table 1.

Concentrations of the PG, complex **1**, and perhenate were calculated based on calibration curves and plot areas. After 60 min of reacting, the concentration of the PG has decreased by 85% from the initial concentration 0.16 mg cm^{-3} (average area 151 AU) to 0.025 mg cm^{-3}

Table 1 Analytical data for the determination of analytes

Analytes	R^2	Linear range/ $\mu\text{g mm}^{-3}$	LOD/ $\mu\text{g mm}^{-3}$	LOQ/ $\mu\text{g mm}^{-3}$	Standard errors of intercept	Standard errors of slope
Precursor	0.989	1–10	0.152	0.458	124.5	10.1
Ligand	0.992	1–10	0.184	0.543	99.8	15.7

(area 22.7 AU). The concentration of the perrhenate decreased from 0.29 to 0.07 mg cm^{-3} (75%).

Conclusion

A capillary zone electrophoresis was used as a fast separation method suitable for a monitoring of the rhenium(VII)-pyrogallol complex formation directly in a reaction mixture. An optimized capillary zone electrophoresis (CZE) method provided highly resolved peaks of a rhenium(VII)-pyrogallol complex, pyrogallol (PG), and perrhenate—major reaction mixture compounds. Based on the obtained calibration data, it was possible to quantify these compounds. The proposed CZE method is considered to be a complementary method to HPLC. It is going to be utilized for an optimization of rhenium complex preparation procedures and for a purity check of isolated complexes.

CZE provided additional data concerning the acid–base characteristics of the separated compounds. The measured dependencies of the effective electrophoretic mobility of the rhenium(VII)-PG complex on the pH value in phosphate and borate buffers are linear with zero slopes. This confirms the rhenium complex to have a character of a strong electrolyte, migrating as a singly charged anion throughout monitored pH range. A slight increase in effective ion mobility for studied borate buffer with highest pH value is probably connected with an additional dissociation of a non-coordinated hydroxyl group on a PG ligand. A significant difference in a degree of dissociation of a PG in borate and phosphate buffers indicates the formation of the PG-borate buffer by-product with an increased acidity and ionic mobility.

Experimental

Tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenate [(*n*-Bu₄N)(ReOCl₄)] and triethylamine (TEA, used as a 10% (w/w) stock solution in acetonitrile) were purchased from Sigma-Aldrich (Gillingham, Dorset, UK). Ligand 1,2,3-trihydroxybenzene (99%) was purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, GER). Acetonitrile HPLC grade was purchased from Lachner (Neratovice, CZE). Electrospray tuning mix for ion trap was purchased from Agilent (Santa Clara, USA). Boric acid

(98%), sodium tetraborate (99%), sodium hydrogenphosphate (99%), and sodium dihydrogenphosphate monohydrate (99%) for background electrolytes were purchased from Lachema (Brno, CZE). Sodium hydroxide (99%) was purchased from Fisher Scientific (Pardubice, CZE).

Instrumentation

A capillary electrophoresis system 7100 (Agilent Technologies, Walbronn, GER) equipped with an on-line diodearray detector (DAD) operated at 200 nm was used. Table 2 summarizes experimental CZE parameters for the individual buffers. For each electropherogram, spectra were registered in the range 200–600 nm each 2 nm, at regular steps 0.8 s for a total time of 5–20 min.

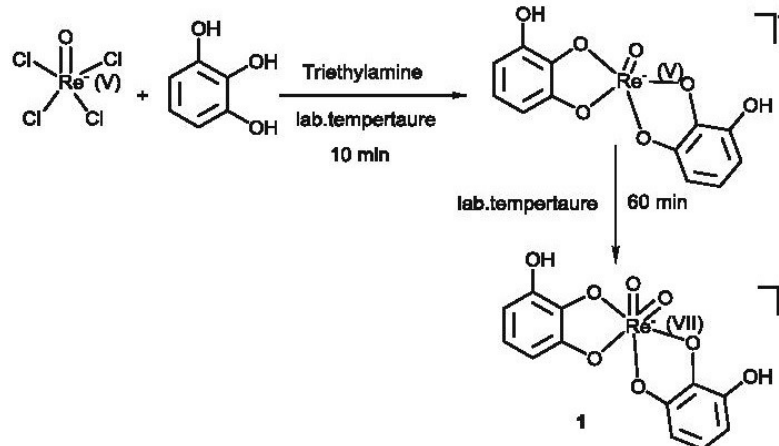
Solid substances were weighted using Sartorius 7085011 micro balances (Sartorius GmbH, Gottingen, GER). The pH values of background electrolytes were followed by pH XS pH50 lab (Verkon, CZE), calibrated by calibration solutions containing potassium hydrogen phthalate (pH 4.00), disodium hydrogen phosphate/potassium dihydrogen phosphate (pH 7.00), and sodium hydrogen carbonate/sodium carbonate (pH 10.01) (Merck, GER).

The electrospray mass spectrometry (ESI-MS) experiments were conducted on an ion trap instrument Esquire 3000 (Bruker Daltonics, GER) and controlled by the Esquire Control 5.3.11 software and data were processed via Data Analysis 3.3.56 software (Bruker Daltonics, GER). ESI-MS data were collected in a negative ion mode at a scan range from $m/z = 300$ –650. In all ESI-MS measurements, the nebulizer gas pressure was 124.1 kPa at a flow rate 5 $\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$, the desolvation temperature was 300 °C, and capillary voltage was

Table 2 Experimental parameters for CZE measurements

Parameter	Borate buffer	Phosphate buffer
Voltage applied/kV	25	25
Hydrodynamic injection/mbar	30	30
Injection time/s	30	30
DAD detector/nm	200	200
Current/A	12–30	13–25
Cassette temperature/°C	25	25
Analysis time set/min	5	10
Buffer concentration/mmol	5–10	5–10
pH	6.23–11.59	7.52–11.83

Scheme 1



adjusted to 4000 V. The sample solutions were delivered to the nebulizer by a syringe pump (Cole Parmer, USA) at a flow rate $8 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$.

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on CD_3CN solutions on a Bruker Varian (300.54 and 100.11 MHz) NMR spectrometer (Bruker Corporation, USA). IR spectra were recorded on a NICOLET 380 FTIR ThermoScientific instrument using KBr discs (ThermoScientific, USA).

Bis(1,2,3-trihydroxybenzene)dioxorhenium(VII) complex (1, $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_8\text{Re}$)

The reaction of 0.88 mg (*n*-But₄)[ReOCl₄] (1.42 μmol) with 0.48 mg 1,2,3-trihydroxybenzene (PG, 3.81 μmol) in 3 cm^3 acetonitrile was performed at the room temperature. After 10 min, 16 equivalents of TEA (52.5 mm^3 of 10% TEA solution in acetonitrile) were added. The resulting yellow colored solution containing the major compound bis(1,2,3-trihydroxybenzene)dioxorhenium(V) ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_7\text{Re}$) changed in the presence of TEA to a brown solution with bis(1,2,3-trihydroxybenzene)dioxorhenium(VII) (**1**, $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_8\text{Re}$) as the major complex after 60 min. After evaporation of acetonitrile, the crude product was recrystallized from a state solvent used for a recrystallization of **1** to obtain 0.63 mg of a yellow solid with 90% yield. IR and NMR spectra were found to be identical with the ones described in [24]. Mass values: theoretical monoisotopic $m/z = 466.9$ (M^-) and obtained by ESI-MS $m/z = 466.6$ (M^-). The reaction scheme of a complex preparation and structure of intermediate are shown in Scheme 1.

Electrophoresis

The separation was performed in fused silica capillaries [50 cm (41.5 cm to detector) \times 50 μm I.D.] from Polymicro

Technologies (Phoenix, AZ, USA) operated at 25 $^\circ\text{C}$. Capillaries were rinsed with 100 mmol aqueous sodium hydroxide for 60 min and distilled water for 60 min before the use. At the beginning of the day, the capillary was rinsed with water for 10 min (90 kPa), flushed with an aqueous NaOH 100 mmol for 10 min, and rinsed with water for 5 min (90 kPa). For the separation, the capillary was previously flushed with BGE for 1.5 min (90 kPa) and after the separation, in the post-conditioning; it was rinsed with water (1.5 min, 90 kPa) and BGE (1.5 min, 90 kPa). In every three injections, the post-conditioning was changed as follows: rinse with water for 10 min (90 kPa), flush with aqueous NaOH 100 mmol (90 kPa, 5 min), and rinse with water for 5 min (90 kPa).

All 5–10 mmol phosphate and borate electrophoresis buffers were prepared by weighing adequate amounts of sodium hydrogenphosphate, sodium dihydrogenphosphate, boric acid, and sodium tetraborate, respectively, and dilution in ultrapure water. The pH values of prepared running buffers were adjusted to appropriate value by a saturated solution of sodium hydroxide.

Acknowledgements This research was carried out within the framework of the project of the Specific University Research (SVV 260440). The Norwegian Financial Mechanism Project CZ01116 is gratefully acknowledged.

References

1. Dilworth JR, Parrott SJ (1998) *Chem Soc Rev* 27:43
2. Hom RK, Katzenellenbogen JA (1997) *Nucl Med Biol* 24:485
3. Jurisson S, Berning D, Jia W, Ma D (1993) *Chem Rev* 93:1137
4. Pinkerton TC, Desilets CP, Hoch DJ, Mikelsons MV, Wilson GM (1985) *J Chem Ed* 62:965

5. Deutsch E, Libson K (1984) *Comments Inorg Chem* 3:83
6. Spies H, Fietz T, Glacer M, Pietsch HJ, Johanssen B (1995) *Technetium and rhenium chemistry and nuclear medicine*. S.G. Editorali, Padua
7. Yorke ED, Beaumier PL, Wessels BW, Fritzbeg AR, Morgan AC (1991) *Nucl Med Biol* 18:827
8. Schubiger PA, Alberto R, Smith A (1996) *Bioconjug Chem* 7:165
9. Michos D, Luo XL, Crabtree RH (1992) *J Chem Soc Dalton Trans* 10:1735
10. Connac F, Lucchese Y, Dartiguenave M, Beauchamp AL (1997) *Inorg Chem* 36:256
11. Leigh GJ, Morris RH, Pickett CJ, Stanley DR, Chatt J (1981) *J Chem Soc Dalton Trans* 3:800
12. Over DE, Critchlow SC, Mayer JM (1992) *Inorg Chem* 31:4643
13. Groves JT, Nemo TE (1983) *J Am Chem Soc* 105:5786
14. Burgmayer SJN, Stiefel EI (1985) *J Chem Ed* 62:943
15. Wittrisch H, Conradi S, Rohde E, Vogt J, Vogt C (1997) *J Chromatogr A* 781:407
16. Jankowsky R, Friebe M, Noll B, Johanssen B (1999) *J Chromatogr A* 833:83
17. Van Schepdael A, Verbeke K, Van Nerom C, Hoogmartens J, Verbruggen A (1997) *J Chromatogr B* 697:251
18. Kohlíčková-Koudelková M, Jedináková-Křížová V, Deyl Z (2002) *Electrophoresis* 23:245
19. Koudelková M, Jedináková-Křížová V (2003) *J Chromatogr A* 990:317
20. Kohlíčková-Koudelková M, Konířová R, Jedináková-Křížová V (2003) *J Radioanal Nucl Chem* 258:627
21. Jankowsky R, Kirsch S, Reich T, Spies H, Johanssen B (1998) *J Inorg Biochem* 70:99
22. Sticha M, Jelinek I, Polakova J, Kaliba D (2015) *Anal Lett* 48:2329
23. Kim H, Chung TD, Kim H (2001) *J Electrochem Chem* 498:209
24. Kaliba D, Sticha M, Jelinek I (2017) *Transit Met Chem* 42:211

6 ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce je komentovaným souborem čtyř vědeckých publikací otištěných v mezinárodních impaktovaných časopisech. V práci jsou uvedeny a diskutovány možnosti syntézy rheniových komplexů v aerobních i anaerobních podmínkách v reakcích tetrabutylamonium tetrachlorooxorhenátu jako rheniového prekurzoru s aromatickými ligandy 1,2-dihydroxybenzenem, 1,2,3-trihydroxybenzenem a 2,3-dihydroxynaftalenem. Během syntézy byla zjištěna nestabilita některých komplexů, které přecházejí na jinou stabilnější formu většinou doprovázanou změnou oxidačního čísla rheniového centrálního atomu. Jako klíčový při optimalizaci přípravy se ukázal přídavek triethylaminu jako akceleratoru reakce do reakční směsi. V závislosti na molárním přebytku přidaného triethylaminu docházelo ke vzniku rozdílných výsledných komplexů. Jako rozhodující pro průběh studovaných komplexotvorných reakcí se ukázal přídavek 4 ekvivalentů TEA vzhledem k prekurzoru.

Hmotnostní spektrometrie s měkkými ionizačními technikami (elektrosprejová ionizace, fotoionizace za atmosférického tlaku, chemická ionizace za atmosférického tlaku a laserová desorpční ionizace) byla úspěšně využita ke strukturní charakterizaci všech typů komplexů vzniklých při reakci prekurzoru s ligandy a ke studiu kinetiky jednotlivých konverzních a degradačních reakcí. Na základě dat z hmotnostní spektrometrie byly navrženy struktury zkoumaných komplexů a přiřazena oxidační čísla rheniovému atomu. Strukturální data z hmotnostní spektrometrie byla porovnána s daty z nukleární magnetické resonance a infračervené spektrometrie. Nezávisle na použitém ligandu mohou být pozorované reakce rozděleny na rychlé (zahrnující okamžité zformování rheniového komplexu) a na pomalé (zahrnující oxidaci centrálního atomu doprovázenou možnými změnami ligandu navázaného na centrální atom). Je možno konstatovat, že příprava rhenium^{+VII}-komplexů s organickými ligandy přímo z Re^{+VII} (rhenistanu) bez předchozí redukce je nemožná a jedinou cestou přípravy stabilních komplexů Re^{+VII} je kontrolovaná postupná oxidace komplexů s nižším oxidačním číslem centrálního atomu.

Druhá část disertační práce se zabývá monitorováním a separací reakční směsi obsahující rhenium^{+VII}-1,2,3-trihydroxybenzenový komplex, prekurzor a nezreagovaný ligand metodou kapilární zónové elektroforézy. Optimalizovaná metoda kapilární elektroforézy ve vodných základních elektrolytech byla úspěšně využita k separaci všech

složek reakční směsi a poskytuje dokonale rozdělené píky. Nově vyvinutá metoda kapilární elektroforézy byla částeně analyticky validována. Na základě získaných experimentálních dat byly zjištěny závislosti elektroforetické mobility jednotlivých složek na pH základní elektrolytu. Z dat je patrné, že rheniový komplex vykazuje lineární závislost s nulovou směrnici, což potvrzuje charakter silného elektrolytu nesoucího jednotkový záporný náboj. Hodnota pH základní elektrolytu ovlivňuje elektroforetickou mobilitu pouze nezreagovaného ligandu přítomného v reakční směsi. Rozdíl v migračním chování ve fosfátovém a borátovém pufru může být vysvětlen rozdílným stupněm disociace ligandu v důsledku tvorby komplexu s borem, který je kyselejší než samotný ligand. Kapilární elektroforéza také prokázala svou vhodnost pro případné hlubší využití v medicínské praxi při ověřování proběhnutí reakce u běžně dostupných kitů před aplikací do těla pacienta.

Všechny cíle disertační práce byly úspěšně splněny. Data získaná při měření disertační práce mohou v budoucnu napomoci ovlivnit rychlost reakce syntézy rheniových komplexů (prokázání vhodnosti přídavku TEA do reakční směsi), strukturální charakterizaci těchto komplexů (hmotnostní spektrometrie s měkkými ionizačními zdroji) a separaci reakční směsi a kontrolu výtěžnosti reakce (metoda kapilární elektroforézy ve vodném nosném elektrolytu).

7 SEZNAM PUBLIKACÍ A KONFEREČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ

Publikace:

- [1] Štícha M., Jelínek I., Poláková J., Kaliba D.: Characterization of Rhenium(V) complexes with phenols using mass spectrometry with selected soft ionization techniques. *Analytical Letters* **48**, 2329-2342 (2015)
- [2] Štícha M., Kaliba D., Jelínek I., Poláková J.: Analytical study of rhenium complexes with pyrogallol and catechol. *Chemical Papers* **71**, 819-830 (2017)
- [3] Kaliba D., Štícha M., Jelínek I.: Synthesis and characterization of rhenium complexes of 1,2,3-trihydroxybenzene as potential antitumor agents. *Transition Metal Chemistry* **42**, 211-218 (2017)
- [4] Kaliba D., Štícha M., Jelínek I., Poláková J., Radová J.: Application of capillary electrophoresis to the separation of rhenium complexes of 1,2,3-trihydroxybenzene. *Monatshefte für Chemie* **148**, 1619-1624 (2017)

Konferenční příspěvky:

- Kaliba D., Jelínek I., Štícha M., Vaňátková P.: *Characterization of rhenium(V) complexes with phenols using mass spectrometry with soft ionization techniques and stability investigation for complex with 1,2,3-trihydroxybenzene ligand.* 18th edition of EuroAnalysis The European Conference of Analytical Chemistry 2015, Bordeaux, Francie 6.–10.9.2015.
- Kaliba D., Jelínek I., Štícha M., Vaňátková P.: *Kinetic study of rhenium complexes with 1,2,3-trihydroxybenzene.* 11th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”, Praha, Česká republika 23.-24.9.2015.

- Kaliba D., Jelínek I., Štícha M.: *Hmotnostní spektrometrie komplexů rhenia s aromatickými ligandy*. Perspektivy v analytické chemii PACH 2016, Praha, Česká republika 15.2.2016
- Kaliba D., Jelínek I., Štícha M., Poláková J.: *Analytical study of biologically active rhenium complexes with aromatic alcohol ligands*. 31st International Symposium of Chromatography ISC 2016, Cork, Irsko 28.8.-1.9.2016
- Kaliba D., Štícha M., Jelínek I., Poláková J.: *Determination of rhenium complexes with 1,2-dihydroxybenzene and 1,2,3-trihydroxybenzene by CZE compared with HPLC-UV/MS method*. 12th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”, Praha, Česká republika, 22.-23.9.2016
- Štícha M., Kaliba D., Jelínek I., Dian J.: *Spectroelectrochemistry of rhenium-catechol complexes*. Spectroelectrochemistry Brno 2016, Brno, Česká republika
- Kaliba D., Jelínek I., Štícha M., Poláková J.: *Determination of rhenium(VII) complexes of 1,2-dihydroxybenzene by CZE and HPLC*. 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques ITP 2017, Sopot, Polsko 10.-13.9.2017

8 LITERATURA

- [1] O. Glasser: *Wilhelm Conrad Röntgen and the early history of the roentgen rays*. Norman Publishing (1993) ISBN 0930405226.
- [2] M. Hrabak, R. S. Padovan, M. Kralik, D. Ozretic, K. Potocki: Nikola Tesla and the Discovery of X-rays. *RadioGraphics* 28, 1189–1192 (2008)
- [3] G. Hevesy: *Adventures in Radioisotope Research*, 1. vyd., 27 s., Perhamon. New York (1962) ISBN: BWB12948663
- [4] I. Komorousová, B. Schmidtmayerová: *Metody nukleární medicíny*. Centrum nukleární medicíny. (2010), dostupné z WWW: <http://zdravi.e15.cz/clanek/sestra/metody-nuklearni-mediciny-v-onkologii-452670> [cit.: 21. 10. 2017]
- [5] P. Koranda: *Nukleární medicína*, 1. vyd. 204 s., Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc (2014) ISBN: 9788024440316
- [6] A. Malán: *Vybrané kapitoly z nukleární medicíny*, 1. vyd., KC Solid. Rokycany (2013)
- [7] P. Koranda, M. Mysliveček, V. Hušák: *Nukleární medicína v diagnostice nádorů a zánětů*, 1. vyd. 69 s., Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc (2002) ISBN: 80-244-0509-1.
- [8] Whitehead Institute for Biomedical Research: *Scientists revisit „Hallmarks of Cancer“*, dostupné online z WWW: <https://www.sciencedaily.com/releases/2011/03/110316113057.htm> [cit.: 22. 3. 2018]
- [9] D. Hanahan, R. A. Weinberg: Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell* 144, 646-674 (2011)
- [10] Z. Joukalová: *Rizikové faktory nádorových onemocnění*, dostupné z WWW: <https://www.mou.cz/rizikove-factory-nadorovych-onemocneni/t3019> [cit.: 22. 3. 2018]
- [11] P. Fadrus, R. Lakomý, P. Hübnerová, O. Slabý, M. Keřkovský, T. Svoboda, V. Vybíhal, E. Neuman, S. Kryštofová, M. Sova, M. Smrčka: Intraniální nádory – diagnostika a terapie. *Interní Medicina* 12, 376-381 (2010)
- [12] T. M. Allen: Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews* 2, 750-763 (2002)

- [13] L. Brannon-Peppas, J. O. Blanchette: Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews* **64**, 206-212 (2012)
- [14] B. B. Aggarwal, S. Shishodia: Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology* **71**, 1397-1421 (2006)
- [15] K. D. Miller, R. L. Siegel, Ch. Ch. Lin, A. B. Mariotto, J. L. Kramer, J. H. Rowland, K. D. Stein, R. Alteri, A. Jemal: Cancer treatment and survivorship statistic 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **66**, 271-289 (2016)
- [16] C. E. DeSantis, Ch. Ch. Lin, A. B. Mariotto, R. L. Siegel, K. D. Stein, J. L. Kramer, R. Alteri, A. Jemal: Cancer treatment and survivorship statistic 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **64**, 252-271 (2014)
- [17] T. Skalický, V. Třeška, J. Ferda, H. Mirka: Diagnostika nádorů jater. *Onkologie* **2**, 216-218 (2008)
- [18] D. Valík, M. Nekuřová, L. Zdražilová-Dubská, I. Malbohan, T. Zima, O. Topolčan, R. Fuchsová, Š. Svobodová: Doporučení k využití nádorových marker v klinické praxi. *Klinická Biochemie a Metabolismus* **22**, 22-39 (2014)
- [19] I. Machová, A. Brázdová, M. Fusek, J. Zídková: Nádorové marker a jejich využití v klinické praxi. *Chemické Listy* **106**, 16-19 (2012)
- [20] E. P. Diamandis, H. A. Frische, H. Lilja, D. W. Chan, M. K. Schwartz: *Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications*. 1. vyd. 541 s., AACCC Press, Washington (2002) ISBN: 978-1890883719
- [21] S. Sharma: Tumor markers in clinical practise: General principles and guidelines. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* **30**, 1-8 (2009)
- [22] C. M. Sturgeon, E. P. Diamandis: *Laboratory medicine practise guidelines: Use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers*. AACCC Press, Washington (2009)
- [23] K. Kupka, J. Kubinyi, M. Šámal: *Nukleární medicína*. 1. vyd. 185 s., Grada. Praha (2007) ISBN: 978-80-903584-9-2
- [24] J. H. Thrall, H. A. Ziessmann: *Nuclear Medicine: The Requisites*, 4th edition, Mosby Inc., Missouri (2014) ISBN: 978032308299-0
- [25] O. Kraft: *Nukleární medicína pro studenty se spec. Potřebami při studium. Studijní opora k inovativnímu předmětu Nukleární medicína*. Ostrava (2013) ISBN: 978-80-7464-331-6

- [26] Systemic Radiation Therapy, dostupné z WWW: <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/radiation/radiationtherapyprinciples/radiation-therapy-principles-how-is-radiation-given-radiopharmaceuticals> [cit.: 15. 2. 2018]
- [27] A. Gottschalk, P. B. Hoffer, E. J. Potchen, H. J. Berger: Diagnostic nuclear medicine, 2nd edition. William & Wilkins, Baltimore MD (1988) ISBN: 0-683-03670-X
- [28] R. J. Kowalsky, S. W. Falen: Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Pharmacy and Nuclear Medicine, 3rd edition. American Pharmacists Association, Washington DC (2011) ISBN 9781582121185
- [29] B. E. Sobel, E. S. Weiss, M. J. Welch, B. A. Siegel, M. M. Ter-Pogossian: Detection of remote myocardial infarction in patients with positron emission transaxial tomography and intravenous ¹¹C-palmitate. *Circulation* **55**, 853-857 (1977)
- [30] H. R. Schelbert, M. E. Phelps, S. C. Huang, N. S. MacDonald, H. Hansen, C. Selin, D. E. Kuhl: N-13 ammonia as an indicator of myocardial blood flow. *Circulation*; (United States) **63** (1981)
- [31] R. H. Ackerman, J. A. Correia, N. M. Alpert, J. C. Baron, A. Gouliamos, J. C. Grotta, J. M. Taveras: Positron imaging in ischemic stroke disease using compounds labeled with oxygen 15: *Initial results of clinicophysiological correlations. Archives of Neurology* **38**, 537-543 (1981)
- [32] X. F. Li, T. Huang, H. Jiang, X. Wang, B. Shen, X. Wang, Ch. K. Ng, G. C. Postel, A. C. Civelek: Combined injection of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose and 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine PET achieves more complete identification of viable lung cancer cells in mice and patients than individual radiopharmaceutical: A proof-of-concept study. *Translation Oncology* **6**, 755-783 (2013)
- [33] B. E. Pollock, L. D. Lunsford, D. Kondziolka, G. Levine, J. C. Flickinger: Phosphorus-32 intracavitary irradiation of cystic craniopharyngiomas: current technique and long-term results. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **33**, 437-446 (1995)
- [34] P. N. Badenhorst, M. G. Lotter, H. Pieters, P. Wessels, H. F. Kotze: Platelet turnover and kinetics in immune thrombocytopenic purpura: results with

- autologous ^{111}In -labeled platelets and homologous ^{51}Cr -labeled platelets differ. *Blood* **67**, 86-92 (1986)
- [35] T. Maeda, A. Kono, M. Kojima: Tumor scanning with ^{57}Co -bleomycin. *Radioisotopes* **21**, 436-438 (1972)
- [36] M. Koizumi, K. Endo, M. Kunimatsu, H. Sakahara, T. Nakashima, Y. Kawamura, A. Yokoyama: ^{67}Ga -labeled antibodies for immunoscintigraphy and evaluation of tumor targeting of drug-antibody conjugates in mice. *Cancer research* **48**, 1189-1194 (1988)
- [37] S. R. Banerjee, M. G. Pomper: Clinical applications of Gallium-68. *Applied Radiation and Isotopes* **76**, 2-13 (2013)
- [38] R. M. Oliver, J. M. Gray, V. F. Challenor, J. S. Fleming, D. G. Waller: ^{81}mKr equilibrium radionuclide ventriculography for the assessment of right heart function. *European journal of nuclear medicine* **16**, 89-95 (1990)
- [39] S. Dorbala, D. Vangala, U. Sampson, A. Limaye, R. Kwong, M. F. Di Carli: Value of vasodilator left ventricular ejection fraction reserve in evaluating the magnitude of myocardium at risk and the extent of angiographic coronary artery disease: a ^{82}Rb PET/CT study. *Journal of Nuclear Medicine* **48**, 349-358 (2007)
- [40] S. Nilsson, P. Strang, C. Ginman, R. Zimmermann, M. Edgren, B. Nordström, M. Ryberg, K. M. Kälkner, J. E. Westlin: Palliation of bone pain in prostate cancer using chemotherapy and strontium-89. A randomized phase II study. *Journal of Pain and Symptom Management* **29**, 352-357 (2005)
- [41] J. Yu, U. O. Häfeli, M. Sands, Y. Dong: ^{90}Y -oxine-ethiodol, a potential radiopharmaceutical for the treatment of liver cancer. *Applied Radiation and Isotopes* **58**, 567-573 (2003)
- [42] K. S. Campbell, C. T. Dillon, S. V. Smith, M. M. Harding: Radiotracer studies of the antitumor metallocene molybdocene dichloride with biomolecules. *Polyhedron* **26**, 456-459 (2007)
- [43] S. E. Halpern, P. L. Hagan, R. P. Garver, J. A. Koziol, A. W. Chen, J. M. Frincke, T. H. Adams: Stability, characterization, and kinetics of ^{111}In -labeled monoclonal antitumor antibodies in normal animals and nude mouse-human tumor models. *Cancer research* **43**, 5347-5355 (1983)

- [44] F. Araujo, E. A. Lucena, W. O. Sousa, A. L. A. Dantas, B. M. Dantas: Evaluation of internal occupational exposure by ^{123}I in a radiopharmaceutical productivity facility. *Radiation Measurements* **69**, 1-5 (2014)
- [45] B. P. LeMevel, S. A. Wells: A Microassay for the Quantitation of Cytotoxic Antitumor Antibody: Use of ^{125}I -Iododeoxyuridine as a Tumor Cell Labell. *Journal of the National Cancer Institute* **50**, 803-806 (1973)
- [46] T. Ünak, Y. Yildirim, U. Avcibasi, Z. Biber, Y. Duman, P. Ünak: Comparison of the radiopharmaceutical potentials of dithiazone radiolabeled with ^{131}I and with $^{99\text{m}}\text{Tc}$. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **273**, 767-770 (2007)
- [47] P. O. Alderson, N. Rujanaveeh, R. H. Seeker-Walker, R. C. McKnight: The Role of ^{133}Xe Ventilation Studies in the Scintigraphic Detection of Pulmonary Embolism 1. *Radiology* **120**, 633-640 (1976)
- [48] J. R. Zeevaart, N. V. Jarvis, W. K. A. Louw, G. E. Jackson: Metal-ion speciation in blood plasma incorporating the tetraphosphonate, N,N-dimethylenephosphonate-1-hydroxy-4-aminopropylidenediphosphonate (APDDMP), in therapeutic radiopharmaceuticals. *Journal of Inorganic Biochemistry* **83**, 57-65 (2001)
- [49] W. D. Kaplan, T. Takvorian, J. H. Morris, C. L. Rumbaugh, B. T. Connolly, H. L. Atkins: Thallium-201 brain tumor imaging: a comparative study with pathologic correlation. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* **28**, 47-52 (1987)
- [50] M. K. Schultz, M. Hammond, J. T. Cessna, P. Plascjak, B. Norman, L. Szajek, K. Garmestani, B. E. Zimmerman, M. Unterweger: Assessing the ^{210}At impurity in the production of ^{211}At for radiotherapy by ^{210}Po analysis via isotope dilution alpha spectrometry. *Applied Radiation and Isotopes* **64**, 1365-1369 (2006)
- [51] S. Hassfjell, M. W. Brechbiel: The development of the α -particle emitting radionuclides ^{212}Bi and ^{213}Bi , and their decay chain related radionuclides, for therapeutic applications. *Chemical reviews* **101**, 2019-2036 (2001)
- [52] C. Kerr: ^{223}Ra targets skeletal metastases and spares normal tissue. *Oncology* **3**, 453 (2002)
- [53] S. Nilsson, L. Franzén, Ch. Parker, Ch. Tyrrell, R. Blom, J. Tennwall, U. Petersson, D. Johannessen, M. Sokai, K. Pigott, J. Yachin, M. Garkavij, P. Strang, J. Harmenberg, B. Bolstad, O. S. Bruland: Bone-targeted radium-223 in

- symptomatic, hormone-refractory prostate cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled phase II study. *Oncology* **8**, 587-594 (2007)
- [54] <http://www.sukl.cz/leciva/vyr-32-seznam-definic?highlightWords=radiofarmaka> [cit.: 21. 10. 2017]
- [55] K. Kupka, J. Kubinyi, M. Šámala: *Nukleární medicína*. Nakladatelství P3K, Praha, (2007) ISBN: 978-80-903584-9-2.
- [56] P. E. Christian, K. M. Waterstram-Rich: *Nuclear Medicine and PET, Technology and Techniques*, 7th edition. Mosby, St. Louis MO (2012) ISBN: 9780323071925
- [57] J. Prekeges: *Nuclear Medicine Instrumentation*, 2nd edition. Jones & Bartlett, Bellevue College, Washington (2013) ISBN: 9781449652883
- [58] P. Švec, M. Hrubý: Radiofarmaka pro aidagnostiku a terapii neuroendokrinních nádorů. *Chemické Listy* **111**, 3-10 (2017)
- [59] J. Adam, J. Kadeřávek, F. Kužel, J. Vašina, Z. Řehák: Současné trendy ve využívání PET radiofarmak k onkologické diagnostice. *Klinická onkologie* **27**, 129-136 (2014)
- [60] Ch.-H. Yeong, M.-H. Cheng, K-H- Ng: Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. *Jourbal of Zhejiang University – SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* **15**, 845-863 (2014)
- [61] R. Taillerfer: The role pf ^{99m}Tc-sestamibi and other conventional radiopharmaceuticals in breast cancer diagnostic. *Seminars in Nuclear Medicine* **29**, 16-40 (1999)
- [62] A. Elhendy, M. L. Geleijnse, J. R. T. C. Roelandt, R. T. van Domburg, J. H. Cornel, F. J. TenCate, J. Postma-Tjoa, A. E. M. Reijts, G. M. El-Said, P M. Fioretti: Evaluation by quantitative 99m-technetium MIBI SPECT and echocardiography of myocardial perfusion and wall motion abnormalities in patients with dobutamine-induced ST-segment elevation. *The American Journal of Cardiology* **76**, 441-448 (1995)
- [63] M. Kohlíčková, V. Jedináková-Křížová, F. Melichar: Complex compounds of Rhenium in nuclear medicine. *Chemical Papers* **94**, 151-158 (2000)
- [64] Radiation instrument. Dostupné z WWW: <http://revistapesquisa.fapesp.br/en/2014/07/22/radiation-instrument/> [cit.: 15.2.2018]

- [65] R. Weast: *CRC, Handbook of Chemistry and Physics*, 1st edition. Boca Raton, Florida, USA (1984) ISBN: 0-8493-0464-4
- [66] M. Pelecanou, I. C. Pirmettis, M. S. Papadopoulos, C. P. Raptopoulou, A. Terzis, E. Chiotellis, C. I. Stassinopoulou: Structural study of ReO(V) mixed ligand [SNS][Cl] and [SNS][S] complexes. *Inorganica Chimica Acta* **287**, 142-151 (1999)
- [67] Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 11th edition. R.J. Lewis (Ed.). Wiley (2004) ISBN: 9780471701347
- [68] H. Burešová: Studium faktorů ovlivňujících redukci rhenistanu. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha (2012)
- [69] D. E. Reichert, J. S. Lewis, C. J. Anderson: Metal complexes as diagnostic tools. *Coordination Chemistry Reviews* **184**, 3-66 (1999)
- [70] J. R. Dilworth, S. J. Parrott: The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chemical Society Reviews* **27**, 43-55 (1998)
- [71] S. Liu, D. S. Edwards: Biofunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chemistry* **12**, 7-34 (2001)
- [72] K. Libson, L. Helm, C. Cutler, A. Merbach, E. Deutsch: Kinetics and mechanism of ligand substitution on analogous technetium (V) and rhenium (V) complexes. *Journal of Nuclear Medicine* **30**, 31-34 (1990)
- [73] H. Palmedo, H. Bender, Ch. Dierke-Dzierzon, U. M. Carl, J. Risse, D. Krebs, H. J. Biersack: Pain Palliation With Rhenium-186 HEDP in Breast Cancer Patients With Disseminated Bone Metastases. *Clinical Nuclear Medicine* **24**, 643-648 (1999)
- [74] H. Palmedo, S. Guhlke, H. Bender, J. Sartor, G. Schoeneich, J. Risse, F. Grünwald, F. F. Knapp, H. J. Biersack: Dose escalation study with rhenium-188 hydroxyethylidene diphosphonate in prostate cancer patients with osseous metastases. *European Journal of Nuclear Medicine* **27**, 123-130 (2000)
- [75] P. J. Blower, J. Singh, S. E. M. Clarke, M. M. Bisunadan, M. J. Went: Pentavalent rhenium-186 DMSA: A possible tumour therapy agent. *Journal of Nuclear Medicine* **31**, 768-770 (1990)
- [76] G. Schoeneich, H. Palmedo, Ch. Dierke-Dzierzon, S. C. Mutter, H. J. Biersack: Rhenium-186 HEDP: Palliative Radionuclide Therapy of Painful Bone

- Metastases: Preliminary results. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* **31**, 445-448 (1997)
- [77] R. C. Elder, J. Yuan, B. Helmer, D. Pipes, K. Deutsch, E. Deutsch: Rhenium – 1,1-hydroxyethylidenediphosphonate (HEDP) analogues of the radiotherapeutic agent $^{186}\text{ReHEDP}$. *Inorganic Chemistry* **34**, 3055-3063 (1997)
- [78] F. F. Knapp, A. L. Beets, S. Guhlke, P. O. Zamora, H. Bender, H. Palmedo, H. J. Biersack: Availability of rhenium-188 from the alumina-based tungsten-188/rhenium-188 generator for preparation of rhenium-188-labeled radiopharmaceuticals for cancer treatment. *Anticancer Research* **17**, 1783-1795 (1997)
- [79] A. Sachse, N. C. Mösch-Zanetti, G. Lyashenko, J. W. Wielandt, K. Most, J. Magull, F. Dall'Antonia, A. Pal, R. Herbst-Irmer: Rhenium(V) Oxo Complexes with Acetylacetone Derived Schiff Bases. *Structure and Catalytic Epoxidation, Inorganic Chemistry* **46** (17), 7129-7135 (2007)
- [80] M. D. Newsham, E. P. Giannelis, T. J. Pinnavaia, D. G. Nocera: The influence of guest-host interactions on the excited-state properties of dioxorhenium(V) ions in intracrystalline environments of complex-layered oxides. *Journal of the American Chemical Society* **110**, 3885-3891 (1988)
- [81] M. S. Ram, C. S. Johnson, R. I. Blackburn, J. T. Hupp: Synthesis and electrochemistry of 2,2'-bipyridyl complexes of dioxorhenium(V). *Inorganic Chemistry* **29**, 238-244 (1990)
- [82] Busev A. I., Tiptsova V G., Ivanov V. M.: Analytical Chemistry of Rare Elements. Mir Publishers, Moscow (1981)
- [83] B. Machura, A. Świtlicka, M. Wolff, J. Kusz, R. Kruszynski: Mono- and dinuclear oxorhenium(V) complexes of 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. *Polyhedron* **28**, 3999-4009 (2009)
- [84] B. Machura, M. Wolff, A. Świtlicka, J. Palion, R. Kruszynski: Novel oxorhenium complex of 2-(2-pyridyl)-4-methylthiazole-5-carboxylic acid – synthesis, spectroscopic characterization, X-ray structure and DFT calculations. *Journal of Molecular Structure* **994**, 256-262 (2011)
- [85] B. Machura, M. Wolff, A. Świtlicka: Novel oxorhenium complex of 4,5-diazafluoren-9-one - synthesis, spectroscopic characterization, X-ray structure and DFT calculations. *Inorganic Chemistry Communications* **14**, 17-21 (2011)

- [86] B. Machura, M. Wolff, M. Penkala: Synthesis, X-ray studies, spectroscopic characterization and DFT calculations of $[\text{ReO}(\text{hmbzm})_2(\text{py})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{ReO}(\text{hpbzim})_2(\text{py})]\text{Cl}$. *Polyhedron* **44**, 156-164 (2012)
- [87] D. A. Rotsch, K. M. Reining, E. M. Weis, A. B. Taylor, Ch. L. Barnes, S. S. Jurisson: Novel rhenium (III, IV and V) tetradentate N₂O₂ Schiff base mononuclear and dinuclear complexes. *Dalton Transactions* **42**, 11614-11625 (2013)
- [88] B. Machura, M. Wolff, E. Benoist, J. A. Schachner, N. C. Mösch-Zanetti: Oxorhenium(V) complexes of quinolone and isoquinoline carboxylic acids – synthesis, structural characterization and catalytic application in epoxidation reactions. *Dalton Transactions* **42**, 8827-8837 (2013)
- [89] B. Machura, M. Wolff, E. Benoist, J. A. Schachner, N. C. Mösch-Zanetti, K. Takao, Y. Ikeda: Oxorhenium(V) complexes with 1H-benzimidazole-2-carboxylic acid – Synthesis, structural characterization and catalytic application in epoxidation reactions. *Polyhedron* **69**, 205-218 (2014)
- [90] S. Basak, K. K. Rajak: Synthesis, structure, and spectroscopic properties of chiral oxorhenium(V) complexes incorporating polydentate ligands derived from L-amino acids: A density functional theory/time-dependent density functional theory investigation. *Inorganic Chemistry* **47**, 8813-8822 (2008)
- [91] B. Machura, R. Kruszynski: A novel tricarbonyl rhenium complex of 2-benzoylpyridine – synthesis, spectroscopic characterization, X-ray structure and DFT calculations. *Journal of Organometallic Chemistry* **692**, 4161-4167 (2007)
- [92] T. B. Rauchfuss: o-Diphenylphosphinophenol and its coordination compounds. *Inorganic Chemistry* **16**, 2966-2968 (1977)
- [93] T. Jarolim, J. Podlahova: Coordinating behaviour of diphenylphosphineacetic acid. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **38**, 125-129 (1976)
- [94] F. Refosco, F. Tisato, G. Bandoli, E. Deutsch: Synthesis and characterization of neutral technetium (III)-99 and-99m complexes with O, P-bidentate phosphino-carboxylate ligands. Crystal structure of $\text{mer-}[\text{Tc}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{PPh}_2)_3]\cdot 2\text{Me}_2\text{SO}$. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **19**, 2901-2908 (1993)
- [95] C. Bolzati, M. Porchia, G. Bandoli, A. Boschi, E. Malago, L. Uccelli: Oxo.rhenium(V) mixed-ligand complexes with bidentate functionalized

- phosphines and tridentate Schiff base ligands. *Inorganica Chimica Acta* **315**, 205-212 (2001)
- [96] G. Bandoli, A. Dolmella, T. I. A. Gerber, D. Mpinda, J. Perlis, J. G. H. Du Preez: Complexes of oxorhenium(V) with aromatic 2-amino-alcohols. *Journal of Coordination Chemistry* **55**, 823-833 (2002)
- [97] B. Machura, M. Wolff, A. Switlicka, I. Gryca, I. Nawrot, R. Kruszynski: Rhenium(V) oxocomplexes incorporating 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4,6-di-tert-pentylphenolate ligand. X-ray studie, spectroscopic characterization and DFT calculations. *Structural Chemistry* **22**, 765-774 (2011)
- [98] B. Machura, J. O. Dziegiewski, S. Michalik, R. Kruszynski, T. J. Bartczak, J. Kusz: Synthesis, spectroscopic investigation and X-ray stracture of mononuclear and binuclear oxo complexes of rhenium (V) wit pyrazole ligands. *Transition Metal Chemistry* **28**, 939-947 (2003)
- [99] B. Machura, J. O. Dziegielewski, R. Kruszynski, T. J. Bartczak. J, Kusz: Linear and bent oxo-bridged dinuclear rhenium(V) complexes with terminal and bridging pyrazole ligands. *Inorganica Chimica Acta* **357**, 1011-1022 (2004)
- [100] T. I. Kückmann, U. Abram: Oxorhenium(V)- and tricarbonylrhenium(I) complexes with substituted pyrazoles as products of the degradation of hydrotrispyrazolylborates. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **630**, 783-785 (2004)
- [101] T. I. A. Gerber, D. Luzipo, P. Mayer: The reaction of the cis-dioxorhenium(V) core with N,O-donor ligands: mono and bidentate coordination of 3-methyl-2-aminophenol. *Inorganica Chimica Acta* **357**, 429-435 (2004)
- [102] B. Machura, R. Kruszynski, J. Kusz: Novel oxorhenium complexes with 2-(2'-hydroxyphenyl)-2-benzothiazolinato ligand: X-ray studies, spectroscopic characterization and DFT calculations. *Polyhedron* **27**, 1679-1689 (2008)
- [103] B. Machura, A. Swietlicka, M. Wolff, R. Kruszynski: Novel rhenium oxocomplexes of imidazole-3-carboxylic acid – Synthesis, X-ray studies, spectroscopic characterization and DFT calculations. *Polyhedron* **29**, 2061-2069 (2010)
- [104] C. J. Anderso: Radiometal-labeled agents (non-technetium) for diagnostic imaging. *Chemical Reviews* **99**, 2219–2234 (1999)

- [105] H. W. Wanzlick, H. J. Schönherr: Direct synthesis of a mercury salt-carbene complex. *Angewandte Chemie International Edition in English* **7**, 141-142 (1968)
- [106] X. Hu, I. Castro-Rodriguez, K. Olsen, K. Meyer: Group 11 Metal Complexes of N-Heterocyclic Carbene Ligands: Nature of the Metal Carbene Bond. *Organometallics* **23**, 755-764 (2004)
- [107] D. Bourissou, O. Guerret, F. B. Gabbai, G. Bertrand: Stable carbenes. *Chemical Reviews* **100**, 39-92 (2000)
- [108] T. I. Küchmann, U. Abram: Rhenium(V) oxo complexes with N-heterocyclic carbenes. *Inorganic Chemistry* **43**, 7068-7074 (2004)
- [109] P. J. Blower, J. R. Dilworth, J. P. Hutchinson, T. Nicholson, J. Zubieta: Rhenium complexes with di- and tri-thiolate ligands. The synthesis and X-ray crystal structures of square pyramidal $[\text{PPh}_4][\text{ReO}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S})_2]$ and $[\text{NMe}_4][\text{ReS}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S})_2]$ and trigonal prismatic $[\text{PPh}_4][\text{Re}\{(\text{SCH}_2)_3\text{CCH}_3\}_2]$. *Journal of the Chemical Society* **7**, 1339-1345 (1986)
- [110] M. C. Feiters, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte: From simple to supramolecular cytochrome P450 mimics. *Chemical Society Reviews* **29**, 375-384 (2000)
- [111] M. M. T. Khan, M. R. H. Siddiqui, A. Hussain, M. A. Moiz: Oxygen atom transfer in the oxidation of triphenylphosphine by molecular oxygen catalyzed by a ruthenium(III)-EDTA-triphenylphosphine complex. *Inorganic Chemistry* **25** (16), 2765-2771 (1986)
- [112] S. R. Lane, N. Sisay, B. Carney, S. Danno, S. Williams, H. P. Engelbrecht, Ch. L. Barnes, S. Si. Jurisso: Re(V) and Re(III) complexes with sal_2phen and triphenylphosphine: rearrangement, oxidation and reduction. *Dalton Transactions* **40**, 269-276 (2011)
- [113] S. Seifert, T. Heinrich, Ch. Jentschel, Ch. Smuda, R. Bergmann, H. J. Pietzsch: Preparation and biological characterization of isomeric $^{188}\text{Re(V)}$ oxocomplexes with tetradentate S4 ligands derivated form meso-dimercaptosuccinic acid for labeling of biomoleculer. *Bioconjugate Chemistry* **17**, 1601-1606 (2006)
- [114] B. Machura, R. Kruszynski, M. Jaworska: Reactions of $[\text{ReX}_5(\text{NO})]_2^-$ with triphenylstibine. Spectroscopic investigations of $[\text{ReX}_2(\text{NO})(\text{SbPh}_3)_3]$, X-ray structures of $[\text{ReCl}_2(\text{NO})(\text{SbPh}_3)_3]$ and $[\text{ReBr}_2\text{Cl}(\text{SbPh}_3)_3]$ and DFT calculations for $[\text{ReCl}_2(\text{NO})(\text{SbPh}_3)_3]$. *Polyhedron* **24**, 419-426 (2004)

- [115] C. A. Tolman: Steric effects of phosphorus ligands in organometallic chemistry and homogeneous catalysis. *Chemical Reviews* **77**, 313-348 (1977)
- [116] J. C. Vites, M. M. Lynam: Rhenium 1992. *Coordination Chemistry Reviews* **142**, 1-20 (1995)
- [117] M. M. Lynam, J. C. Vites: Rhenium 1994. *Coordination Chemistry Reviews* **162**, 319-344 (1997)
- [118] J. C. Vites, M. M. Lynam: Rhenium 1996. *Coordination Chemistry Reviews* **172**, 357-388 (1998)
- [119] D. Y. Chi, J. P. O'Neil, C. J. Anderson, M. J. Welch, J. A. Katyenellenbogen: Homodimeric and heterodimeric Bis(amino thiol) oxometal complexes with Rhenium (V) and Technetium(V). Control of heterodimeric complex formation and an approach to metal complexes that mimic steroid hormones. *Journal of Medicinal Chemistry* **37**, 928-937 (1994)
- [120] S. Top, H. El Hafa, A. Vessieres, J. Quivy, J. Vaissermann, D. W. Hughes, M. J. McGlinchey, J. P. Mormon, E. Thoreau, G. Jaouen: Rhenium carbonyl complexes of β -extradiol derivatives with high affinity for the extradiol receptors: An approach to selective organometallic radiopharmaceuticals. *Journal of American Chemical Society* **117**, 8372-8380 (1995)
- [121] M. F. Giblin, N. Wang, T. J. Hoffman, S. S. Jurisson, T. P. Quinn: Design and characterization of α -melanotropin peptide analogs cyclized through rhenium and technetium metal coordination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12814-12818 (1998)
- [122] V. Polyakov, V. Sharma, J. L. Dalheimer, Ch. M. Pica, G. D. Luker, D. Piwnicka-Worms: Novel Tat-peptides chelates for direct transduction of technetium-99m and rhenium into human cells for imaging and radiotherapy. *Biocunjugate Chemistry* **11**, 762-771 (2000)
- [123] K. Severin, R. Bergs, W. Beck: Bioorganometallic chemistry – transition metal complexes with α -amino acids and peptides. *Angewandte Chemie* **37**, 1634-1654 (1998)

- [124] T. W. Spradau, J. A. Ketzenellenbogen: Protein and peptide labeling with (cyclopentadienyl)tricarbonyl rhenium and technetium. *Bioconjugate Chemistry* **9**, 765-772 (1998)
- [125] R. Colton, J. Dalziel, W. P. Griffith, G. Wilkinson: Polarographic study of manganese, technetium, and rhenium. *Journal of the Chemical Society*, 71-78 (1960)
- [126] A. Narayanan, F. Umland: Polarographic reduction of perrhenate in the presence of ascorbic acid. *Analytica Chimica Acta* **54**, 368-372 (1971)
- [127] M. Gross, P. Lemoine, J. Brener: Etude de la reduction polarographique de l'ion perrhenate en milieu KCL 1 M. *Electrochimica Acta* **15**, 251-258 (1970) (English version)
- [128] M. Malát: *Absorpční anorganická fotometrie*. Academia, Praha (1973)
- [129] E. J. Mahaffey: A spectrophotometric method for the determination of rhenium in geologic materials. *Journal of Geochemical Exploration* **3**, 53-59 (1974)
- [130] W. H. Chen, Ch. W. Liao, T. Y. Luo, L. Ch. Men, Y. Ch. Hsieh: High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for *Ex vivo* metabolic studies of a rhenium-labeled radiopharmaceutical for liver cancer. *European Journal of Mass Spectrometry* **20**, 375-382 (2014)
- [131] R. Tavaré, J. Williams, K. Howard, P. J. Blower, G. E. D. Mullen: $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ labelling of a novel cysteine/hexahistidine tag: Insights into binding mode by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Inorganic Biochemistry* **114**, 24-27 (2012)
- [132] K. Tagami, S. Uchida: Separation of rhenium by an extraction chromatographic resin for determination by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **405**, 227-229 (2000)
- [133] H. Takeda, Y. Yamamoto, Ch. Nishiura, O. Ishitani: Analysis and isolation of cationic rhenium(I) and ruthenium(II) multinuclear complexes using size-exclusion chromatography. *Analytical Sciences* **22**, 545-549 (2006)
- [134] S. V. Paleskii, I. V. Nikolaeva, O. A. Koz'menko, G. N. Anoshin: Determination of platinum-group elements and rhenium in standards geological samples by isotope dilution with mass spectrometric ending. *Journal of analytical chemistry* **64**, 272-276 (2009)

- [135] H. Hori, K. Koike, M. Ishizuka, J. R. Westwell, K. Takeuchi, T. Ibusuki, O. Ishitani: High-performance liquid chromatographic characterization of rhenium bipyridine complexes with phosphorus ligands. *Chromatographia* **43**, 491-495 (1996)
- [136] Ch. H. Li, T. S. A. Hor, H. K. Lee: High-performance liquid chromatography of the coordination isomers of triphenylphosphine-substituted homo- and hetero-bimetallic carbonyl complexes of manganese and rhenium. *Journal of Chromatography A* **740**, 231-236 (1996)
- [137] M. Koudelková, V. Jedináková-Křížová: Capillary electrophoretic and thin-layer chromatographic characterization of rhenium complexation with 1-hydroxyethylidenediphosphonic acid. *Journal of Chromatography A* **990**, 317-323 (2003)
- [138] M. Kohlíčková-Koudelková, V. Jedináková-Křížová, Z. Deyl: Study of perrhenate by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 245-248 (2002)
- [139] M. Kohlíčková, V. jedináková-Křížová, R. Konířová: Chromatographic study of ¹⁸⁶Re complexes with various ligands. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **242**, 545-549 (1999)
- [140] M. Kohlíčková-Koudelková, R. Konířová, V. Jedináková-Křížová: Chromatographic and electromigration analysis of rhenium compounds used in radiopharmacy. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry* **258**, 627-633 (2003)
- [141] J. J. Thompson: On the masses of the ions in gases at low pressures. *Philosophical Magazine* **5**, 547-567 (1899)
- [142] J. J. Thompson. Rays of positive electricity and their application to chemical analysis. Longmans, Green and Co. Ltd., Londýn (1913)
- [143] F. W. Aston: Mass Spectrograph. *Philosophical Magazine* **38**, 209-220 (1919)
- [144] F. W. Aston: Mass spectra and the atomic weights of the elements. *Universita Science Progress* **15**, 212-222 (1920)
- [145] F. W. Aston: The mass-spectra of chemical elements. *Philosophical Magazine* **39**, 611-625 (1920)
- [146] F. W. Aston: Mass spectra of chemical elements. *Philosophical Magazine* **42**, 140-144 (1921)

- [147] A. J. Dempster: Positive Ray Analysis of Magnesium. *Science. New Series* **52**, 559-565 (1920)
- [148] A. J. Dempster: Positive Ray Analysis of Magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **7**, 45-47 (1921)
- [149] F. W. Aston, G. P. Thomson: The constitution of lithium. *Nature* **106**, 827-828 (1921)
- [150] A. J. Dempster: Positive Ray Analysis of Lithium. *Science, New Series* **53**, 363-364 (1921)
- [151] A. J. Dempster: Positive ray analysis of lithium and magnesium. *Physical Review* **18**, 415-22 (1921)
- [152] F. W. Aston: Mass spectra of the alkali metals. *Philosophical Magazine* **42**, 436-442 (1921)
- [153] F. W. Aston: The constitution of nickel. *Nature* **107**, 520-523 (1921)
- [154] G. P. Thomson: Application of anode rays to the investigation of isotopes. *Philosophical Magazine* (1798-1977) **42**, 857-67 (1921):
- [155] G. P. Thomson: Anode rays of beryllium. *Nature* **107**, 395-398 (1921)
- [156] A. J. Dempster: Positive Ray Analysis of Zinc. *Science. New Series* **54**, 516-520 (1921)
- [157] A. J. Dempster: Positive-Ray Analysis of Potassium, Calcium and Zinc. *Physical Review* **20**, 631-638 (1922)
- [158] F. W. Aston: The mass spectrum of iron. *Nature* **110**, 312-3 (1922)
- [159] F. W. Aston: Isotopes of selenium and some other elements. *Nature* **110**, 664-666 (1922)
- [160] F. W. Aston: Isotopes of antimony. *Nature* **110**, 73-75 (1922)
- [161] F. W. Aston: The mass spectrum of copper. *Nature* **112**, 162-165 (1923)
- [162] F. W. Aston: The isotopes of germanium. *Nature* **111**, 771-775 (1923)
- [163] F. W. Aston: Mass-spectra of chemical elements. V. Accelerated anode rays. *Philosophical Magazine* **47**, 385-400 (1924)
- [164] W. Bleakney: A new method of positive-ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor. *Physical Review* **34**, 157-160 (1929)
- [165] A. J. Dempster: Isotopic constitution of uranium. *Nature* **136**, 180-185 (1935)

- [166] R. S. Gohlke: Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography. *Analytical Chemistry* **31**, 535-541 (1959):
- [167] R. S. Gohlke, F. W. McLafferty: Early gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of American Society Mass Spectrometry* **4**, 367-371 (1993)
- [168] W. Paul, H. Steinwedel: Ein neues massenspektrometer ohne magnetfeld. *Zeitschrift Naturforschung Teil A* **8**, 448-458 (1953)
- [169] C. Djerassi, J. Karliner, R. T. Aplin: Mass spectrometry in structural and stereochemical problems LXXVIII. Steroidal Δ^4 - 3, 6-diketones. *Steroids* **6**, 1-8 (1965)
- [170] M. S. B. Munson, F. H. Field: Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction. *Journal of the American Chemical Society* **88**, 2621-2630 (1966)
- [171] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice: Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics* **49**, 2240-2249 (1968)
- [172] E. C. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, K. D. Haegele, M. G. Horning, R. N. Stillwell: Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream. *Journal of chromatographic science* **12**, 725-729 (1974)
- [173] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler: Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry. *Nature* **293**, 270-275 (1981)
- [174] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo: Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2**, 151-153 (1988)
- [175] M. Karas, F. Hillenkamp: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry* **60**, 2299-2301 (1988)
- [176] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71 (1989)
- [177] M. B. Comisarow, A. G. Marshall: Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical physics letters* **25**, 282-283 (1974)
- [178] A. Makarov: Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry* **72**, 1156-1162 (2000)

- [179] Z. Herman: Počátky hmotnostní spektrometrie u nás: Hmotnostní spektrometrie v Ústavu fyzikální chemie akademii věd (část 1). *Chemické Listy* **104**, 955-990 (2010)
- [180] V. Čermák, V. Hanuš, M. Pacák: Hmotový spektrometr Ústavu fyzikální chemie ČSAV. *Slaboproudý Obzor* **20**, 603-608 (1959)
- [181] G. Münzenberg: Development of mass spectrometry from Thomson and Aston to present. *International Journal of Mass Spectrometry* **349-350**, 9-18 (2013)
- [182] G. Squires: Francis Aston and the mass spectrograph. *Journal of Chemical Society, Dalton Transactions* **23**, 3893-3899 (1998)
- [183] K. S. Sharma: Mass spectrometry – The early years. *International Journal of Mass Spectrometry* **349-350**, 3-8 (2013)
- [184] H. Wollnik: History of mass spectrometry in time-of-flight mass analyzers. *International Journal of Mass Spectrometry* **349-350**, 38-46 (2013)
- [185] J. Griffiths: A brief history of mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **80**, 5678-5683 (2008)
- [186] M. Santimaria, T. Maina, U. Mazzi, M. Nicoliny: Preparation and characterization of a new rhenium (V) complex containing the 3-diphenylphosphinopropionylglycyl-L-(S-benzyl)cysteinyl methyl ester ligand, *Inorganica Chimica Acta* **240**, 291 – 297 (1995)
- [187] W. Henderson, B. K. Nicholson, J. McCaffrey: Applications of electrospray mass spectrometry in organometallic chemistry. *Polyhedron* **17**, 4291-4313 (1998).
- [188] D.A. Plattner: Electrospray mass spectrometry beyond analytical chemistry: studies of organometallic catalysis in the gas phase. *International Journal of Mass Spectrometry* **207**, 125–144 (2001)
- [189] Z. Miao, H. Chen: Direct Analysis of Liquid Samples by Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (DESI-MS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **20**, 10 – 19 (2009)
- [190] M.K. Mandal, K. Yoshimura, L. Ch. Chen, Z. Yu, T. Nakazawa, R. Katoh, H. Fuji: Detection of protein from detergent solutions by probe electrospray ionization mass spectrometry (PESI-MS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **46**, 967 – 975 (2011)
- [191] J. Laakia, A. Adamov, M. Jussila, Ch.S. Pedersen, A.A. Sysoev, T. Kotiaho: Separation of Different Ion Structures in Atmospheric Pressure Photoionization-

- Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry (APPI-IMS-MS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **21**, 1565 - 1572 (2010)
- [192] A. P. Bruins: Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure. *Mass Spectrometry Reviews* **10**, 53–77 (1991)
- [193] V. Zaikin, J. Halket: Review: Derivatization in mass spectrometry. Soft ionization mass spectrometry of small molecules. *European Journal of Mass Spectrometry* **12**, 79-115 (2006)
- [194] M. Holčapek, M. Lída, P. Jandera, N. Kabátová: Quantitation of triacylglycerols in plant oils using HPLC with APCI-MS, evaporative light-scattering, and UV detection. *Journal of separation science* **28**, 1315-1333 (2005)
- [195] J. M. Bonmatin, I. Moineau, R. Charvet, C. Fleche, M. E. Colin, E. R. Bengsch: A LC/APCI-MS/MS Method for Analysis of Imidacloprid in Soils, in Plants, and in Pollens. *Analytical Chemistry* **75**, 2027-2033 (2003)
- [196] M. Karas, F. Hillenkamp: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry* **60**, 2299-2301 (1988)
- [197] F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical chemistry* **63**, 1193A-1203A (1991)
- [198] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida: Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2**, 151-153 (1988)
- [199] G. Montaudo , D. Garozzo , M. S. Montaudo , C. Puglisi , F. Samperi: Molecular and structural characterization of polydisperse polymers and copolymers by combining MALDI-TOF mass spectrometry with GPC fractionation. *Macromolecules* **28**, 7983-7989 (1995)
- [200] D. Noble: MALDI-TOFMS pulses ahead. *Analytical Chemistry* **67**, 497A-501A (1995)
- [201] M. J. Stump, R. C. Fleming, W. H. Gong, A. J. Jaber, J. J. Jones, Ch. W. Surber, Ch. L. Wilkins: Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews* **37**, 275-303 (2002)
- [202] B. W. Wilson, C. E. Costello, S. A. Carr, K. Biermann, Ch. O. A. Davison: Field desorption mass spectrometry of complex anions containing rhenium and technetium. *Analytical Letters* **12**, 303-311 (1979)

- [203] F. Tisato, C. Bolzati, M. Porchia, F. Refosco: Contribution of electrospray mass spectrometry for the characterization, design, and development of nitrido technetium and rhenium heterocomplexes as potential radiopharmaceuticals. *Mass Spectrometry Reviews* **23**, 309-332 (2004)
- [204] C. Dablemont, A. Proust, R. Thouvenot, C. Afonso, F. Fournier, J-C. Tabet: Functionalization of polyoxometalates: From Linqvist to Keggin derivatives. 1. Synthesis, solution studies, and spectroscopic ESI mass spectrometry characterization of the rhenium phenylimido tungstophosphate $[PW_{11}O_{39}(ReNC_6H_5)]^+$. *Inorganic Chemistry* **43**, 3514-3520 (2004)
- [205] G. Petroselli, M. K. Mandal, L. Ch. Chen, G. T. Ruiz, E. Wolcan, K. Hiraoka, H. Nonami, R. Erra-Balsells: Mass spectrometry of rhenium complexes; a comparative study by using LDI-MS, MALDI-MA, PESI-MS and ESI-MS. *Mass Spectrometry* **47**, 313-321 (2012)
- [206] H. Hori, O. Ishitani, K. Koike, K. Takeuchi, T. Ibusuki: Electrospray mass spectrometric detection of unstable rhenium complexes as reaction intermediates photochemical CO₂-fixation. *Analytical Sciences* **12**, 587-590 (1996)
- [207] G. Gasser, A. Pinto, S. Neumann, A. M. Sosniak, M. Seitz, K. Merz, R. Heumann, N. Metzler-Nolte: Synthesis, characterization and biomaging of a fluorescent rhenium-containing PNA biocunjugate. *Dalton Transitions* **41**, 2304-2313 (2012)
- [208] L. V. Borisova, A. S. Borodkov, A. A. Grechnikov, E. A. Ugolkova, V. V. Minin: Composition and structure of rhenium(VI) complexes as found by EPR and laser mass spectrometry. *Russian Journal of Inorganic Chemistry* **58**, 940-944 (2003)
- [209] C. Crestini, M. Ch. Caponi, D. S. Argyropoulos, R. Saladino: Immobilized methyltrioxo rhenium (MTO)/H₂O₂ systems for the oxidation of lignin and lignin model compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **14**, 5292-5302 (2006)
- [210] K. Shinotsuka, K. Suzuki: Simultaneous determination of platinum group elements and rhenium in rock samples using isotope dilution inductively coupled plasme mass spectrometry after cation Exchange separation followed by solvent extraction. *Analytica Chimica Acta* **603**, 129-139 (2007)
- [211] M. Holčápek, P. Jandera: Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. *Chemické listy* **92**, 278-286 (1998)
- [212] Ch. W. Klampfl: Recent advances in the application of capillary electrophoresis with mass spectrometric detection. *Electrophoresis* **27**, 3-34 (2006)

- [213] J. A. Olivares, J. A. Nguyen, C. R. Yonker, R. D. Smith: On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* **59**, 1230-1232 (1987)
- [214] K. Pasha, S. Muzeeb, S. J. S. Basha, D. Shashikumar, R. Mullangi, N. R. Srinivas: Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors – atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations and *in vitro* metabolism studies. *Biomedical Chromatography* **20**, 282-293 (2005)
- [215] D. A. Armbruster, M. D. Tillman, L. M. Hubbs: Limit of detection (LOD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clinical Chemistry* **40**, 1233-1238 (1994)
- [216] D.-L. Lin, S.-M. Wang, Ch-H. Wu, B.-G. Chen, R. H. Liu: Chemical derivatization for the analysis of drugs by GC MS – A conceptual review. *Journal of Food and Drug Analysis* **16**, 1-10 (2008)
- [217] M. S. Lee, E. H. Kerns: LC/MS application in drug development. *Mass Spectrometry Reviews* **18**, 187-279 (1999)
- [218] J. Berman, K. Halm, K. Adkinson, J. Shaffer: Simultaneous pharmacokinetic screening of a mixture of compounds in the dog using API LC/MS/MS analysis for increased throughput. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 827-829 (1997)
- [219] F. Beaudry, J. C. Yves Le Blanc, M. Coutu, I. Ramier, J.-P. Moreau, N. K. Brown: Metabolite profiling study of propranolol in rat using LC/MS/MS analysis. *Biomedical Chromatography* **13**, 363-369 (1999)
- [220] Q. Yanga, L. M. Benson, K. L. Johnson, S. Naylor: Analysis of lipophilic peptides and therapeutic drugs: on-line-nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **38**, 103-121 (1999)
- [221] H. L. Cheng, M.-Ch. Tseng, P.-L. Tsai, G. R. Her: Analysis of synthetic chemical drugs in adulterated Chinese medicines by capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**, 1473-1480 (2001)

- [222] Ch. W. Huck, G. Stecher, H. Scherz, G. Bonn: Analysis of drugs, natural and bioactive compounds containing phenolic groups by capillary electrophoresis coupled to mass spektrometry. *Electrophoresis* **26**, 7-8 (2005)
- [223] M. Douša, R. Hosmanová: Rapid determination of amoxicillin in premixes by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **37**, 373-377 (2005)
- [224] M. Douša, Z. Sikač, M. Halama, K. Lemr: HPLC determination of lincomycin in premixes and feedstuffs with solid-phase extraction on HLB OASIS and LC-MS/MS confirmation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**, 981-986 (2006)
- [225] M. Douša, P. Gibala, K. Lemr: liquid chromatographic separation of pregabalin and its possible impurities with fluorescence detection after postcolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **53**, 717-722 (2010)
- [226] M. Douša, P. Gibala: Rapid determination of ambrisentan enantiomers by enantioselective liquid chromatography using cellulose based chiral stationary phase mode. *Journal of Separation Science* **35**, 798-803 (2012)
- [227] T. I. A. Gerber, D. G. Luzipo, P. Mayer: Formation of a noxo-free rhenium(V) complex with 2-aminophenol. *Journal of Coordination Chemistry* **57**, 1393-1398 (2004)
- [228] T. I. A. Gerber, P. Mayer: Versatility of bidentate aniline derivatives as ligands for rhenium(V) and technetium(V). *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences* **6**, 165-168 (2005)
- [229] T. I. A. Gerber, D. G. Luzipo, P. Mayer: Monodentate imido and bidentate aminophenolate coordination of 2-aminophenol in rhenium(V) complexes. *Journal of Coordination Chemistry* **59**, 1055-1062 (2006)
- [230] MolView program. Dostupné z <http://molview.org/> (cit. 5.1.2018)
- [231] K. X. Wan, I. Vidavski, M. L. Gross: Comparing similar spektra: From similarity index to spektra contrast angle. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **13**, 85-88 (2002)
- [232] R. Jankowsky, S. Kirsch, T. Reich, H. Spies, B. Johannsen: Solution structures of rhenium (V) oxo peptide complexes of glycylglycylcysteine and cysteineglycine as studied by capillary electrophoresis and X-ray absorption spectroscopy. *Journal of Inorganic Biochemistry* **70**, 99-106 (1998)

- [233] H. Kim, T. D. Chung, H. Kim: Voltametric determination of the pak of various acids in polar aprotic solvents using 1,4-benzoquine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **498**, 209-215 (2001)

9 PŘÍLOHY

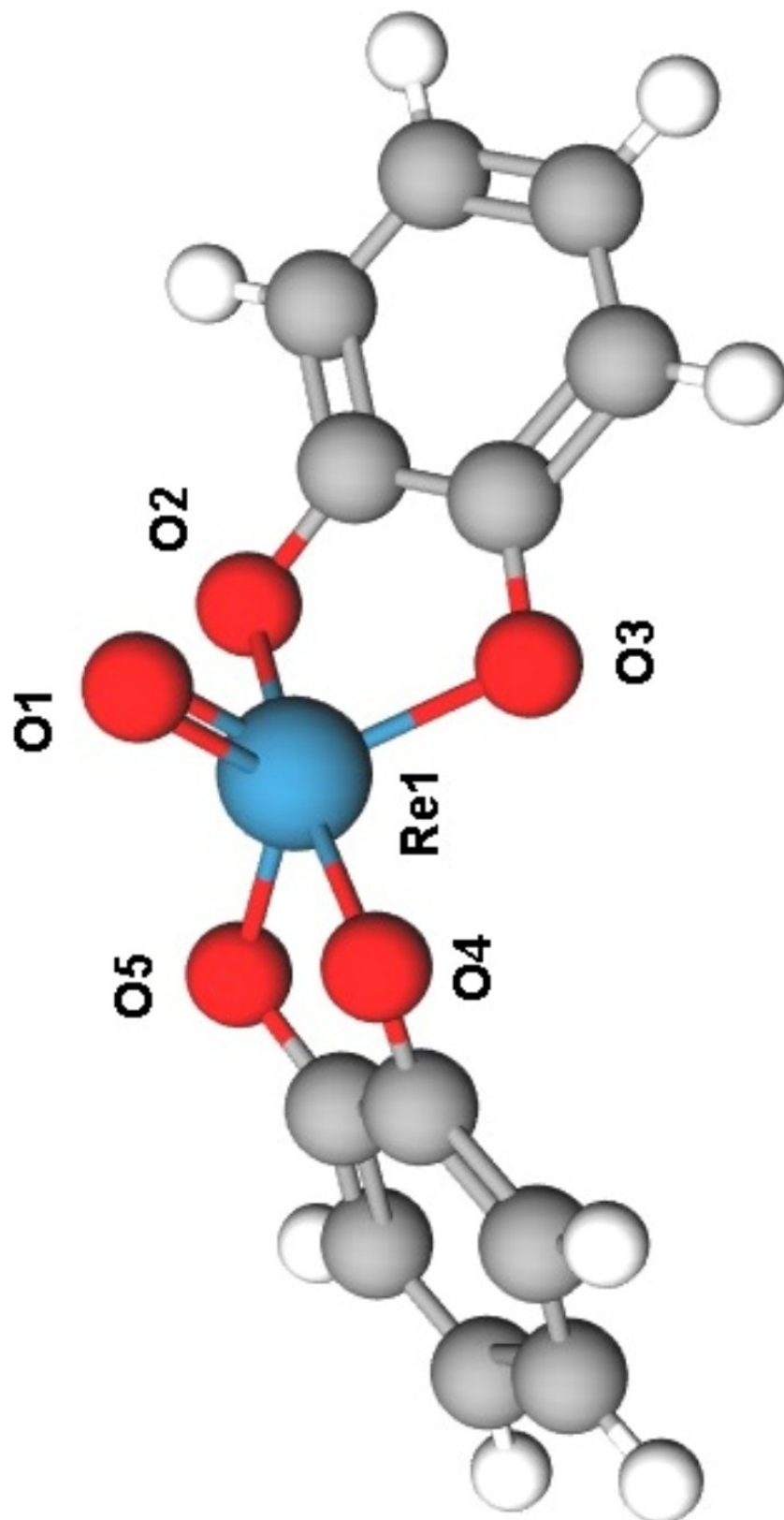
9.1 Publikace I

Seznam příloh:

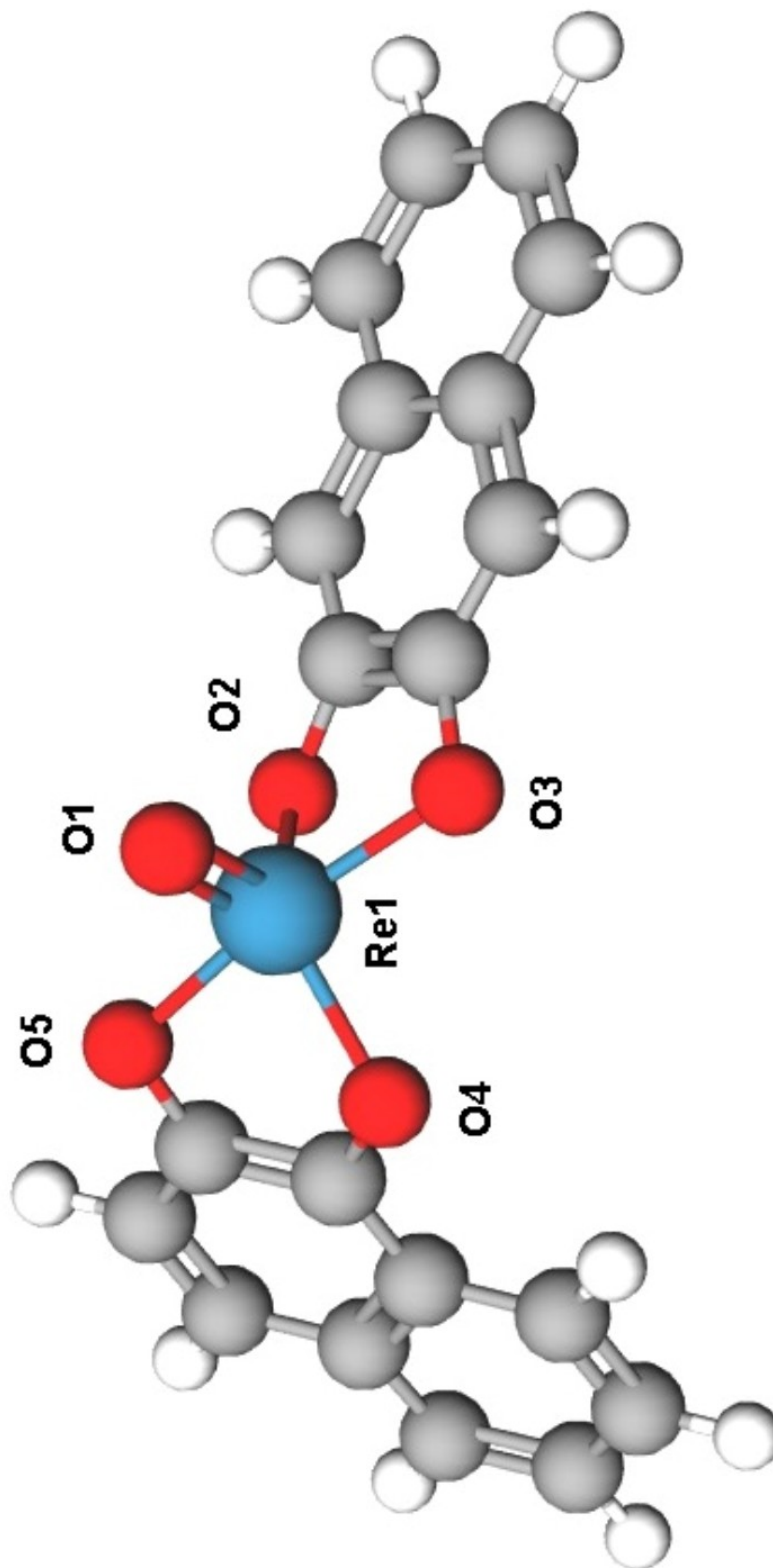
- 1) 3D model komplexu bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium vytvořený programem MolView
- 2) 3D model komplexu bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorhenium vytvořený programem MolView
- 3) 3D model komplexu bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorhenium vytvořený programem MolView
- 4) Infračervené spektrum bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (KBr, ACN)
- 5) Infračervené spektrum bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (KBr, ACN)
- 6) Infračervené spektrum bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorheniového komplexu (KBr, ACN)
- 7) Vodíkové spektrum bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)
- 8) Uhlíkové spektrum bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)
- 9) Vodíkové spektrum bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)
- 10) Uhlíkové spektrum bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)
- 11) Vodíkové spektrum bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)
- 12) Uhlíkové spektrum bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)
- 13) Naměřená spektra v negativním módu pro komplex s 1,2,3-trihydroxybenzenem pro ionizační techniky ESI-MS (a); APPI-MS (b), LDI-MS (c) a ESI-MS/MS (d) s dominantními molekulovými píky.

- 14) Naměřená spektra v negativním módu pro komplex s 2,3-dihydroxynaftalenem pro ionizační techniky ESI-MS (a); APPI-MS (b), LDI-MS (c) a ESI-MS/MS (d) s dominantními molekulovými píkami.
- 15) Reakční schéma bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorheniového komplexu
- 16) Reakční schéma bis(2,3-dihydroxynaftalen) oxorheniového komplexu

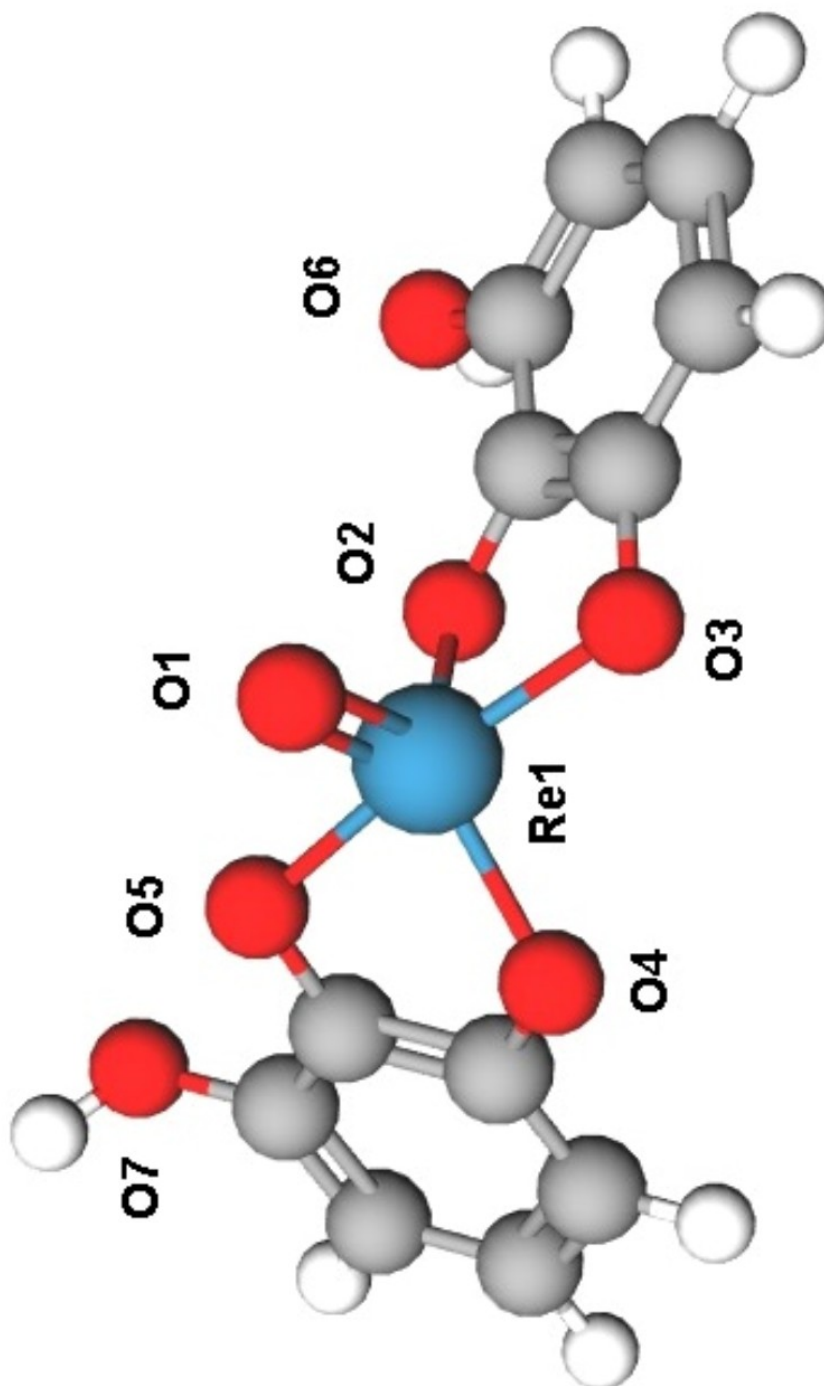
1) 3D model komplexu bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium vytvořený programem MolView



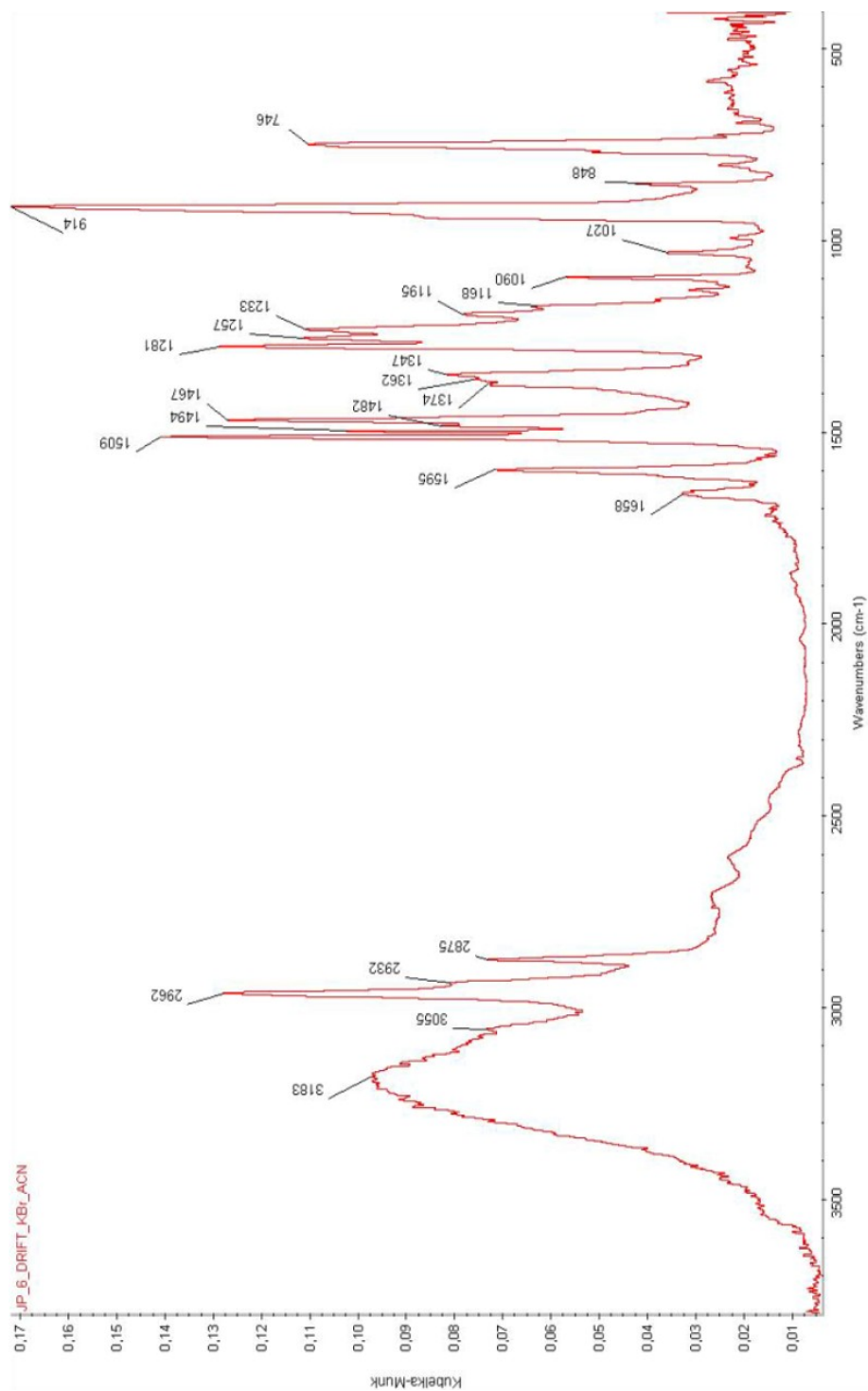
2) 3D model komplexu bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorhenium vytvořený programem MolView



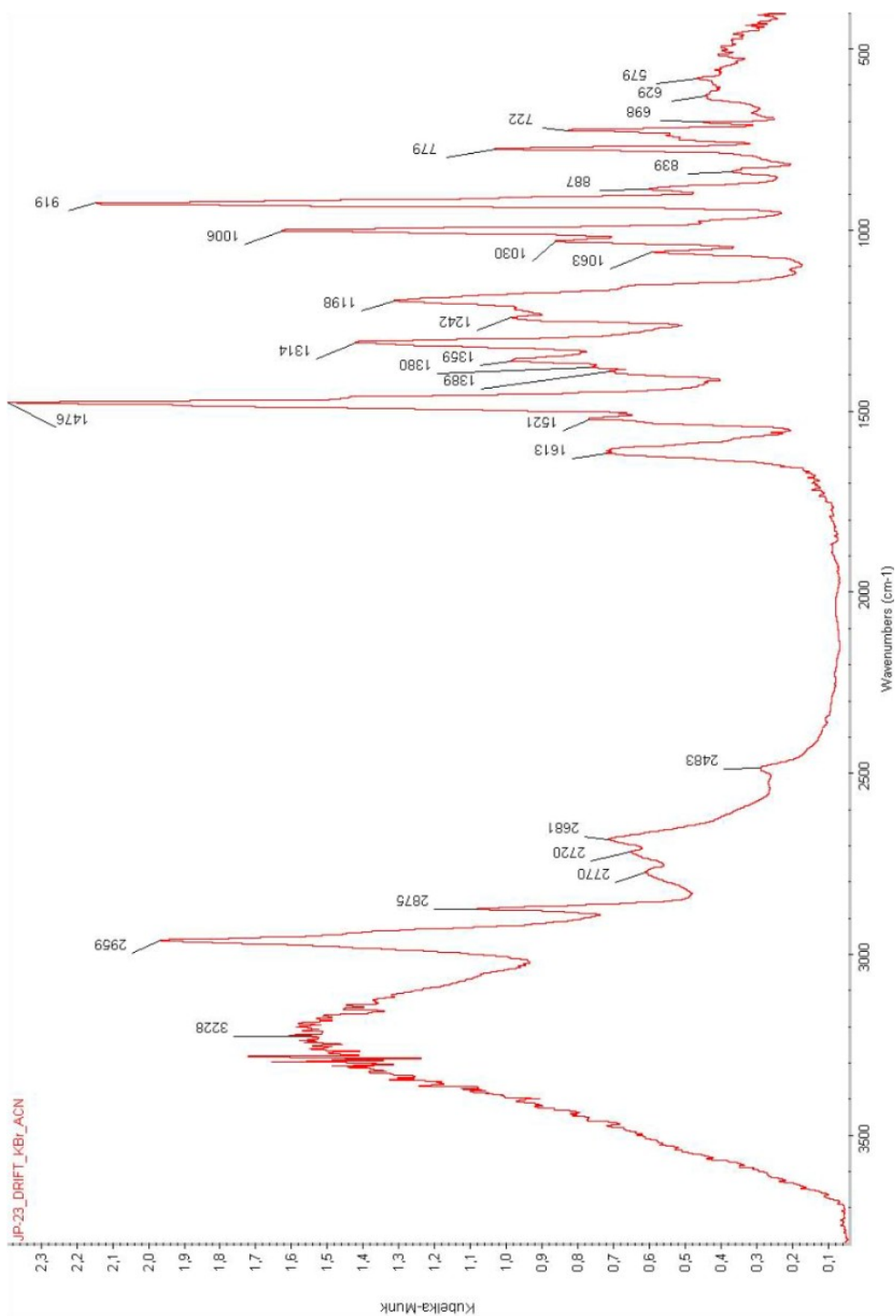
3) 3D model komplexu bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorhenium vytvořený programem MolView



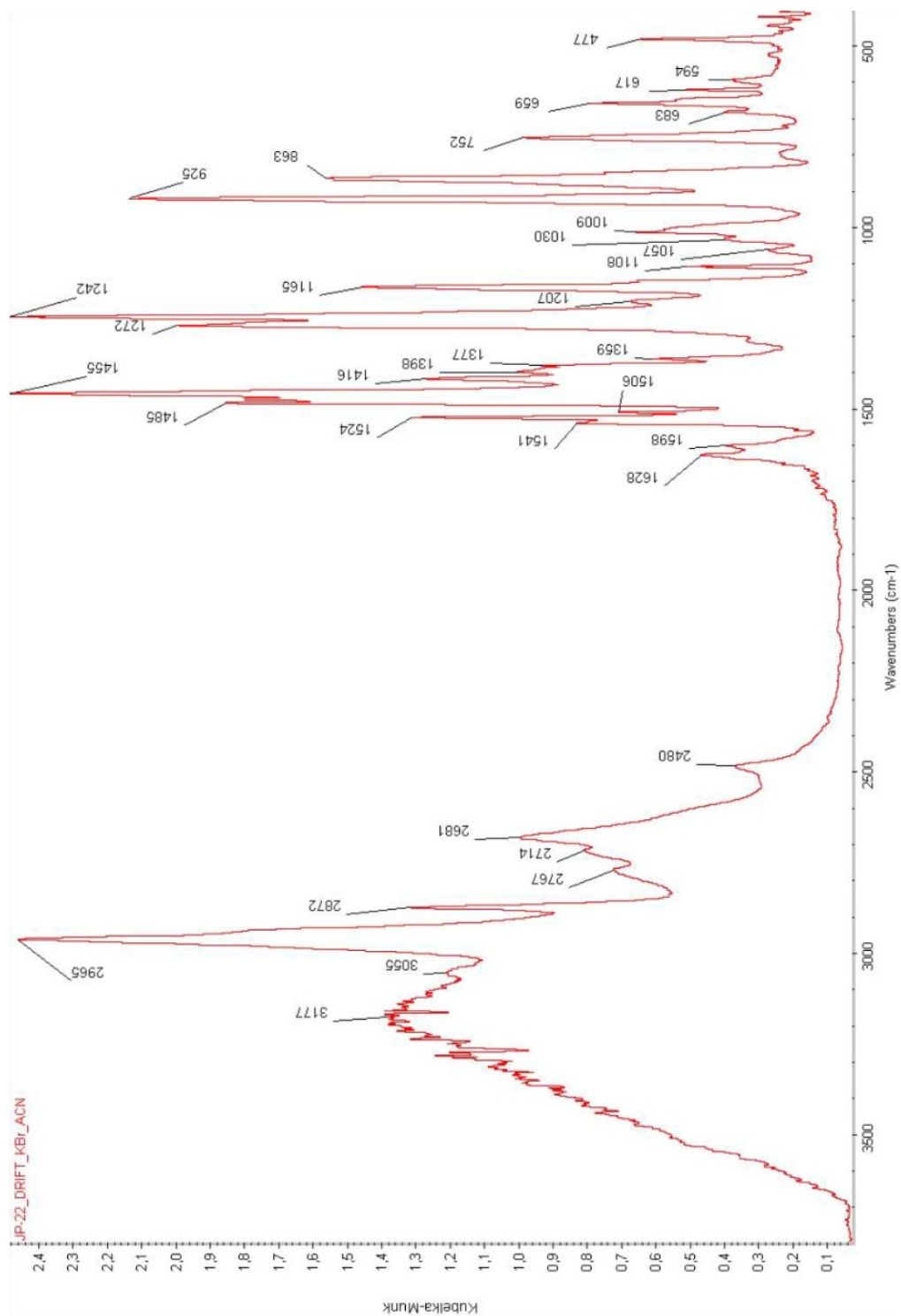
4) Infračervené spektrum bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (KBr, ACN)



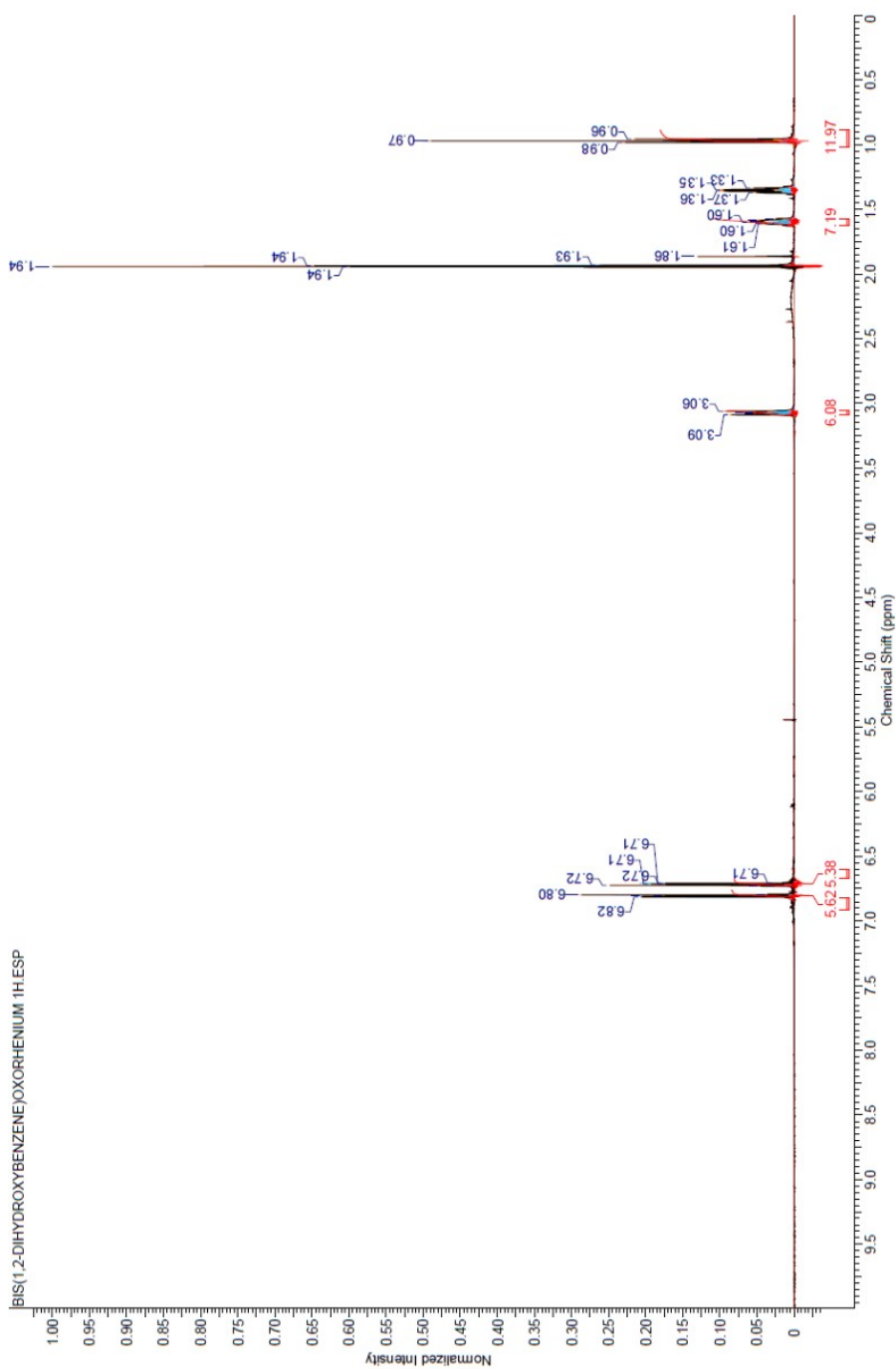
5) Infračervené spektrum bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (KBr, ACN)



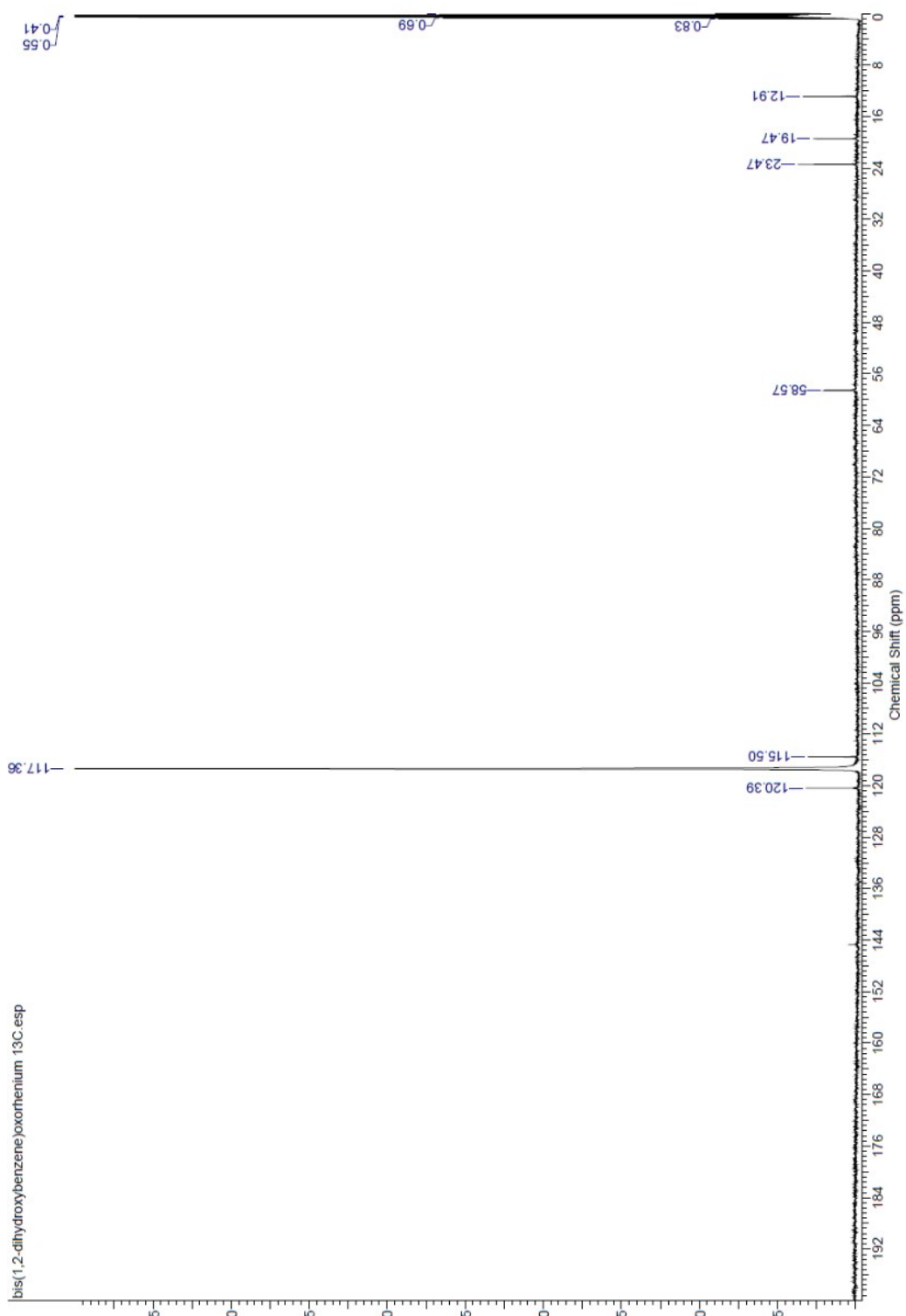
6) Infračervené spektrum bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorheniového komplexu (KBr, ACN)



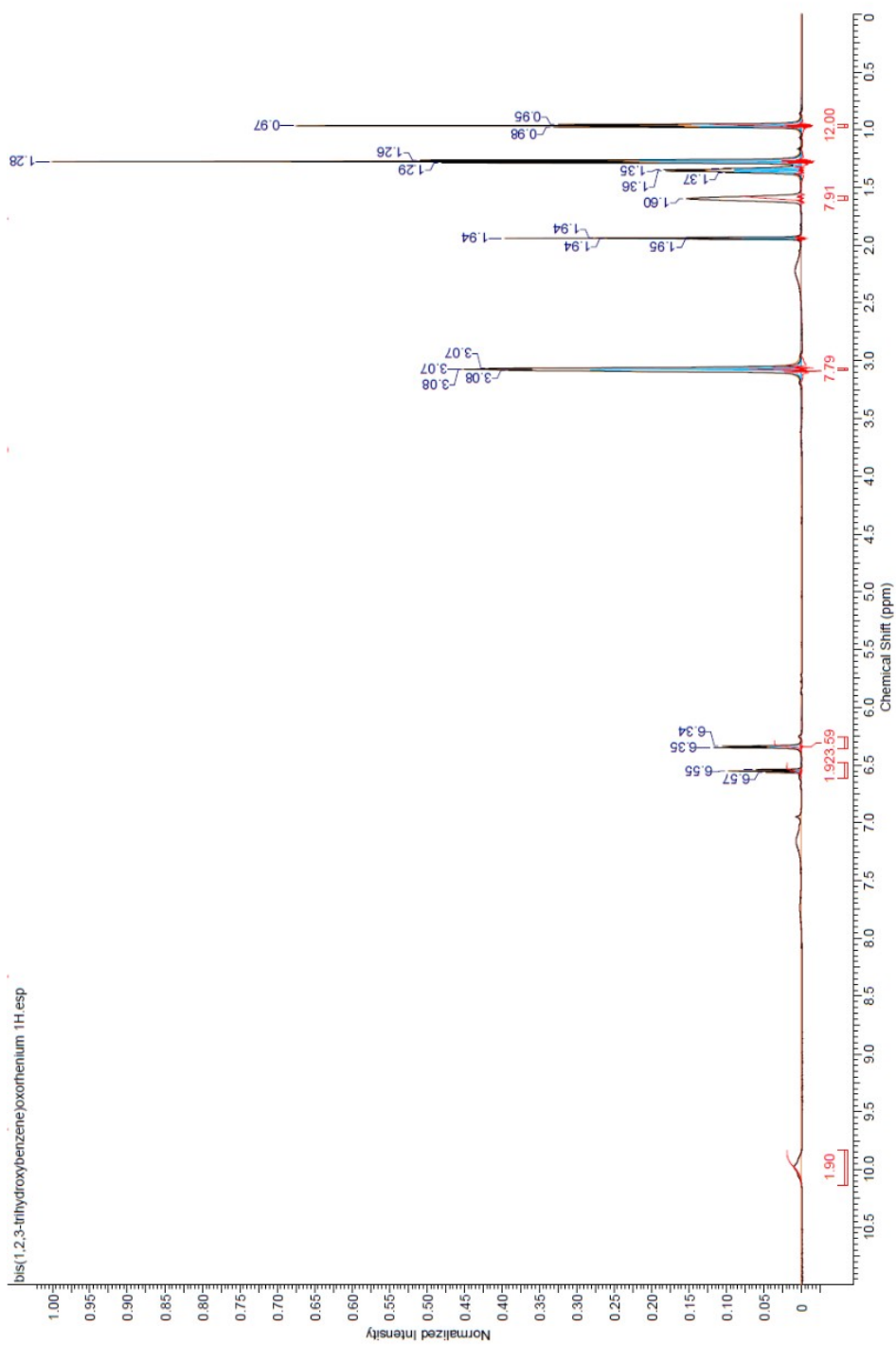
7) Vodíkové spektrum bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)



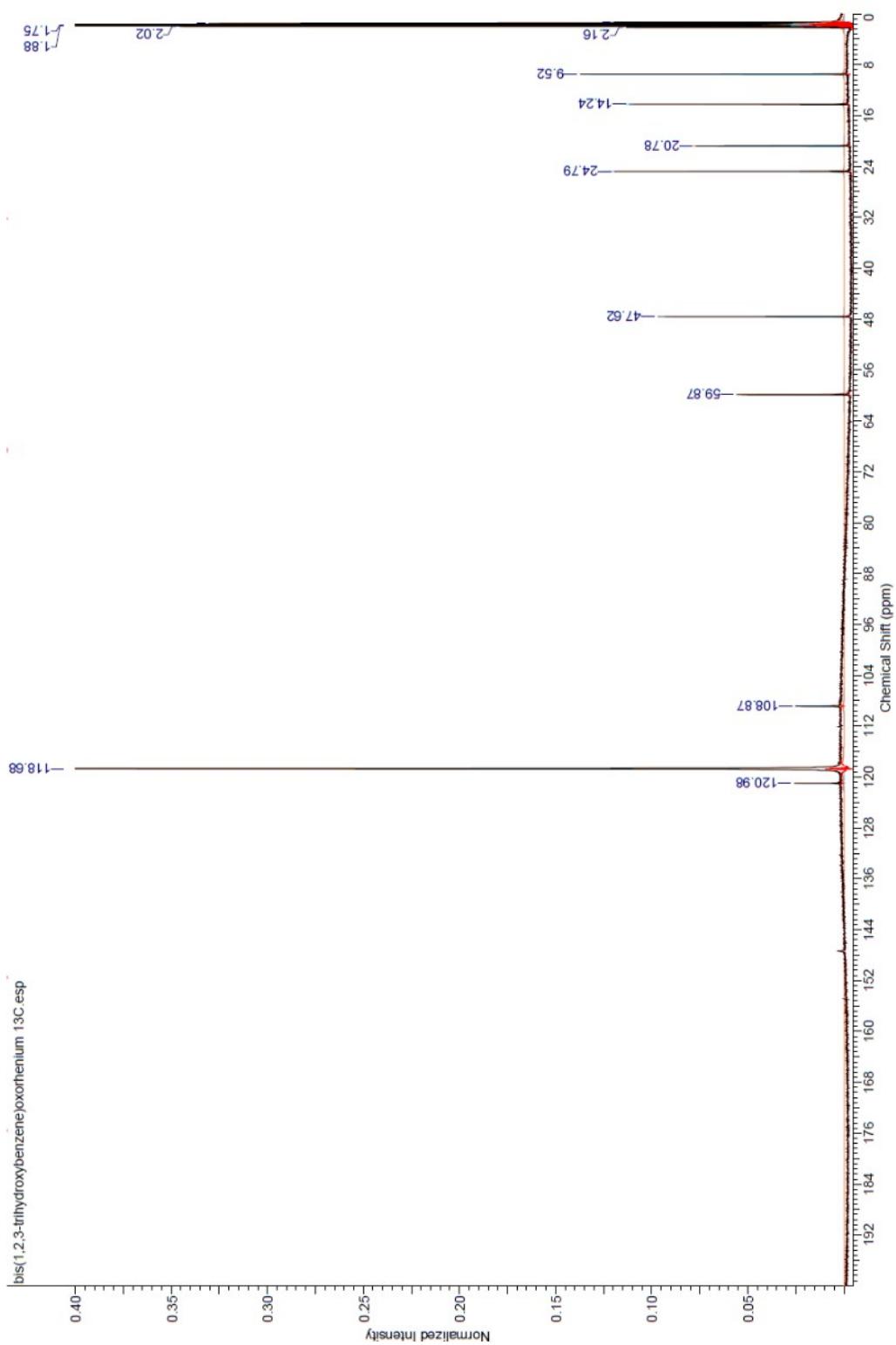
8) Uhlíkové spektrum bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)



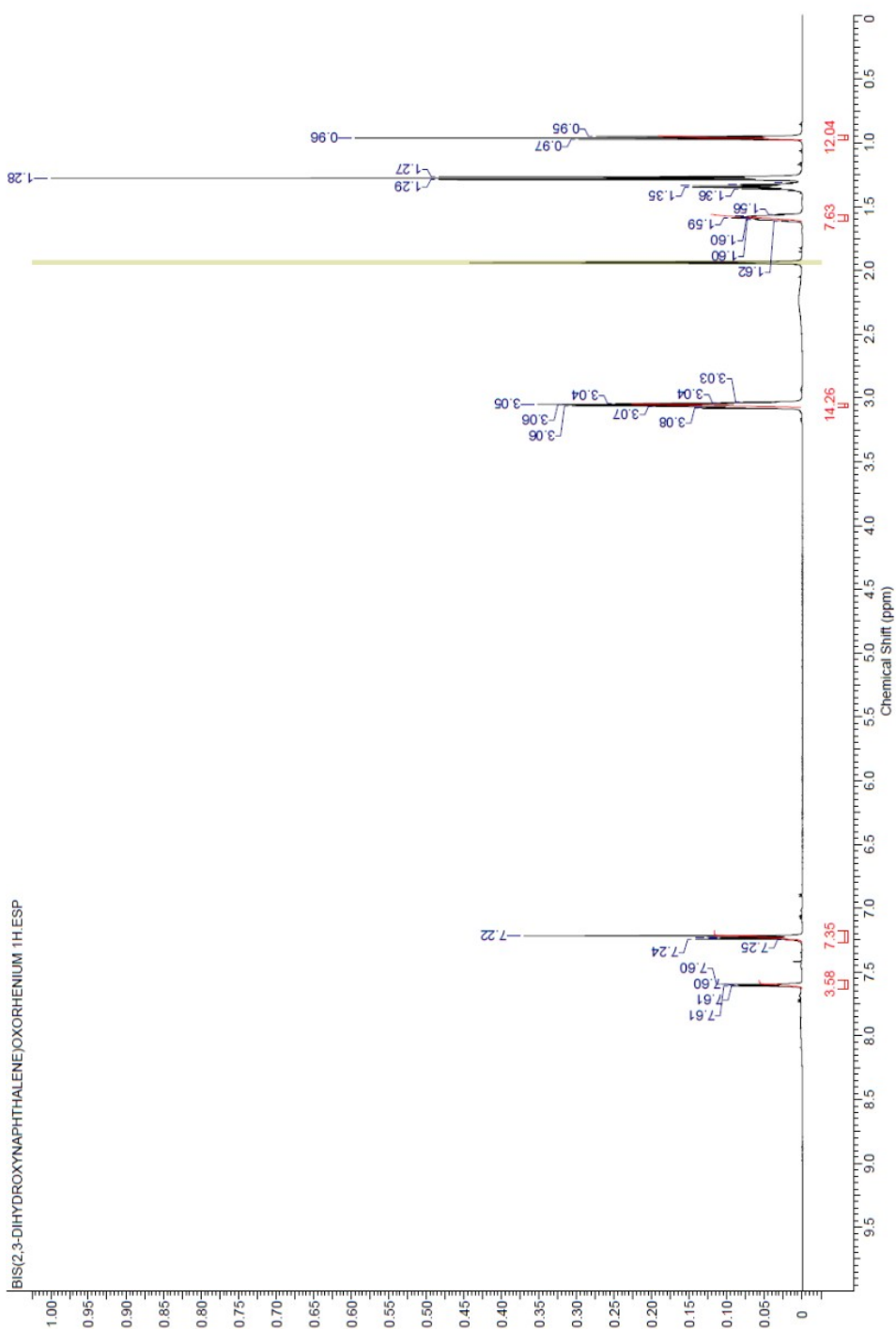
9) Vodíkové spektrum bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)



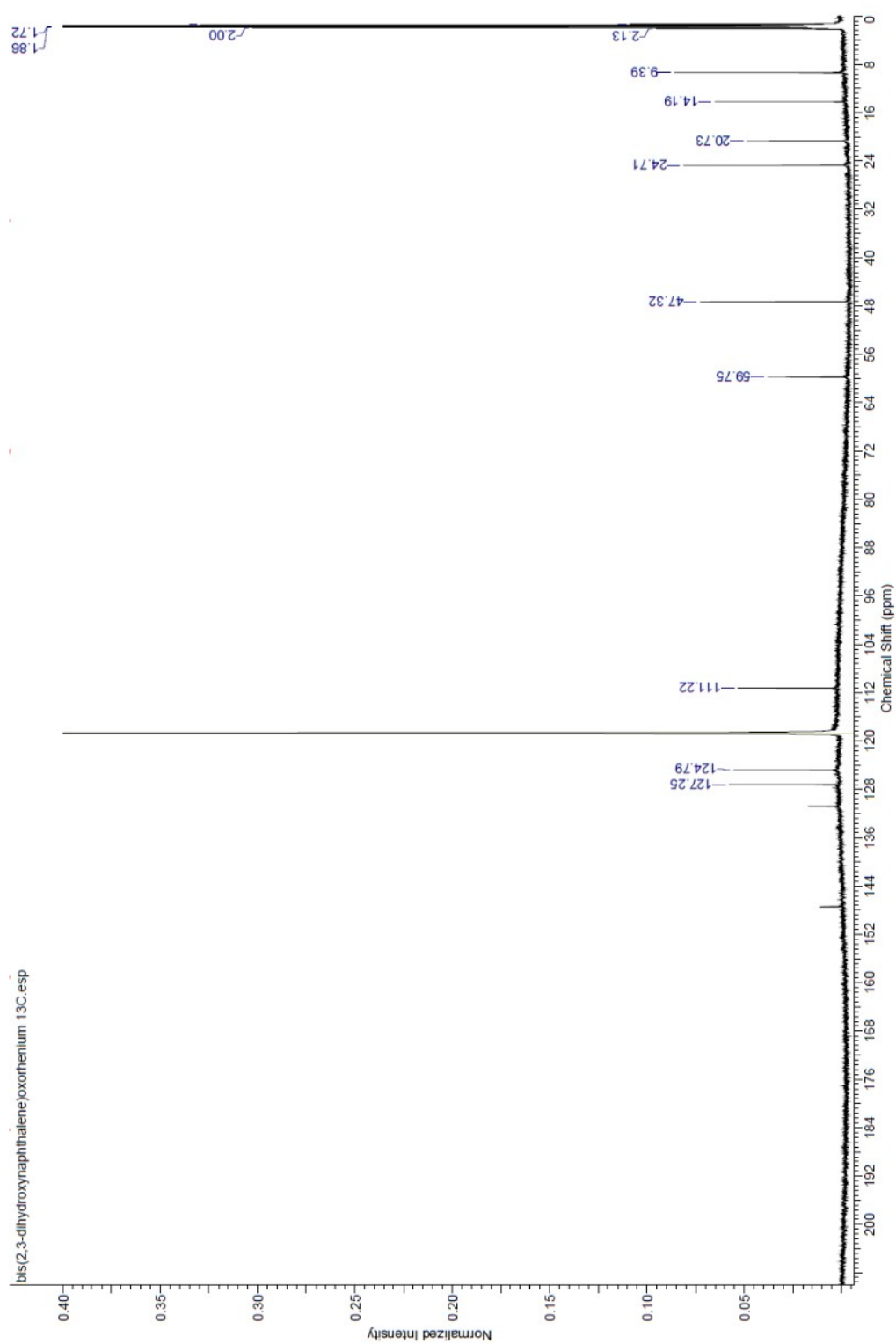
10) Uhlíkové spektrum bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)



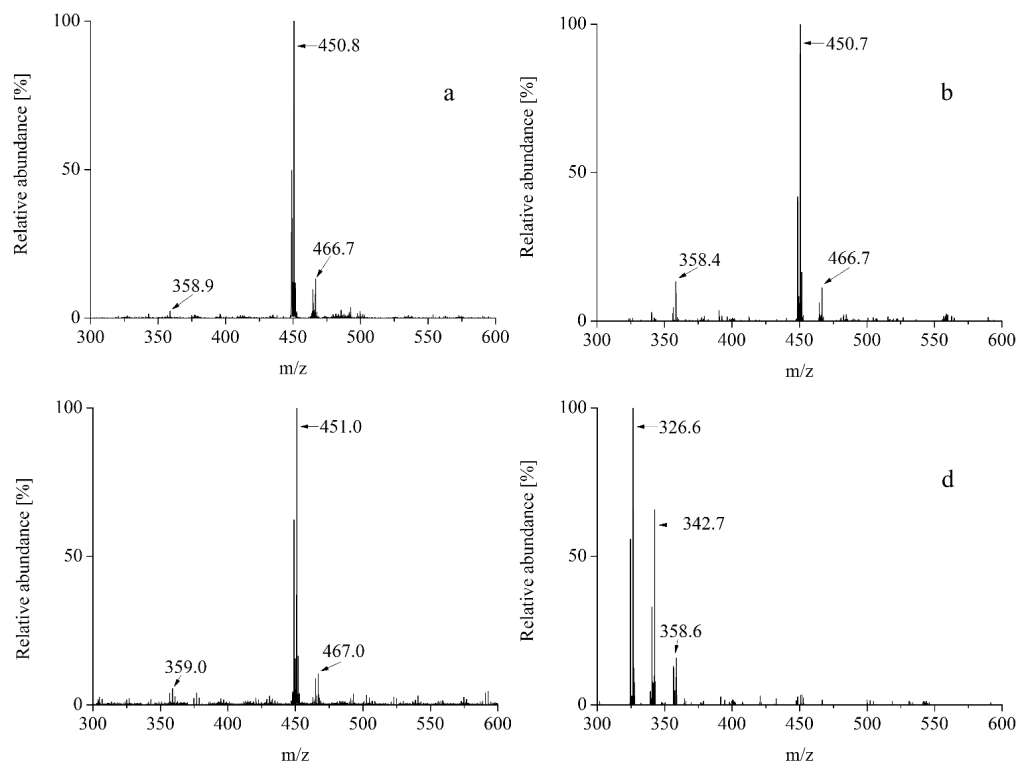
11) Vodíkové spektrum bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)



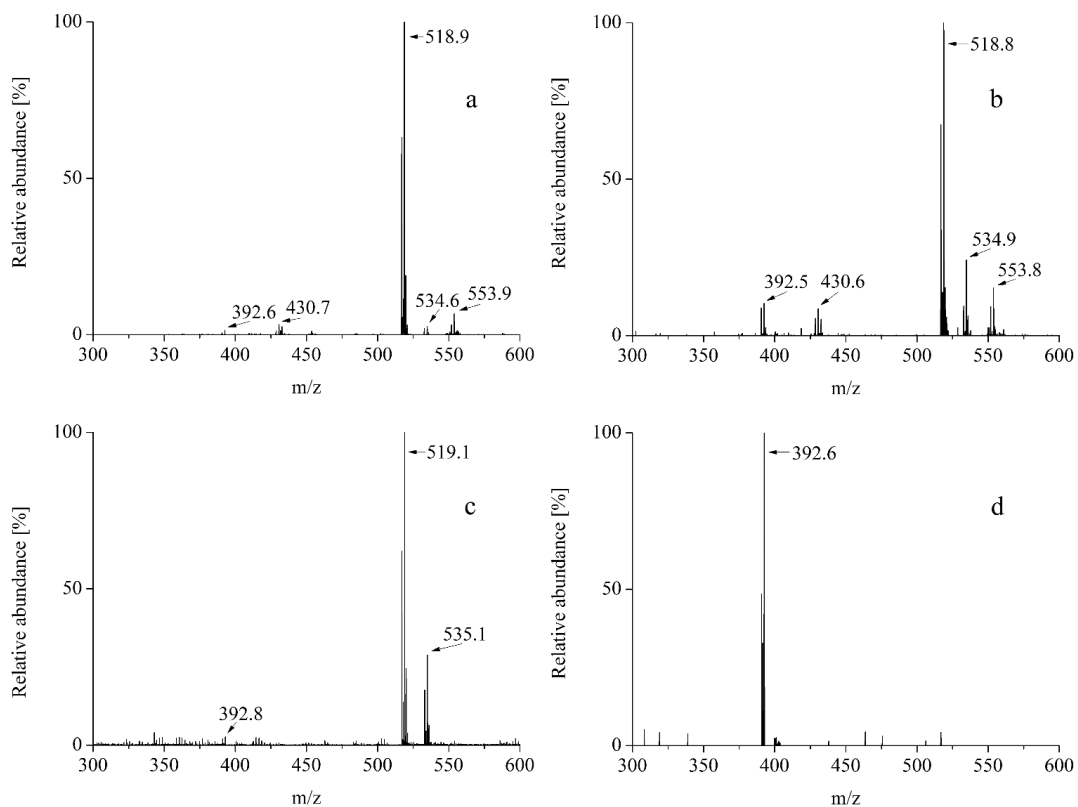
12) Uhlíkové spektrum bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorheniového komplexu (600 MHz, ACN-d3)



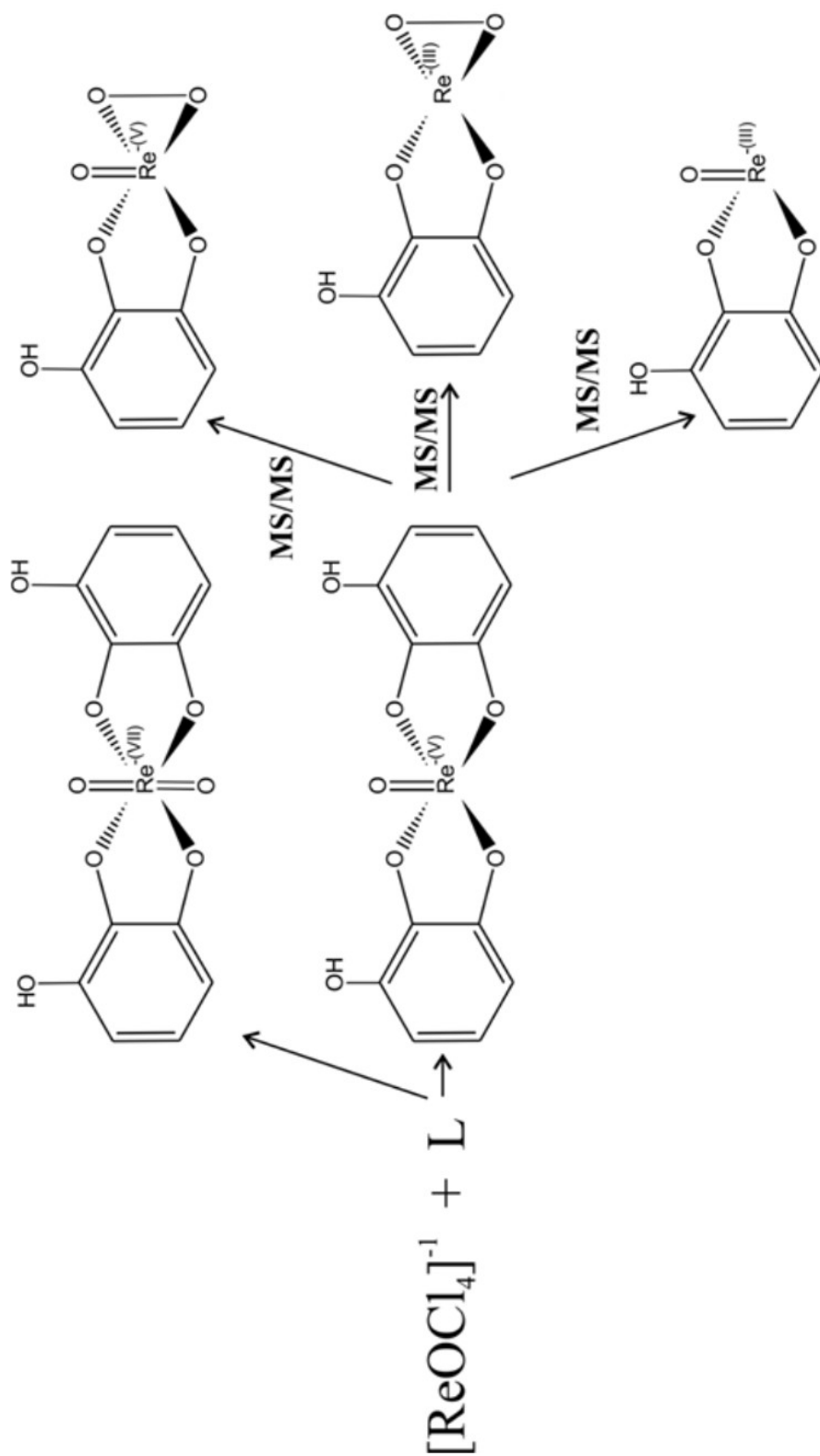
13) Naměřená spektra v negativním módu pro komplex s 1,2,3-trihydroxybenzenem pro ionizační techniky ESI-MS (a); APPI-MS (b), LDI-MS (c) a ESI-MS/MS (d) s dominantními molekulovými píkami.



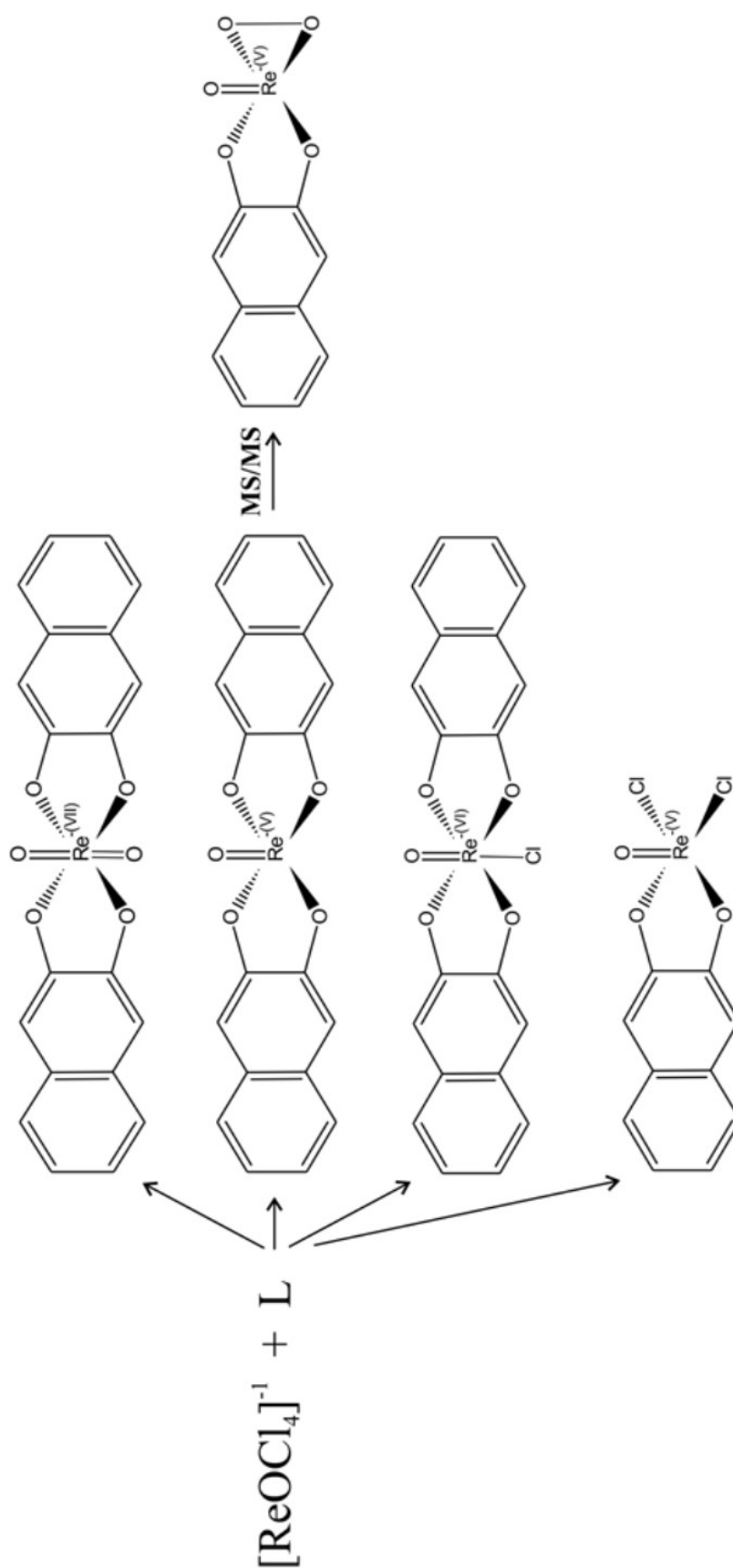
14) Naměřená spektra v negativním módu pro komplex s 2,3-dihydroxynaftalenem pro ionizační techniky ESI-MS (a); APPI-MS (b), LDI-MS (c) a ESI-MS/MS (d) s dominantními molekulovými píky.



15) Reakční schéma bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorheniového komplexu



16) Reakční schéma bis(2,3-dihydroxy-naftalen) oxorheniového komplexu

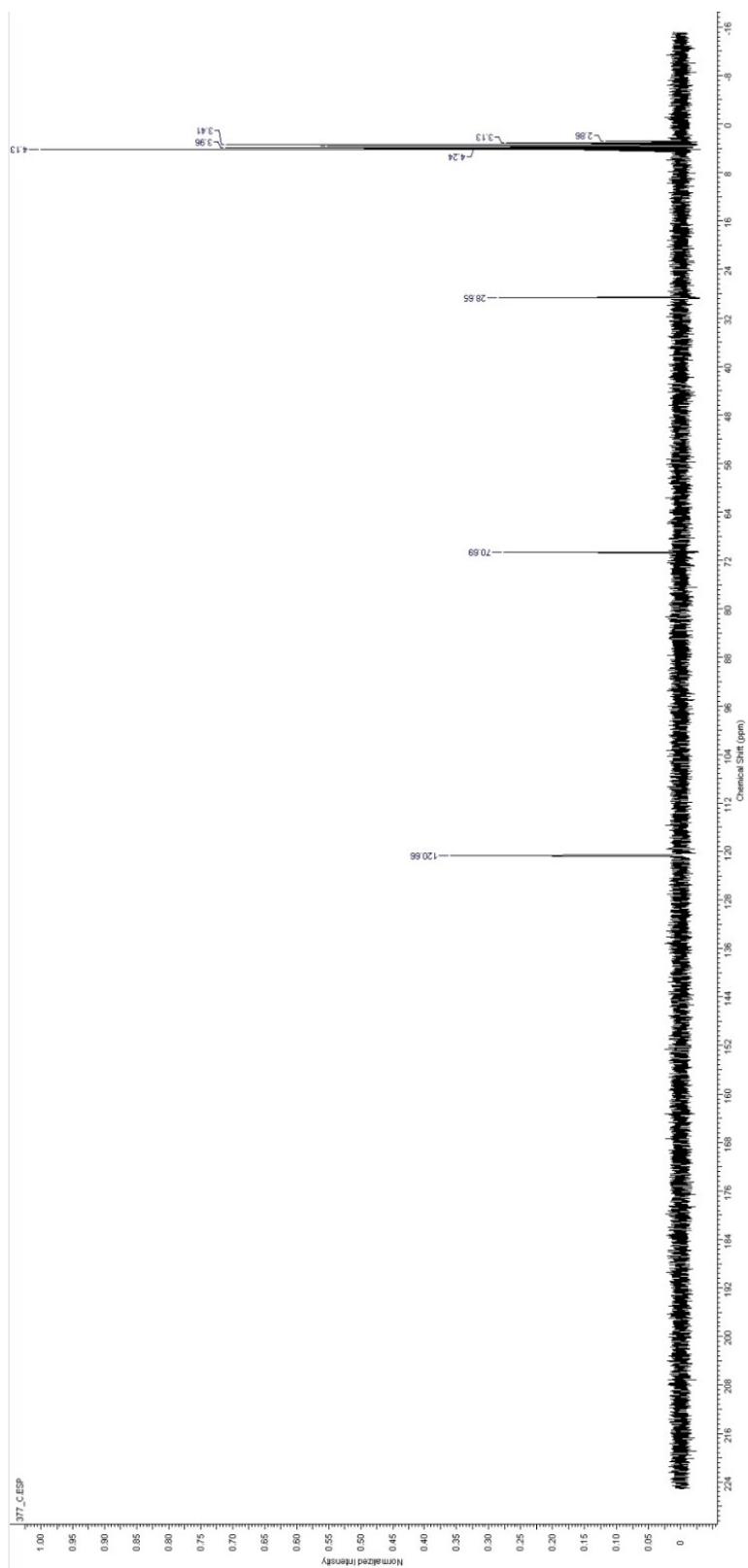


9.2 Publikace II a III

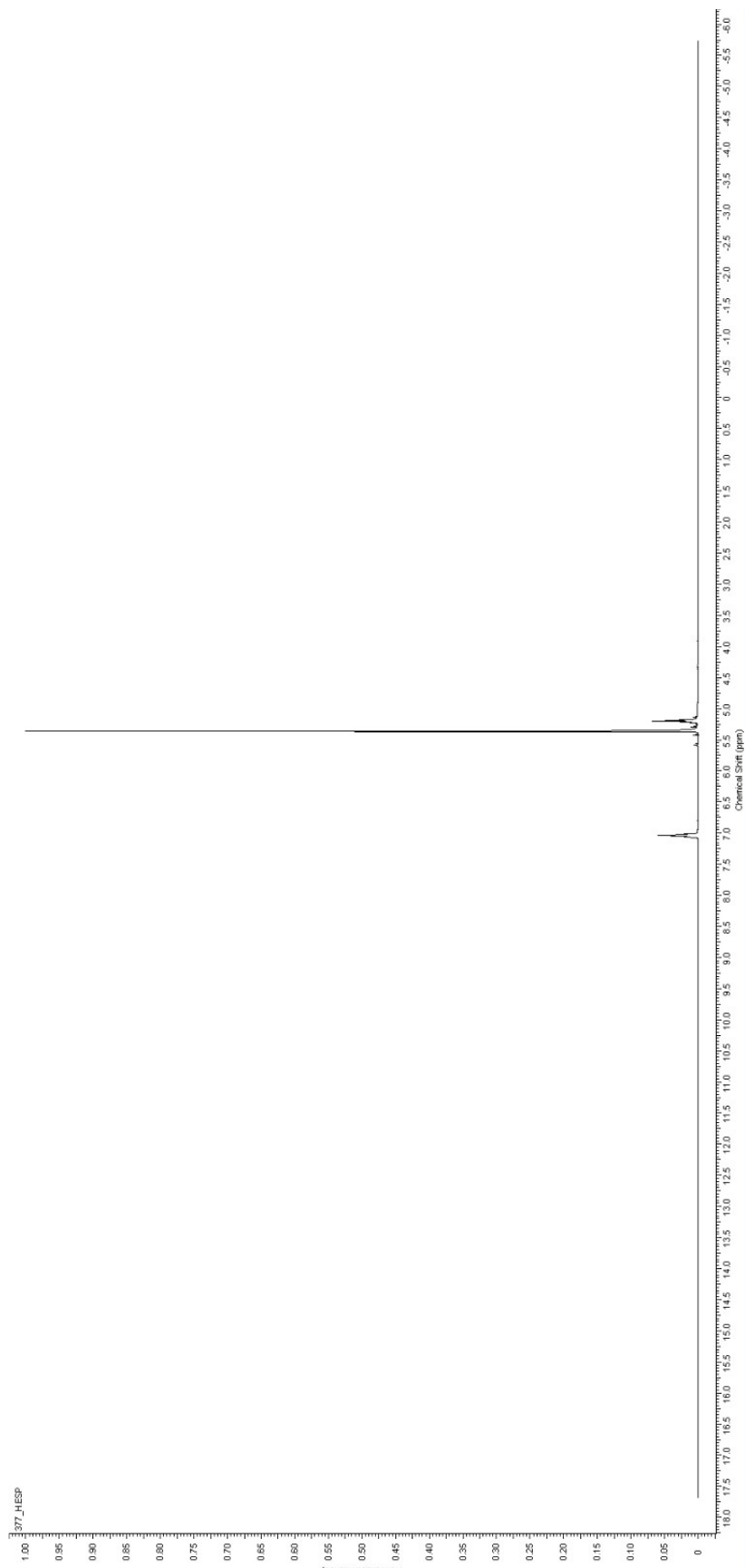
Seznam příloh:

- 1) Uhlíkové spektrum 1,2,3-trihydroxybenzen-chloro-oxorhenium komplexu (400 MHz, ACN-d₃)
- 2) Vodíkové spektrum 1,2,3-trihydroxybenzen-chloro-oxorhenium komplexu (400 MHz, ACN-d₃)
- 3) Reakční schéma a výsledná struktura připravených komplexů rhenia s 1,2,-dihydroxybenzenem v závislosti na objemu přidaného akcelérátoru TEA do reakční směsi. Reakce probíhaly za přítupu vzduchu, reakční časy jsou uvedeny vedle šipek.
- 4) 3D model komplexu bis(1,2,3-trihydroxybenzen)dioxorhenium vytvořený programem MolView
- 5) 3D model komplexu 1,2,3-trihydroxybenzen-chloro-oxorhenium vytvořený programem MolView
- 6) 3D model komplexu bis(1,2-dihydroxybenzen)dioxorhenium vytvořený programem MolView
- 7) 3D model komplexu bis(1,2-dihydroxybenzen)-chloro-oxorhenium vytvořený programem MolView
- 8) 3D model komplexu N-(bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium)-parabromanilin vytvořený programem MolView

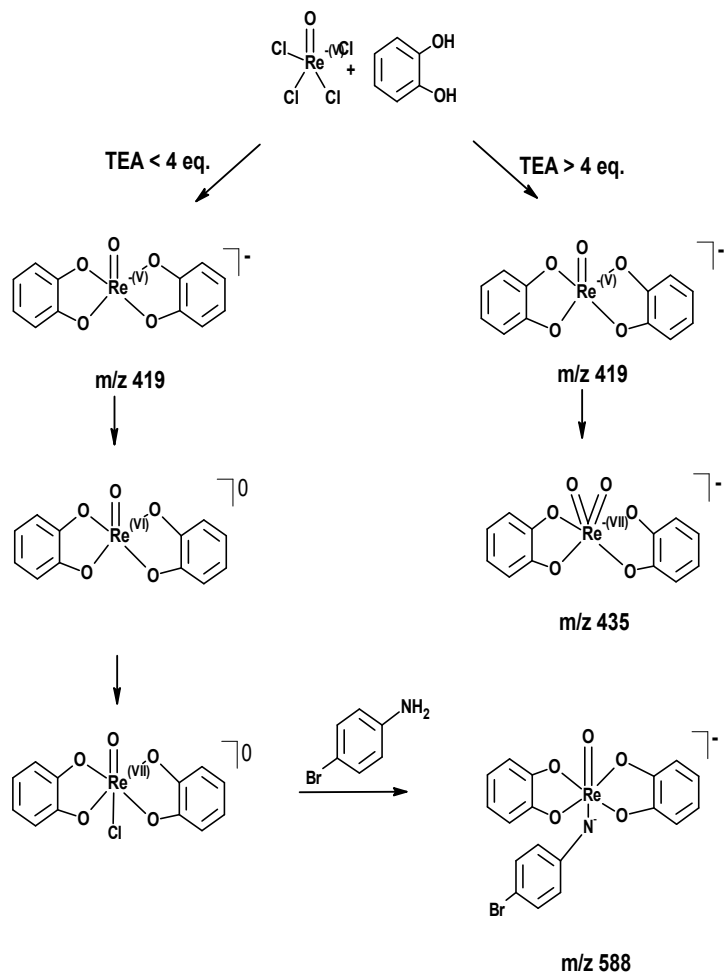
1) Uhlíkové spektrum 1,2,3-trihydroxybenzen-chloro-oxorhenium komplexu (400 MHz, ACN-d3)



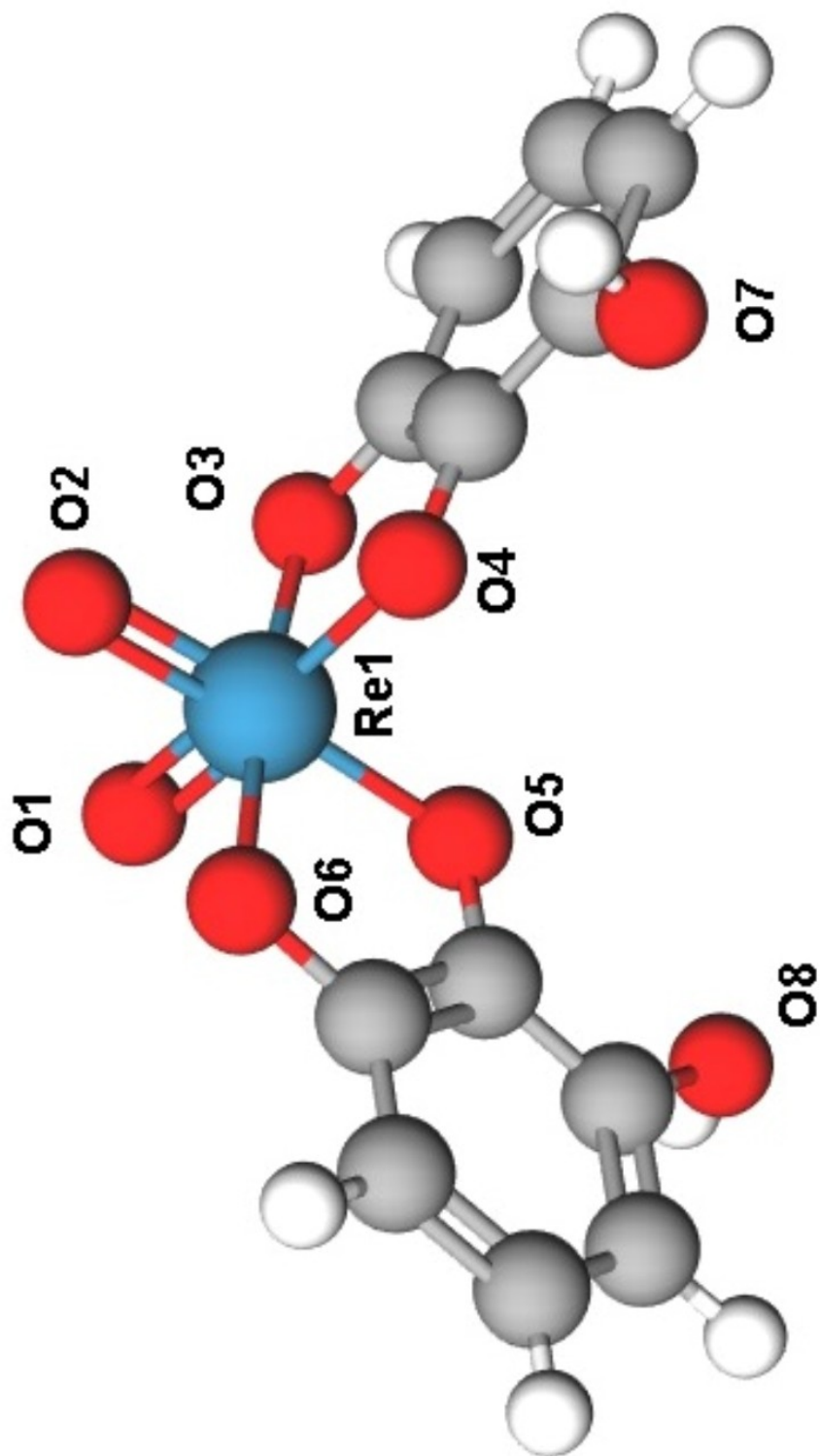
2) Vodíkové spektrum 1,2,3-trihydroxybenzen-chloro-oxorhenium komplexu (400 MHz, ACN-d3)



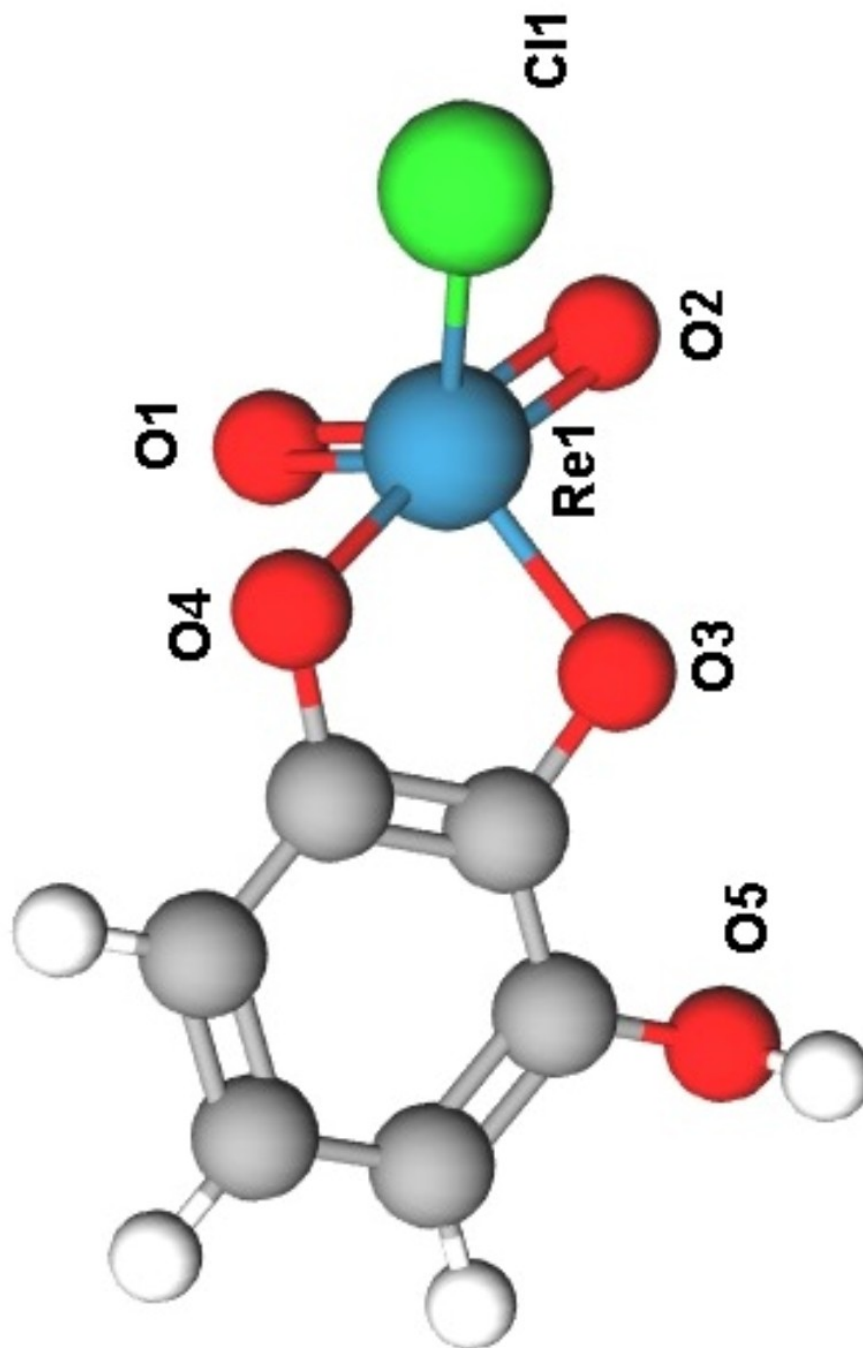
- 3) Reakční schéma a výsledná struktura připravených komplexů rhenia s 1,2-dihydroxybenzenem v závislosti na objemu přidaného akcelérátoru TEA do reakční směsi. Reakce probíhaly za přítomnosti vzduchu, reakční časy jsou uvedeny vedle šipek.



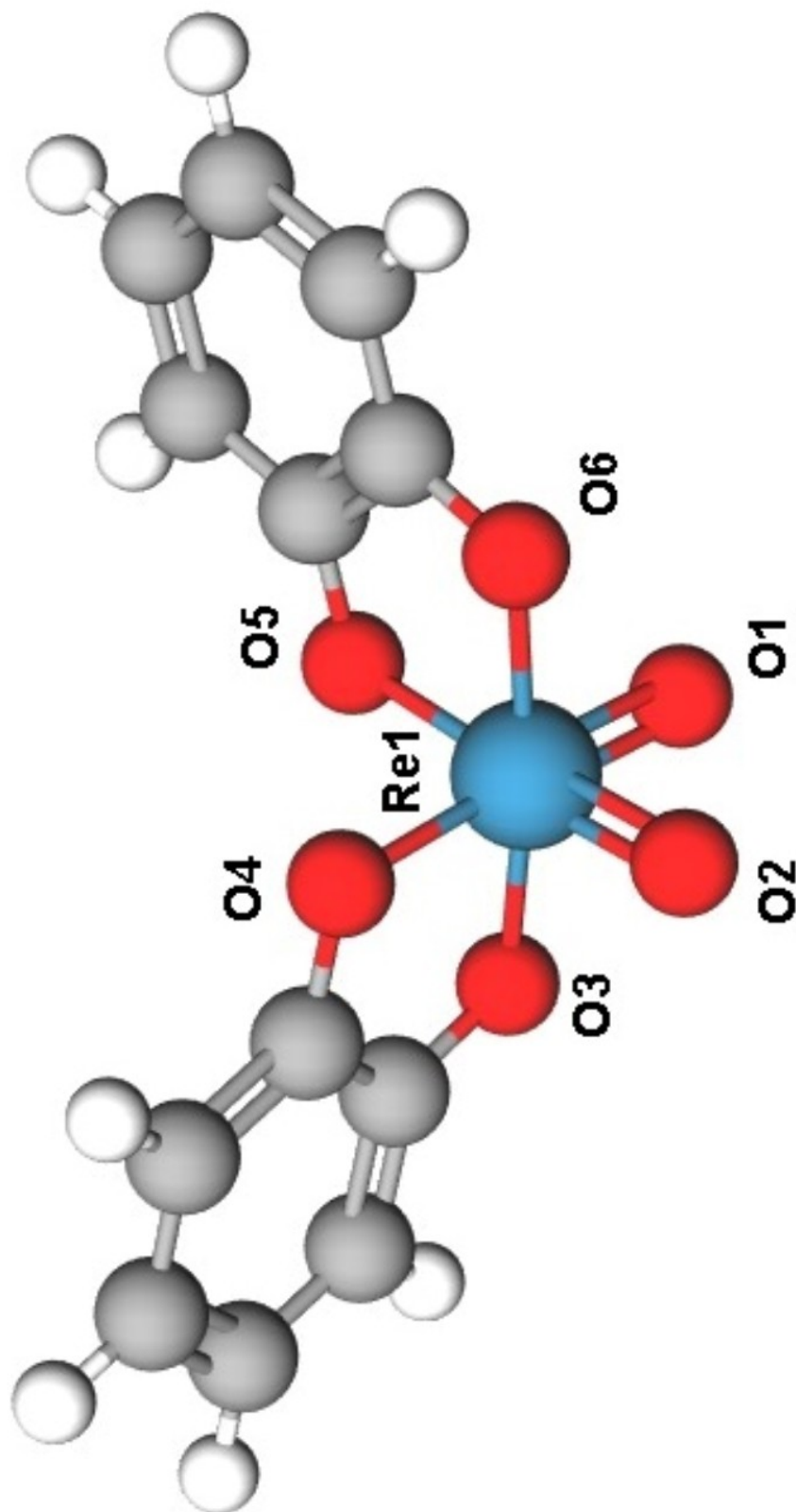
- 4) 3D model komplexu bis(1,2,3-trihydroxybenzen)dioxorhenium vytvořený programem MolView



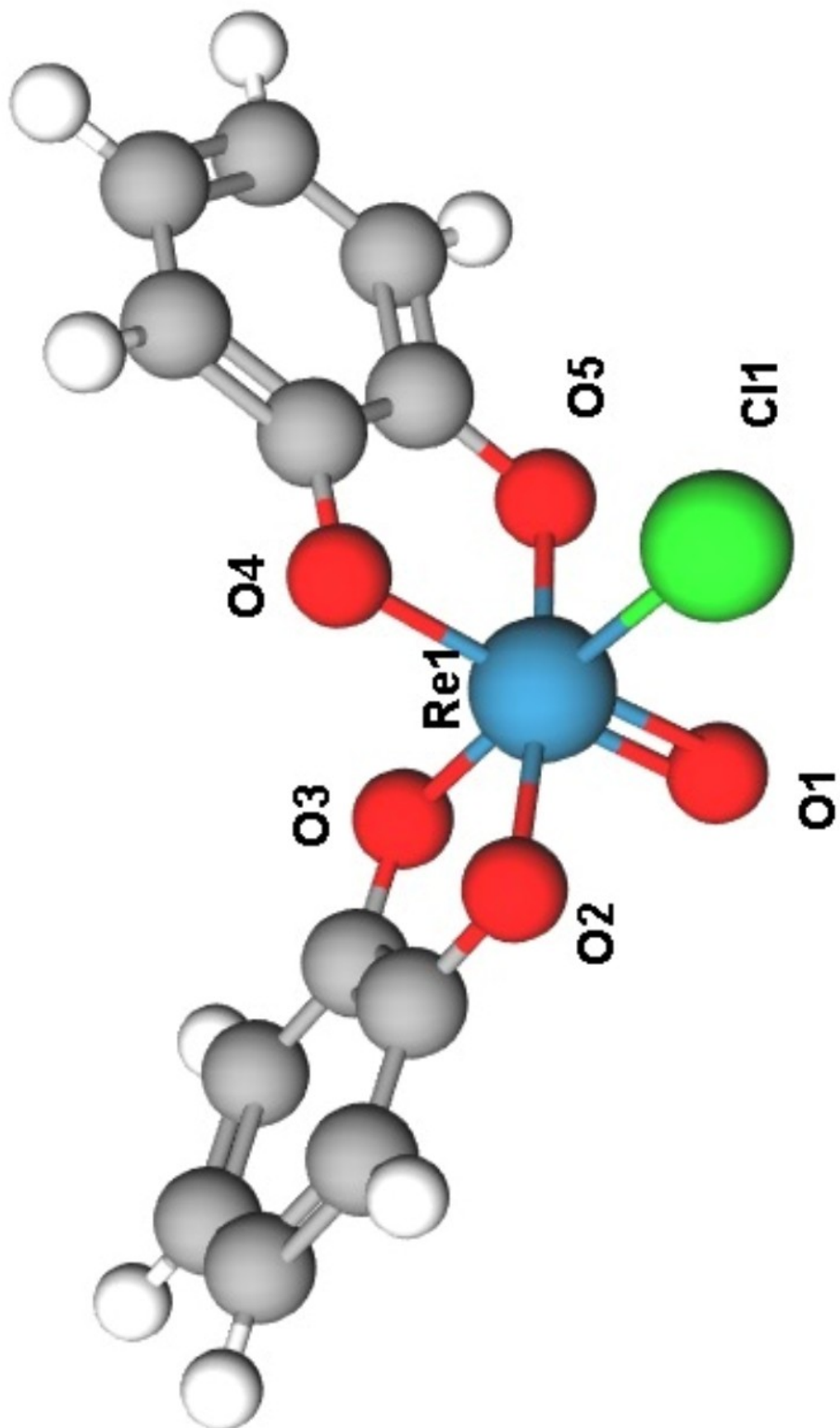
5) 3D model komplexu 1,2,3-trihydroxybenzen-chloro-oxorhenium vytvořený programem MolView



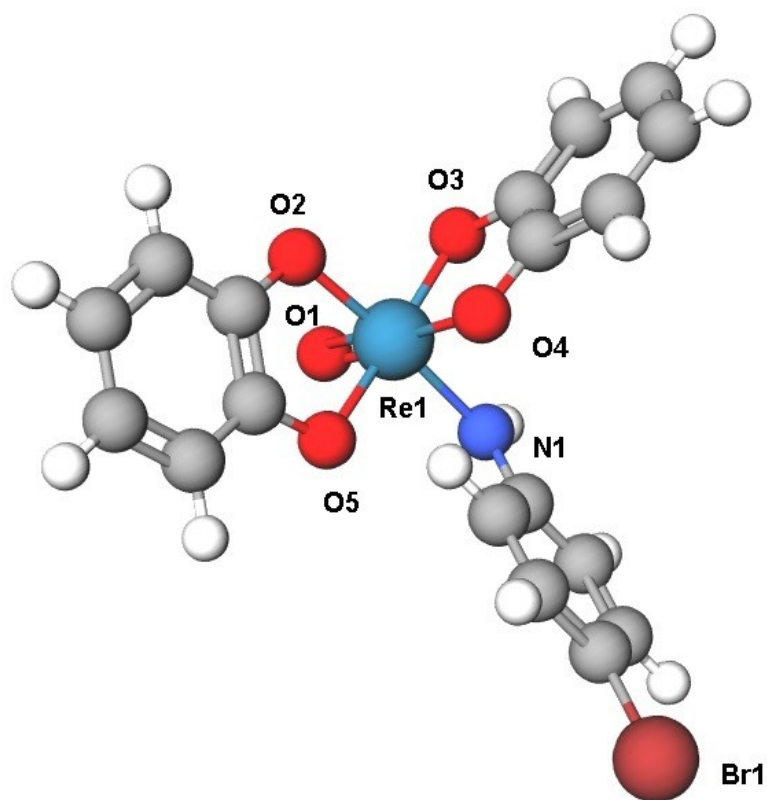
6) 3D model komplexu bis(1,2-dihydroxybenzen)dioxorhenium vytvořený programem MolView



7) 3D model komplexu bis(1,2-dihydroxybenzen)-chloro-oxorhenium vytvořený programem MolView



- 8) 3D model komplexu N-(bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium)-parabromanilin vytvořený programem MolView



9.3 Publikace IV

Seznam příloh:

- 1) Závislost migračního času nezreagovaného ligandu, prekursoru a komplexu na měnící se hodnotě pH v 10 mmol dm⁻³ fosfátovém pufru. CZE podmínky: 25 °C, 25 kV, 12 - 30 μA, detekce při 200 nm. Počáteční koncentrace složek reakce: ligand (0,16 mg ml⁻¹), prekursor (0,29 mg ml⁻¹).

- 1) Závislost migračního času nezreagovaného ligandu, prekursoru a komplexu na měnící se hodnotě pH v 10 mmol dm⁻³ fosfátovém pufru. CZE podmínky: 25 °C, 25 kV, 12 - 30 μA, detekce při 200 nm. Počáteční koncentrace složek reakce: ligand (0,16 mg ml⁻¹), prekursor (0,29 mg ml⁻¹).

