

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Anorganická chemie



Bc. Jan Rys

Dimerní makrocyclické komplexy

Dimer macrocyclic complexes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze dne 16.08.2022

Jan Rys

Abstrakt

Tato práce se zabývá dimerními makrocyclickými ligandy a jejich komplexy. Byly připraveny dva dimerní makrocyclické ligandy na bázi ligandu DO3A, s použitím xylenového můstku (BDO3A-*p*-X a BDO3A-*m*-X). Tyto ligandy byly charakterizovány pomocí NMR, MS, EA a v případě BDO3A-*p*-X také pomocí rentgenové strukturní analýzy. Pomocí UV/VIS spektrofotometrie byla získána data pro výpočet rychlostních konstant komplexace Ce³⁺ iontu při různém pH, pomocí rychlostní rovnice pseudoprvního řádu. Data byla srovnána s monomerním ligandem BnDO3A. Bylo zjištěno odlišné chování obou připravených ligandů, způsobené vzájemnou sterickou nebo vazebnou interakcí kavit. Dále bylo zjištěno odlišné chování dimerních ligandů ve srovnání se strukturně podobným srovnávacím ligandem BnDO3A.

Abstract

This thesis is focused on dimer macrocyclic ligands and their complexes. Two dimer macrocyclic ligands based on ligand DO3A, linked with xylyl linker were prepared (BDO3A-*p*-X and BDO3A-*m*-X). Both synthesized ligands were characterized using NMR, MS, EA and in the case of BDO3A-*p*-X by X-ray crystallography. Data for calculating pseudo-first order reaction rates for complexations with Ce³⁺ metal ion and their pH dependency were obtained by use of UV/VIS spectrophotometry. Obtained data were compared to structurally close monomer ligand BnDO3A. Dimer ligands display different coordination properties based on proximity and position of coordinating cavities. Both prepared ligands behave differently than structurally close monomer ligand BnDO3A.

1 Obsah

2 Úvod	7
2.1 Makrocykly	7
2.2 MRI	10
2.3 PET/SPECT	12
2.4 Targeting	13
2.5 Terapie	14
2.6 Theranostika	14
2.7 Dimerní makrocyclické ligandy	15
2.8 Cíle práce	18
3 Experimentální část	19
3.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)	19
3.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)	19
3.3 Elementární analýza (EA)	19
3.4 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)	19
3.5 Flash chromatografie	19
3.6 UV/VIS spektrofotometrie	19
3.7 Výpočet rychlostních konstant komplexace ligandů	21
3.8 Nukleární magnetická rezonance (NMR)	21
3.9 Použité chemikálie	21
3.10 Syntéza	22
3.10.1 Dibromxyleny	22
3.10.2 <i>t</i> -Bu ₃ DO3A·HBr	23
3.10.3 BDO3A- <i>p(m)</i> -X	24
3.10.4 Komplexy	26
3.11 Diskuse syntézy	26
3.12 UV/VIS měření – Výsledky a diskuse	29
3.13 Rentgenová strukturní analýza	34
4 Závěr	36
5 Literatura	37

Seznam použitých zkratk

DO3A – kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová

NMR – Nukleární magnetická rezonance

MS – Mass spectroscopy (hmotnostní spektroskopie)

EA – Elementární analýza

BnDO3A – 1-Benzyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina

tacn – 1,4,7-triazacyklononan

DOTA – kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová

NO2A – kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4-dioctová

NOTA – kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová

TE2A – kyselina 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,8-dioctová

TETA – kyselina 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11-tetraoctová

MRI – Magnetic resonance imaging

GBCA – Gadolinium based contrast agents

DTPA – Diethylentriaminpentaacetát

PET – Positron emission tomography

SPECT – Single photon emission computed tomography

[¹⁸F]-FDG – 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoroglukóza

TLC – Thin layer chromatography

DMP – Dimethylpiperazin

Pip – Piperazin

DABCO – 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane

RVO – Rotační vakuová odparka

DMA – Dimethylacetamid

DMF – Dimethylformamid

MeCN – Acetonitril (methylkyanid)

ESI-MS – Electrospray injection mass spectroscopy

TFA – Trifluoroacetic acid (trifluorooctová kyselina)

DCM – Dichlormethan

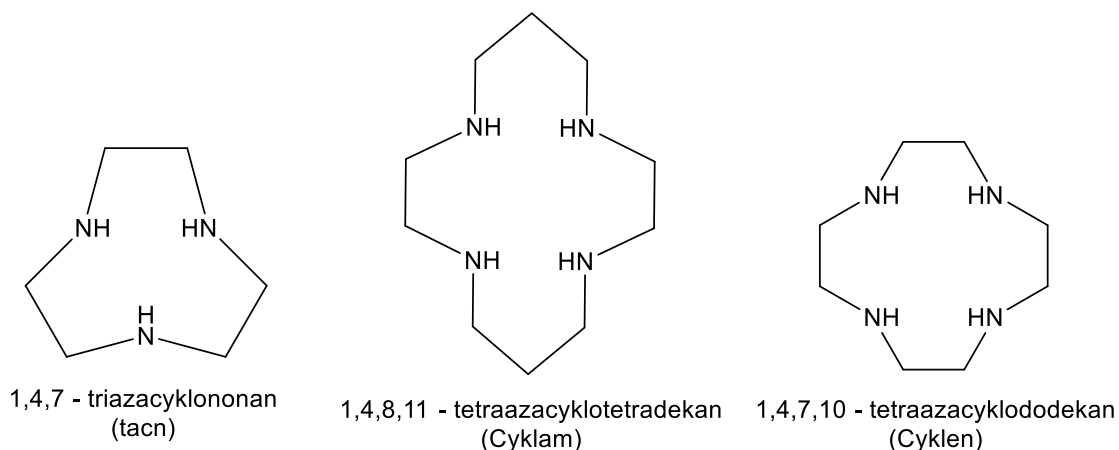
2 Úvod

2.1 Makrocykly

Dusíkaté makrocyklické ligandy nacházejí bohaté uplatnění v praktickém použití a jsou tím pádem intenzivně zkoumány v celé řadě oborů. Jedněmi z oborů, kde hrají makrocyklické ligandy velice významnou roli jsou medicína a radiologie, kde jsou využívány jako nosiče kovů k diagnostickým i terapeutickým aplikacím. Takovéto komplexy makrocyklů jsou zvláště důležité právě pro neinvazivní zobrazovací diagnostické metody. Využívá se zde především jejich vysoké chemické odolnosti, kinetické inertnosti, způsobené makrocyklickým efektem¹ a vysokých konstant stability, které neumožňují zakomplexovaným iontům ve větším množství dekomplexovat a tím tlumí případnou toxicitu takovýchto iontů. Sekundární aminové atomy dusíku takovýchto makrocyklů navíc umožňují další substituce a tím pádem vznik celé řady ligandů z jedné výchozí struktury. Dále pak sekundární aminové atomy dusíku, které jsou podle teorie HSAB přechodnou až tvrdou Lewisovskou bází, dokáží dobře koordinovat většinu iontů kovu, pokud je kavita makrocyklu dostatečně velká.² Takto je možno na míru ladit jak koordinační vlastnosti pro určité ionty kovů, tak i jejich chování v organismu, distribuci a vylučování.

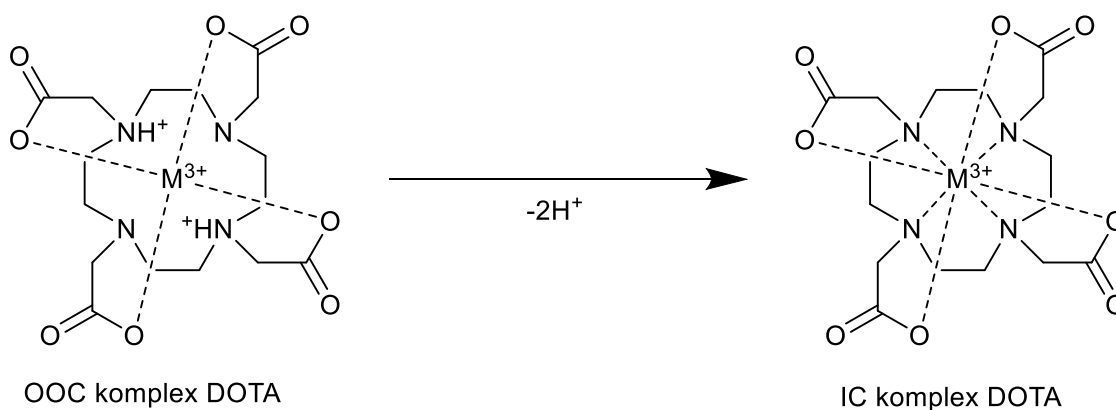
Mezi nejkoumanější makrocykly se řadí především tacn, Cyklen a Cyklam (**Obrázek 1**). Makrocyklus tacn je malý, tří dusíkatý makrocyklus, který svou velikostí a uspořádáním umožňuje velmi dobrou koordinaci většiny iontů první přechodné řady, malých nepřechodných kovů a polokovů, přičemž koordinace probíhá nad rovinou tvořenou těmito atomy dusíku. Při substituci trojicí jednoduchých pendantních ramen pak vzniklý ligand poskytuje koordinační číslo 6 a nad rovinou pendantních ramen může být koordinován další atom, což může poskytnou koordinační číslo 7. Dalším z makrocyklů je Cyklam. Tento čtyř dusíkatý cyklus je specifický tím, že malé ionty, především pak Cu^{2+} a Zn^{2+} , dokáže koordinovat nikoliv nad, ale do roviny atomů dusíku. Díky tomu kolem iontu kovu vytváří čtvercové okolí s volnými axiálními polohami, což umožňuje koordinaci dvou dalších atomů a vznik oktaedrických struktur. Pokud je tento ligand plně substituován pendanty, může teoreticky poskytovat koordinační číslo 8, avšak nejčastěji se substituuje pouze dvěma koordinujícími pendanty, aby koordinační číslo komplexu bylo 6. Posledním makrocyklem, který zde

bude zmíněn, je Cyklen. Tento čtyř dusíkatý makrocyklus se co do tvaru a způsobu koordinace chová podobně ligandu tacn. Zatímco tacn a Cyklam jsou vhodné spíše pro kovy z první přechodné řady, menší nepřechodné kovy a polokovy, tak Cyklen je tradičně a specificky svázán s koordinační chemií lanthanoidů, Scandia, Yttria a v omezené míře také aktinoidů.



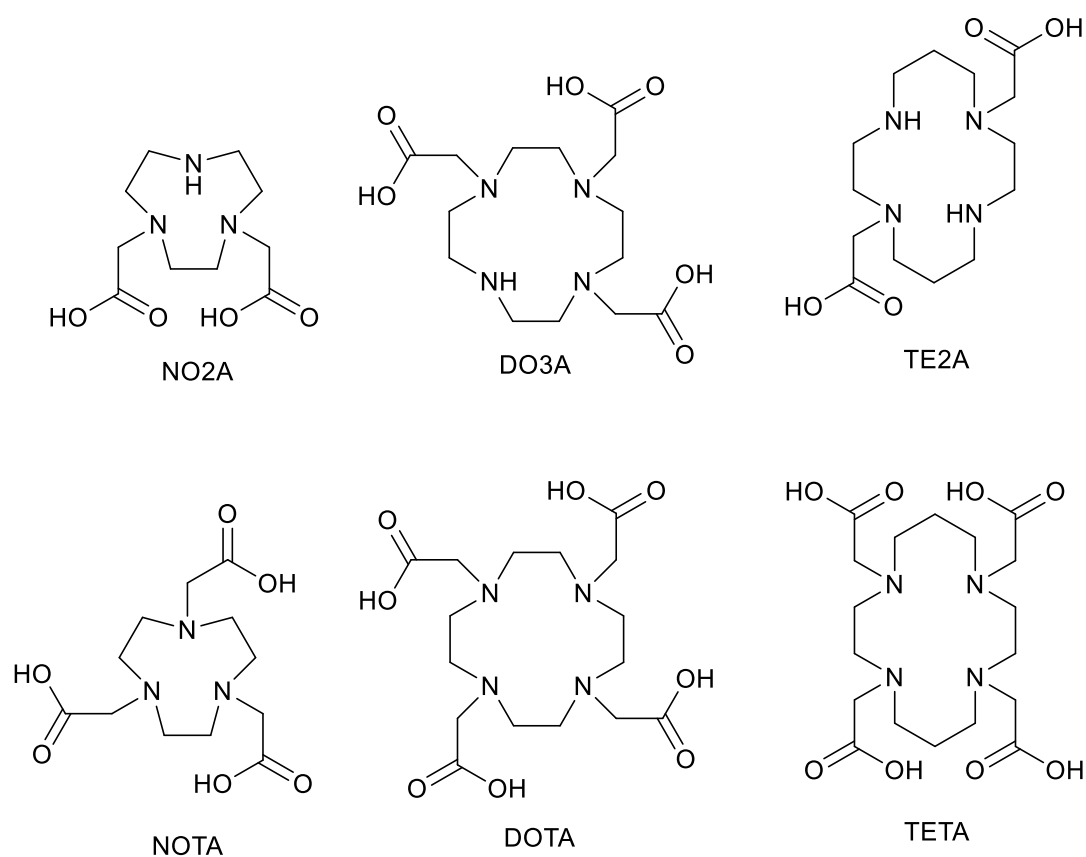
Obrázek 1 - Tři nejčasněji zkoumané makrocykly. tacn, Cyklam a Cyklen

Jak již bylo zmíněno, všechny makrocyklické ligandy mohou být dále substituovány na sekundárních aminech za vzniku dalších ligandů. Mezi velmi často zkoumané a využívané deriváty a zároveň jedny z nejjednodušších, patří deriváty s acetátovými pendantními rameny. Acetátová ramena jsou velmi vhodná ke komplexaci tvrdých iontů kovů a jejich geometrie dovolu je vytváření velmi výhodných koordinačních okolí a tím pádem stabilních struktur.



Obrázek 2 – Mechanismus komplexace ligandu DOTA

Makrocyclické ligandy s koordinujícími pendantními rameny se vyznačují velmi specifickým mechanismem koordinace. Ion kovu je nejprve zachycen rameny ligandu a zůstává na nich koordinovaný bez interakce s atomy dusíku makrocyklu. Tento děj je rychlý a takovýto částečně koordinovaný komplex není, ve srovnání s úplně koordinovaným příliš stabilní. U takového intermediárního komplexu, označovaného jako OOC (Out-Of-Cage), dochází časem k „pádu“ iontu kovu do kavity, koordinaci aminových atomů dusíku makrocyklu a vzniku takzvaného IC (In-Cage) komplexu (**Obrázek 2**), přičemž k tomuto dochází zpravidla při vyšším pH.³ Mezi nejznámější acetátové ligandy se řadí především ligandy NO₂A, NOTA, DO₃A, DOTA, TE₂A a TETA (**Obrázek 3**), ale hojně studované jsou i ligandy s různými rameny. Jsou to právě struktury odvozeny od ligandů DO₃A a DOTA, které jsou dnes využívány jako nosiče kovů pro zobrazování pomocí MRI a radiodiagnostických metod a k terapeutickým účelům.⁴



Obrázek 3 - Příklad acetátových derivátů makrocyclických ligandů tacn, Cyklen a Cyklam. Názvy jsou uvedeny bez protonizace.

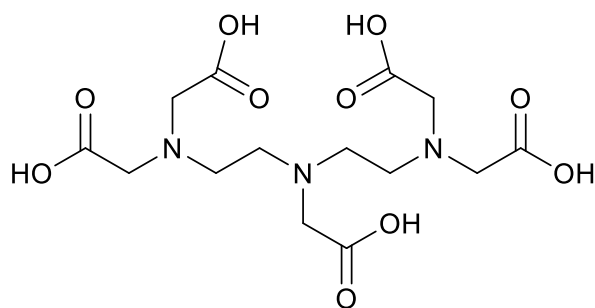
2.2 MRI

MRI (Magnetic Resonance Imaging) je dnes jednou z nejvyužívanějších neinvazivních diagnostických metod. Pracuje na principu měření relaxace jader s nenulovým spinem a měří především jádra vodíku ^1H . Ta se v těle nalézají prakticky všude, nejčastěji ve formě vody a tuku. Pomocí nativního MRI však bývá velmi složité rozlišit drobné fyziologické změny a tak je pro tyto případy nutné využití kontrastních látek. Paramagnetické kontrastní látky založené na Gd^{3+} (GBCA) jsou v současnosti jediné hojně používané kontrastní látky.⁴ Fungují na principu změny relaxačního času vodíku u koordinované a blízko se nacházející vody, což způsobuje pozitivní kontrast a místo s kontrastní látkou se více rozzáří (**Obrázek 4**).⁵



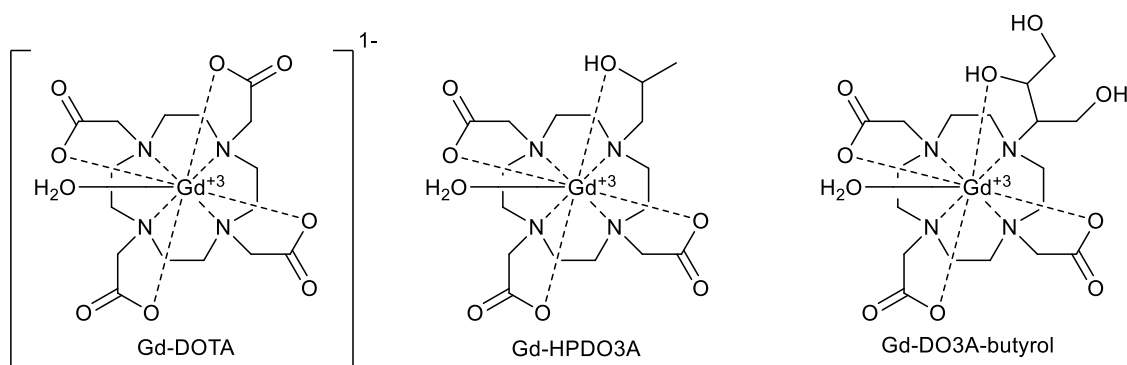
Obrázek 4 – MRI sken mozku pacienta pomocí nativního (vlevo) a kontrastního (vpravo) vyšetření.⁵

Dříve byly hojně užívány Gd^{3+} cheláty s otevřeným řetězcem, od těch se dnes již upouští, jelikož uvolňovaly Gd^{3+} do organismu a tím projevovaly toxicitu. Místo nich začaly být intenzivně zkoumány právě makrocyclické ligandy. V Dnešní době je k použití v Evropě schválených šest kontrastních látek na bázi Gd^{3+} , z čehož tři jsou chelátové, založené na substituované DTPA (**Obrázek 5**), tři makrocyclické, z toho jedna založena na DOTA a dvě na substituované DO3A (**Obrázek 6**).⁶



DTPA

Obrázek 5 - Ligand DTPA, který byl využíván, jako nosič chelátových kontrastních látek GBCA

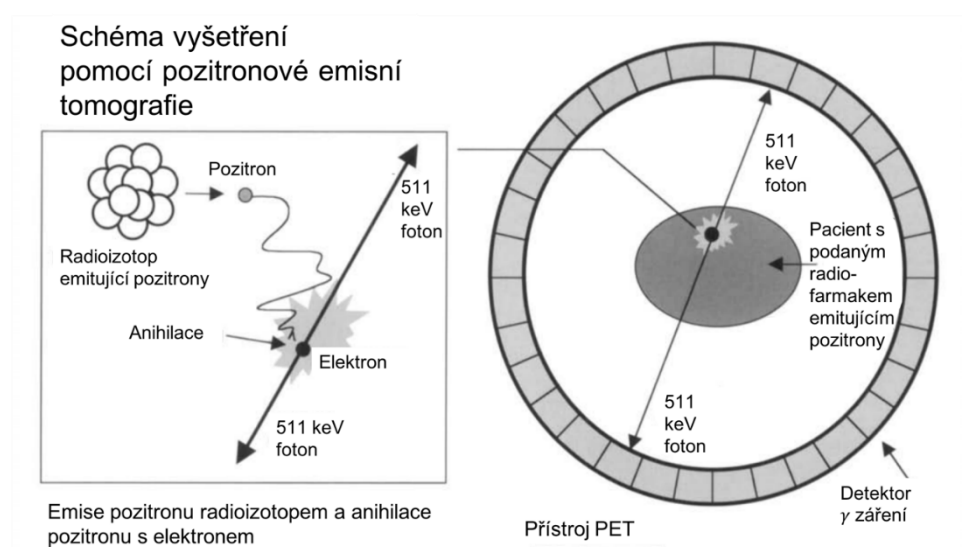


Obrázek 6 - V současnosti používané GBCA založené na bázi makrocyklu Cyklenu

Chelátové GBCA jsou stále používány, ale jen pro specifické aplikace a všeobecně je snaha tyto látky opustit úplně.⁶ V současnosti používané makrocyklické GBCA jsou výrazně stabilnější látky, které sice taktéž uvolňují Gd^{3+} do organismu, ale ve výrazně menší míře, čímž se snižují rizika spojená s toxicitou Gd^{3+} i při opakovaných vyšetřeních výrazně snižují. Rizika spojená se všemi GBCA se projevují zejména komplikacemi u pacientů s nedostatečnou funkcí ledvin, u kterých nedochází k dostatečně rychlému vyloučení kontrastní látky a zvýšeným projevům toxicity Gd^{3+} . Dále pak při časté a opakované aplikaci jsou důkazy o depozitu Gd^{3+} na mozku.⁷⁻¹⁰ Mimo těchto GBCA jsou zkoumána i jiná paramagnetická jádra. Jedná se především o Mn^{2+} a Fe^{3+} .¹¹

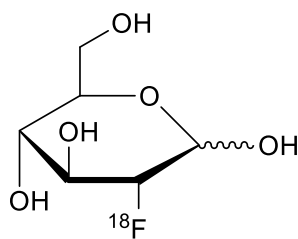
2.3 PET/SPECT

PET a SPECT jsou radiologické metody, využívající měření radioaktivního záření z kontrastních látek v těle pacienta. Metoda SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) je metoda zaměřená na detekci elektromagnetického gamma záření vyzářeného při rozpadu/relaxaci excitovaného jádra. Typicky se pro tuto metodu dnes využívá ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{201}Tl , ^{111}In ^{123}I , které jsou velmi dobře dostupné a jejich použití je již zažité, avšak metoda SPECT poskytuje relativně malou přesnost a nízké rozlišení i při perfektní distribuci. Při metodě PET (Positron Emission Tomography) jsou využívány izotopy podléhající beta plus rozpadu a následně je měřena dvojice antiparalelních fotonů o energii 511 keV, které jsou produktem anihilace pozitronu s elektronem (**Obrázek 7**).¹²



Obrázek 7 - Princip zobrazování pomocí metody PET.¹²

To umožňuje velmi přesné určení místa anihilace. V Případě PET dále hraje výraznou roli energie emitovaného pozitronu. Energie tohoto pozitronu určuje, jak daleko v tkáni pozitron urazí, než dojde k anihilaci, a příliš dlouhá dráha negativně ovlivňuje rozlišení. Nejčastější látkou, používanou pro měření PET je [^{18}F]-FDG (**Obrázek 8**). Právě ^{18}F je velmi dobrým jádrem pro metodu PET. Poločas rozpadu 110 minut je vhodný pro přípravu kontrastní látky (fluorované deoxyglukózy) a energie 640 keV odpovídá penetraci tkáně kolem 2 mm, poskytuje tedy i velmi dobré rozlišení.



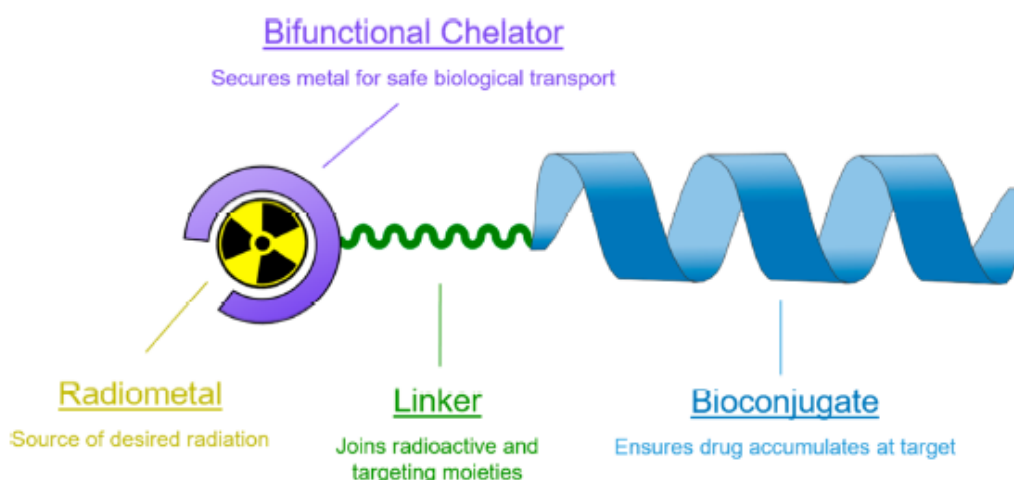
[¹⁸F]fluorodeoxyglukoza

Obrázek 8 - Radioaktivním ¹⁸F značená fluorodeoxyglukoza, používaná pro PET zobrazování nádorových tkání

Dalšími používanými PET izotopy jsou například další neutronově chudé izotopy lehkých prvků, jako ¹¹C, ¹³N a ¹⁵O. Z těžších izotopů, vhodných pro PET se pak jedná například o ⁶⁴Cu.

2.4 Targeting

Důležitým faktorem použití radiofarmak a kontrastních látek pro diagnózu i terapii je schopnost tyto látky zavést na místo určení. Ačkoliv existují látky, které mají přirozenou selektivitu pro požadovanou aplikaci (například [¹⁸F]-deoxyglukóza je vstřebávána nádorovými buňkami místo glukózy), tak většina látek musí být nějakým způsobem modifikována. Jedním ze způsobů modifikace látky je připojení biologicky aktivní molekuly (**Obrázek 9**)¹³, která specificky a cíleně ovlivní způsob distribuce do cílených tkání.¹⁴ Mohou to být sacharidy, peptidy (například agonisté integrinů nádorových buněk), hormony nebo například protilátky a jejich fragmenty.¹⁵



Obrázek 9 - Schématické znázornění radiofarmaka s připojenou bioaktivní molekulou, zajišťující distribuci látky.¹³

2.5 Terapie

Stejně jako v případě diagnostického použití, je i pro terapii nutno radioaktivní látku dopravit do místa určení. Na rozdíl od diagnózy je však potřeba, aby látka na určeném místě setrvala po dlouhou dobu, pokud možno nedocházelo k jejím depozitům mimo cílenou tkáň a aby přebytky látky, které se na místo určení nedostanou byly co nejrychleji vyloučeny z těla pacienta ven, ideálně ledvinami. U terapie pomocí radioaktivity je potřeba, aby dané jádro splňovalo určitá kritéria. Ideální jádro pro terapeutickou aplikaci poskytuje během své rozpadové řady více terapeutických izotopů s co nejnižší energií rozpadových produktů, aby nedocházelo k ozařování okolní, zdravé tkáně, případně i izotopy diagnostické. To umožňuje zvýšit efektivitu léčby, případně provádět další vyšetření v průběhu léčby. Obecně se za nejlepší terapeutické izotopy považují Alfa zářiče, pro svůj obrovský destrukční potenciál a nízkou penetraci tkáně, ale v praxi jsou využívány zejména Beta mínus zářiče s nízkou energií kvůli své lepší dostupnosti.

Jak terapeutické, tak i diagnostické aplikace radioaktivních kovů mají jednu nezanedbatelnou výhodu. Množství použitého zářiče je většinou velmi nízké a tím pádem velmi hluboko pod mezí toxicity daného prvku, což dovoluje kov samotný považovat za neškodný.

2.6 Theranostika

Jako Theranostika – kombinace terapie a diagnostiky, se označuje obor, zabývající se vývojem a aplikací látek, schopných poskytovat jak diagnostický signál, tak i terapeutický efekt. Tohoto efektu lze docílit několika způsoby. Jedním z nich je použití dvou různých jader, kdy jedno funguje jako PET/SPECT/MRI jádro a druhé je terapeutické. Druhý způsob je využití jednoho jádra, které ve své rozpadové řadě obsahuje jádro vhodné jak pro terapii, tak i diagnózu. Dalším způsobem je pak použití izotopů, které mají obě vlastnosti současně. Často se lze setkat s pojmy theranostické jádro nebo theranostický pár. Jako theranostické jádro lze označit právě jádro, které ve své rozpadové řadě obsahuje terapeutický i diagnostický izotop nebo poskytuje oboje současně. Theranostickým párem je pak dvojice izotopů stejného prvku, kdy jeden izotop je terapeutický a druhý diagnostický. Do oblasti theranostiky se řadí i

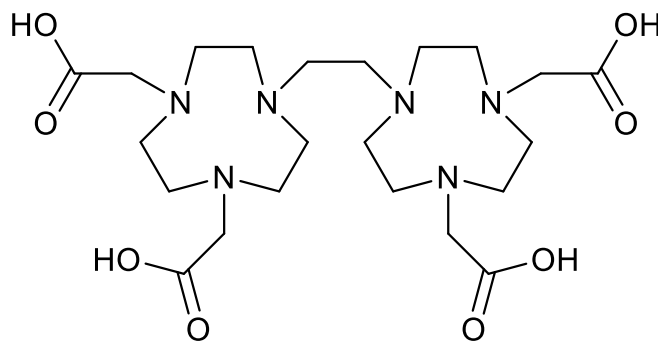
jednokavitové ligandy, které jsou schopny přenášet terapeutický nebo diagnostický izotop v závislosti na požadované aplikaci.

Izotopy využívané a zvažované pro teranostické aplikace, pro které je vhodné použití dusíkatých makrocyclických ligandů, jsou například: ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{177}Lu .

2.7 Dimerní makrocyclické ligandy

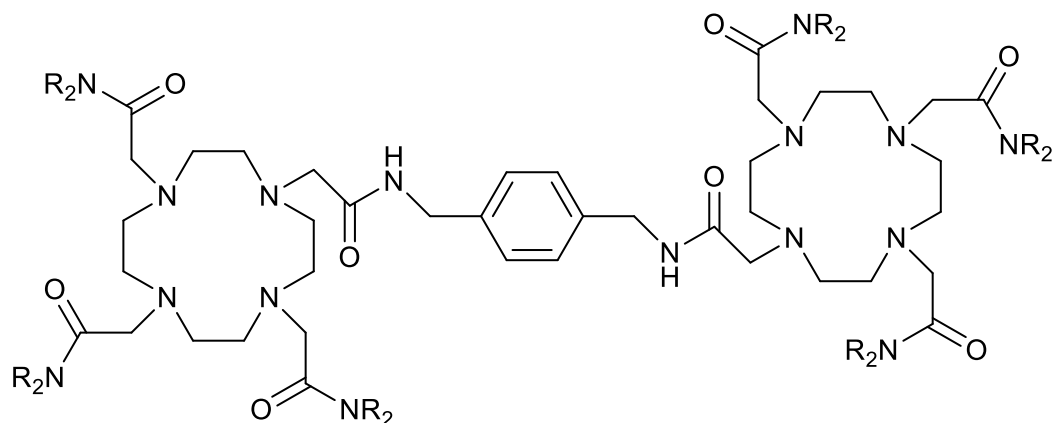
Jako dimerní makrocyclické ligandy jsou označovány látky, které obsahují dvě makrocyclické jednotky vhodné ke komplexaci požadovaných iontů, spojené většinou krátkým, ale také složitějším a delším linkerem. Tyto látky jsou zkoumány z hlediska celé řady možných aplikací. V případě MRI aplikací umožňuje použití linkeru zvýšení počtu koordinačních míst molekuly, čímž je možné zvednout intenzitu signálu. Přítomnost linkeru může dále ovlivňovat intenzitu signálu pomocí komplexace dalších iontů a ovlivnění hydratační sféry molekul.

Celá řada dimerních makrocyclických ligandů byla zkoumána jako potenciální MRI kontrastní látky. Propojení dvou kavit NO₂A krátkým linkerem (**Obrázek 10**) vykazuje, v případě komplexace Mn²⁺ vyšší relaxivitu oproti komplexovanému ligandu NOTA.¹⁶



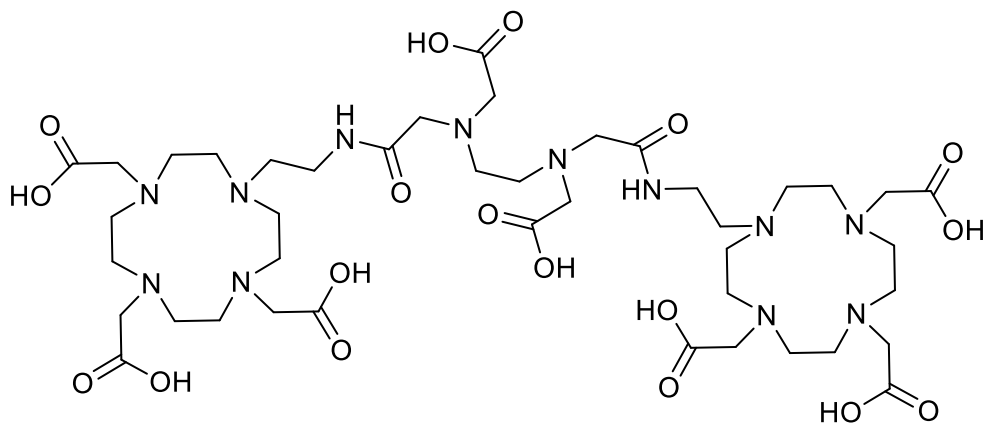
Obrázek 10 - Dvě kavity NO₂A spojené ethylenovým můstkem

Ligand, v němž jsou dva tetraamidy DOTA spojeny pomocí xylenového linkeru (**Obrázek 11**) opět vykazuje zvýšenou relaxivitu ve srovnání s monomerním tetraamidem DOTA.¹⁷



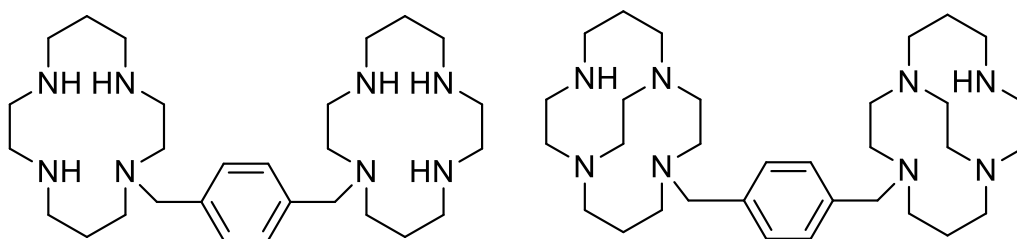
Obrázek 11 - Xylenem spojené kavity tetraamidu DOTA

Mimo krátkých a jednoduchých linkerů lze použít i složitější, komplexující linkery. Ukazuje se, že komplexace Ca^{2+} iontu pomocí DTPA, případně i jiných linkerů, spojujících dvě jednotky DO3A (**Obrázek 12**), vykazuje kontrastní látka vyšší relaxivitu, než bez komplexace Ca^{2+} . Toto chování lze vysvětlit změnou hydratace molekuly, která je způsobena právě komplexací Ca^{2+} .¹⁸



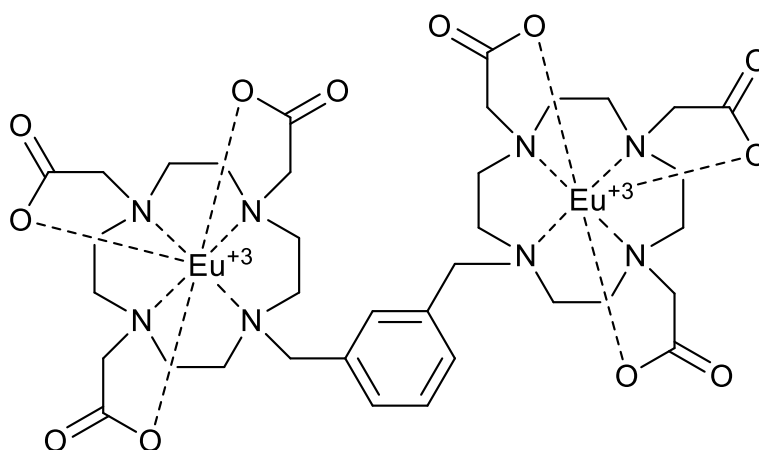
Obrázek 12 - Příklad dimerního makrocyclického ligandu se schopností vázat navíc Ca^{2+}

Látka nazvaná Plerixafor a její deriváty s vnitřními můstky (**Obrázek 13**), stejně tak i jejich komplexy s Cu^{2+} , Zn^{2+} a Ni^{2+} byly intenzivně zkoumány pro svou schopnost vázat se na CXCR4 chemokinový receptor, který je jednou ze vstupních cest viru HIV do buněk a který se také nachází na povrchu některých specifických metastatických buněk a jehož inhibicí by bylo možné zabránit usazování takovýchto metastáz.^{19,20}



Obrázek 13 - Ligand Plerixafor (vlevo) a jeho derivát s vnitřními můstky můstkem (vpravo)

Komplexy makrocyclických ligandů jsou obecně známé pro svou schopnost katalyticky štěpit RNA a DNA (Cleavage). Linkerem spojené kavity vykazují posílenou schopnost štěpení, což bývá připisováno jak vlivu linkeru, tak i vzájemné interakci spojených kavít.^{21–26} Jedním z komplexů s velmi vysokou schopností štěpit RNA a DNA je i ligand, pracovně označený jako BDO3A-*m*-X a jeho Eu^{3+} komplex (**Obrázek14**).

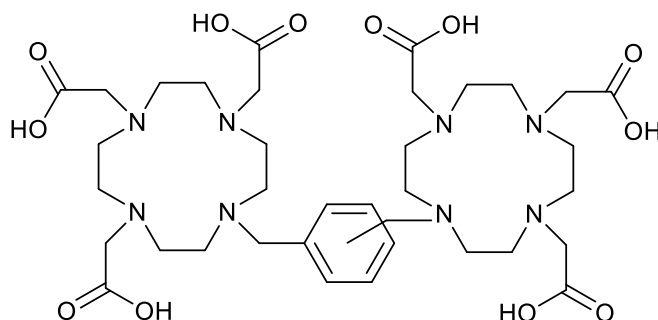


Obrázek 14 - Eu^{3+} komplex ligandu BDO3A-*m*-X

Dalším využitím takovýchto ligandů by mohly být theranostické aplikace. Správně navrženým ligandem by bylo možné dopravit na místo určení theranostický pár, více různých aktivních jader a jejich různé kombinace, třeba i s MRI kontrastní látkou.

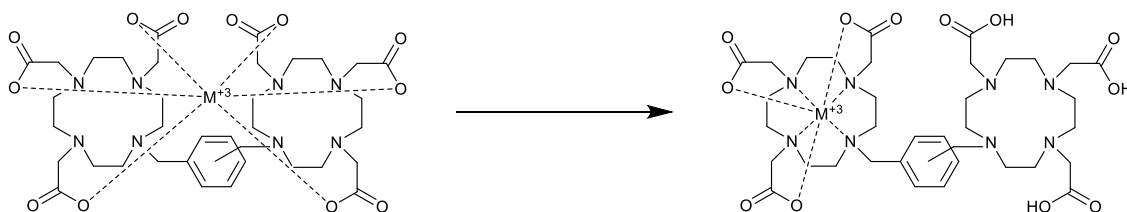
2.8 Cíle práce

Cílem této práce je syntéza a zkoumání dimerních makrocyclických ligandů BDO3A-*o/m/p-X*, tvořených dvěma kavitami DO3A spojenými ortho, meta nebo para xylenem (**Obrázek 15**).



Obrázek 15 - Ligandy BDO3A-*o/m/p-X*, znázorněny schématicky bez konkrétního umístění druhé vazby xylenu

Dimerní makrocyclické ligandy by teoreticky mohly s ionty kovů interagovat způsobem, který zahrnuje interakci obou kavit ligandu s jedním iontem kovu. Takovéto mechanismy interakce a komplexace by mohly umožnit specifickou komplexaci pouze jedné z kavit za pomoci změny pH a koncentrace iontů kovu. (**Obrázek 16**).



Obrázek 16 - Jeden z možných, odlišných mechanismů vzniku In-Cage komplexu z odlišných Out-of-Cage komplexů

Součástí práce je jak měření kinetiky vznikajících komplexů, tak i snaha ověřit, jestli pro tyto ligandy existuje odlišný komplexační mechanismus založený na vzájemné poloze kavit a znalosti mechanismu OOC a IC komplexace pro použité kavity DO3A.

3 Experimentální část

3.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

NMR spektra byla měřena na přístrojích Bruker Avance III HD 400 MHz a Varian Inova 400 MHz, dostupných na PřF UK v Praze. Všechna spektra byla měřena ve 5mm NMR kyvetách s použitím komerčních deuterovaných rozpouštědel CDCl_3 , D_2O a deuterovaného hydroxidu sodného NaOD. Pokud není uvedeno jinak, byla všechna spektra měřena při 25 °C.

3.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla měřena na PřF UK pomocí přístroje WATERS ACQUITY QDA. Pro přípravu vzorku a měření byla použita rozpouštědla z komerčních zdrojů v HPLC kvalitě.

3.3 Elementární analýza (EA)

Elementární analýza byla provedena na Ústavu organické chemie a biochemie v Praze pomocí automatického analyzátoru PERKIN ELMER 2400 II.

3.4 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna na hliníkových destičkách s nanosenou vrstvou silikagelu. Vzorky byly vyvíjeny mobilní fází v TLC celách a vyhodnocovány pomocí jodových par, Dragendorffova činidla a UV lampy.

3.5 Flash chromatografie

Flash chromatografie byla prováděna na přístroji Buchi SEPACORE® FLASH SYSTEMS X10/X50. Pro měření byl použit silikagel z komerčního zdroje v kvalitě Flash a rozpouštědla z komerčních zdrojů.

3.6 UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektra byla měřena pomocí jednopaprskového přístroje ANALYTIC JENA SPECORD 50 Plus.

Měření při konstantní vlnové délce, pro účely kinetických výpočtů, bylo prováděno pomocí přístroje WPA LIGHTWAVE II.

Vodné roztoky ligandů a CeCl_3 byly připraveny podle **Tabulky 1**. Roztok monomerního ligandu BnDO3A byl připraven ve dvojnásobné koncentraci, proto aby koncentrace koordinačních kavit v měřených roztocích byla pro všechna měření shodná bez úpravy objemů.

Tabulka 1 - Příprava roztoků ligandů a kovu pro UV/VIS měření

Roztok	V (ml)	m (mg)	c (mmol/l)
BDO3A- <i>p</i> -X	10,0	113,2	10
BDO3A- <i>m</i> -X	10,0	113,2	10
BnDO3A	5,0	43,6	20
$\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20,0	372,5	50

Zásobní vodný roztok pufru byl připraven podle **Tabulky 2**. pH pufr bylo upraveno na požadovanou hodnotu pomocí 1M HCl. Pufr byl rozdělen do 16 lahviček (20 ml) po 5 ml se škálou pH po 0,1.

Tabulka 2 - Příprava roztoků pufrů pro UV/VIS měření

Roztok	V (ml)	c_{DMP} (mol/l)	c_{Pip} (mol/l)	c_{DABCO} (mol/l)	pH
Pufr	100,0	0,20	0,20	0,20	3,8-5,4

Jako pufr, byl pro měření použit roztok o koncentraci 0,2 mol/l Dimethylpiperazinu, Piperazinu a DABCO. Třísložkový pufr byl zvolen po předchozích pokusech se třemi pufrů obsahujícími jednotlivé zmíněné složky, ale výsledky měření byly neinterpretovatelné. Bylo proto rozhodnuto o použití jednoho pufru obsahujícího všechny tři složky. Tyto složky byly zvoleny vzhledem k nutnosti použití málo koordinujících a nechelujících látek, neabsorbujících v oblasti 200–400 nm.

Všechna měření byla prováděna v 1cm křemenné kyvetě o objemu 1,0 ml. Měřený roztok byl připraven přímo v kyvetě a přídavek roztoku CeCl_3 byl proveden bezprostředně před měřením. Spektra byla měřena v rozsahu 200–400 nm při teplotě 50 °C, data pro výpočty kinetických měření byla měřena při 293 nm. Použitelnost rovnice pseudoprvního řádu pro výpočty rychlostních konstant (viz 3.1.7) byla zajištěna nadbytkem iontů Ce^{3+} .

Veškeré roztoky pro měření byly připraveny z konstantního objemu ligandu a příslušného pufru podle **Tabulky 3**. Objem použitého roztoku CeCl₃ a H₂O použitého k doplnění objemu roztoku na 1,00 ml byl různý v závislosti na požadovaném poměru. Pro jednotnost (a vzhledem ke dvojnásobné koncentraci ligandu BnDO3A), budou všechny uváděné poměry vztaženy ke koncentraci koordinačních kavit v roztoku, nikoliv ke koncentracím ligandů samotných. V takovémto případě pak 20 µl roztoku CeCl₃ odpovídá poměru 1:1.

Tabulka 3 - Konstantní objemy připravených roztoků, použité pro kinetická měření

Roztok	<i>V</i> (µl)	<i>c</i> (mmol/l)
BDO3A- <i>p(m)</i> -X	50,0	0,5
BnDO3A	50,0	1,0
Pufr	500,0	100,0 DABCO + 100,0 DMP + 100,0 Pip

3.7 Výpočet rychlostních konstant komplexace ligandů

Rychlostní konstanty byly vypočítány z dat naměřených pomocí UV/VIS spektrofotometrie v programu Scientist pomocí fitu rovnice pseudoprvního řádu, uvedené níže. Platnost této rovnice byla zajištěna použitím nadbytku iontů kovu v měřeném roztoku.

$$A = (A_0 - A_p) \times \exp(-k \times t) + A_p$$

3.8 Rentgenová strukturní analýza

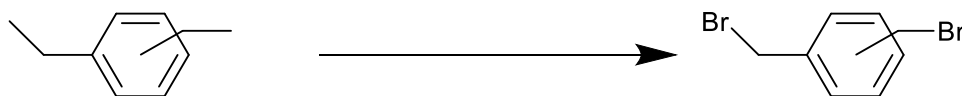
Strukturní data byla získána pomocí přístroje Nonius KAPPACCD vybaveného detektorem Bruker APEX-II CCD se zdrojem záření Mo-K_α (λ = 0,71073 Å) za teploty 150 K, které bylo dosaženo pomocí chlazení Cryostream Cooler, Oxford Cryosystem.

3.9 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie a rozpouštědla byly získány z komerčních zdrojů a před použitím nebyly dále čištěny. Ligand BnDO3A, použitý jako reference pro UV/VIS spektrofotometrická měření byl připraven dříve kolegou a byl získán od něj.

3.10 Syntéza

3.10.1 Dibromxyleny²⁷



Bylo naváženo a rozpuštěno 5,0 g (0,05 mol) příslušného xylenu a 18,0 g (0,10 mol) NBS v 50 ml CHCl₃ ve 250ml kulaté baňce. Reakce byla iniciována pomocí 0,25 g (1,2 mmol) 2-butanon peroxidu. Směs byla refluxována po dobu 5 hodin. Do vychladlé reakční směsi bylo přidáno 50 ml CH₂Cl₂. Směs byla v dělicí nálevce promyta 3×25 ml H₂O. Organická fáze byla převedena do 250ml baňky a vysušena pomocí Na₂SO₄. Následně bylo sušidlo odfiltrováno a rozpouštědlo odpařeno na RVO. Produkt byl překrystalován ze 75 ml horké směsi *n*-Hexan:EtOH (30:1) ochlazením. Bílý krystalický produkt byl odfiltrován na fritě a vysušen prosáváním vzduchu.

Výtěžky:

p-dibromxylen: 3,52 g (27 %)

o-dibromxylen: 2,96 g (22 %)

m-dibromxylen: 3,37 g (26 %)

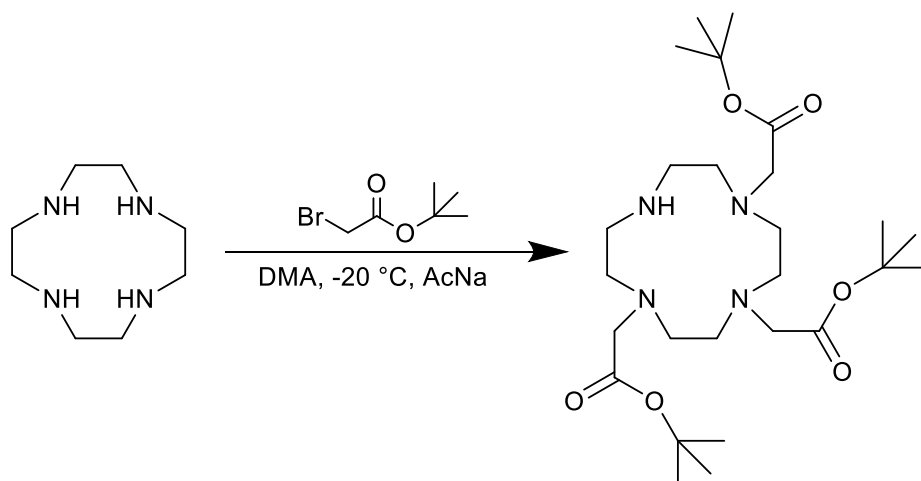
¹H NMR 400 MHz (CDCl₃):

p-dibromxylen: 4,50 (s, CH₂Br, 4H); 7,39 (s, CH_{Ar}, 4H)

o-dibromxylen: 4,69 (s, CH₂Br, 4H); 7,30–7,42 (bm, CH_{Ar}, 4H)

m-dibromxylen: 4,50 (s, CH₂Br, 4H); 7,35 (s, CH_{ar}, 2H); 7,45 (s, CH_{Ar}, 2H)

3.10.2 *t*-Bu₃DO3A·HBr²⁸

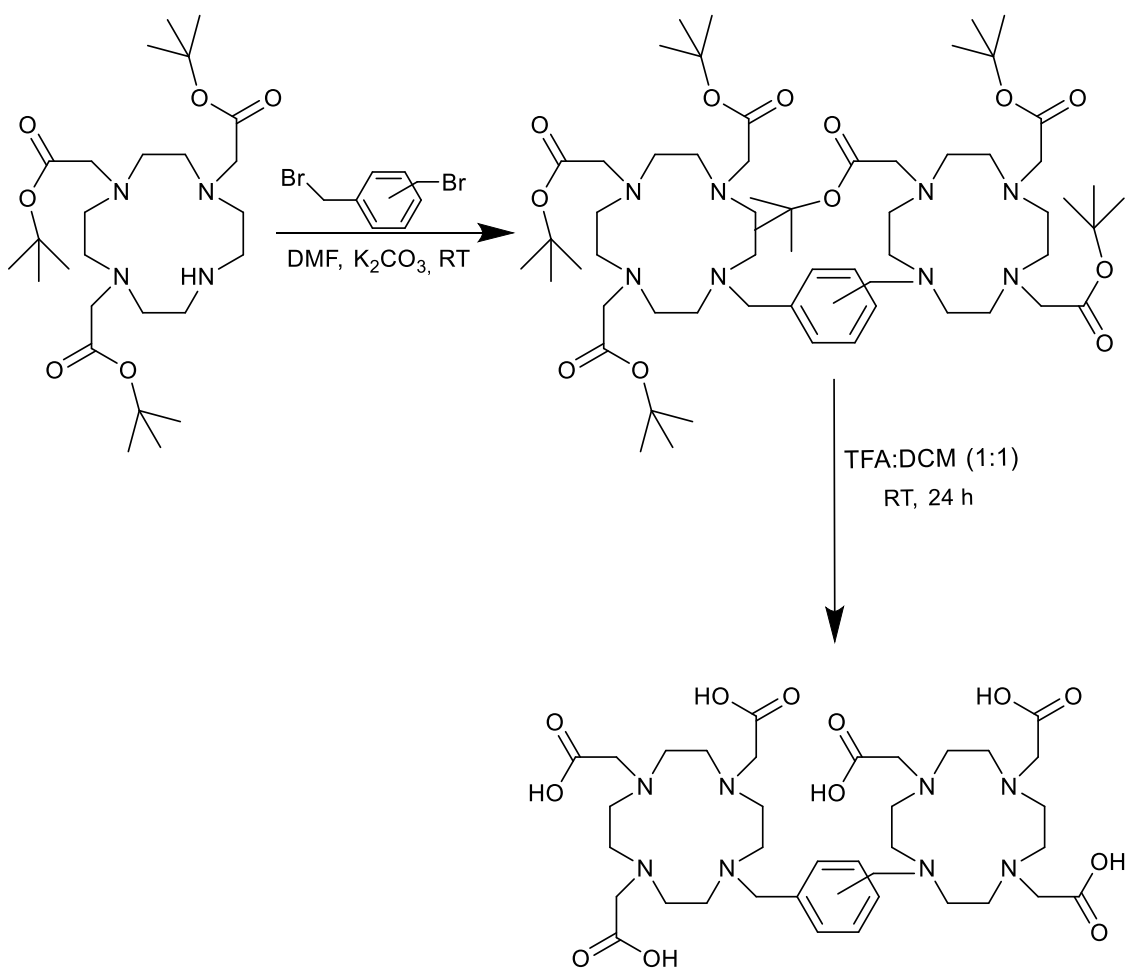


10,0 g (58 mmol) Cyklenu a 15,7 g (192 mmol) octanu sodného bylo odváženo do 500ml kulaté baňky a rozpuštěno ve 120 ml DMA (dimethylacetamid). Směs byla ochlazená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v ethanolové lázni se suchým ledem. Za stálého míchání bylo pomocí přikapávací nálevky v průběhu jedné hodiny přidáno 37,4 g (28,2 ml; 192 mmol) *t*-butylbromoacetátu, rozpuštěného ve 40 ml DMA. Následně byla reakční směs 24 h míchána za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs vlita do 600 ml destilované vody. Naředěná reakční směs byla neutralizována postupným přidávkem 30 g KHCO₃ (300 mmol), při čemž se vysrážel žádaný produkt. Sraženina byla odfiltrována na fritě a rozpuštěna v 500 ml CHCl₃. Vzniklý roztok byl v dělicí nálevce promyt 200 ml destilované vody a organická frakce byla poté vysušena pomocí bezvodého MgSO₄. Po odfiltrování sušidla byla organická frakce zahuštěna na RVO na 50 ml a výsledný produkt byl vysrážen přidávkem 500 ml etheru jako jemná, bílá sraženina. Ta byla následně odfiltrována, promyta etherem a vysušena prosáváním vzduchu. Výtěžek reakce činil 27,2 g, což odpovídá 79 %.

¹H NMR 400 MHz (CDCl₃): 1,43 (s, *t*-But CH₃, 18H); 1,49 (s, *t*-But CH₃, 9H); 2,67–2,93 (bm, NH-CH₂, 4H); 3,15–3,60 (bm, N-CH₂, 12H); 3,69–3,93 (bm, N-CH₂, 2H); 4,22–4,52 (bm, N-CH₂, 4H)

¹³C NMR 125 MHz (CDCl₃): 28,17; 28,20; 47,53; 48,80; 49,17; 51,22; 51,31; 58,15; 81,63; 81,80; 169,61; 170,49

3.10.3 BDO3A-*p(m)*-X²⁹



5,0 g (8,4 mmol) hydrobromidu *t*-Bu₃DO3A bylo rozpuštěno ve 80 ml DMF (dimethylformamid) společně s 5,0 g (36 mmol) K₂CO₃. Ke vzniklé směsi bylo, za stálého míchání, postupně přidáno 1,2 g (4,5 mmol) příslušného dibromxylynu, rozpuštěného ve 20 ml DMF. Směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 7 dnů. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC chromatografie na sílice, jako mobilní fáze byla použita směs CHCl₃:EtOH (5:1) (*r*_f = 0,8). Následně bylo do reakční směsi přidáno aktivní uhlí a směs byla přefiltrována. Roztok zbavený pevných nečistot byl poté odpařen na oranžový olej vylučující bezbarvé krystaly. Získaná směs byla rozpuštěna ve 20 ml CHCl₃. Produkt byl z roztoku získán pomocí Flash chromatografie na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit CHCl₃ s gradientem EtOH, rostoucím od čistého CHCl₃ až po směs 1:1. Frakce obsahující produkt byly identifikovány pomocí UV/VIS

spektroskopie při 254 nm. Přítomnost žádaného produktu byla dále ověřena pomocí ESI-MS ($m/z = 1132$). Frakce obsahující produkt byly společně odpařeny na lehce nažloutlý olej.

Produkt získaný v předchozím kroku syntézy byl zbaven *t*-butylových chránících skupin pomocí roztoku TFA (kyselina trifluoroctová) v DCM (dichlormethan) v poměru 1:1. K ochránění produktu bylo použito 10 ml směsi na 1,0 g produktu. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. Následující den byla směs odpařena do sucha a následně rozpuštěna a odpařena se 3 × 20 ml DCM a 3 × 20 ml MeOH. Produkt byl následně vyčištěn od zbytkové CF₃COOH nanesením na Dowex 1, který byl promyt vodou. Produkt byl z iontoměniče vymyt pomocí 5% HCl. Po odpaření získaného roztoku byl získán produkt ve formě jemného bílého prášku. Celkem bylo získáno 2,1 g (1,8 mmol) BDO3A-*m*-X (22 % vzhledem k navážce *t*-Bu₃DO3A v předchozím kroku) a 2,8 g (2,4 mmol) BDO3A-*p*-X (29 % vzhledem k navážce *t*-Bu₃DO3A v předchozím kroku). Produkty byly charakterizovány pomocí ¹H NMR a pomocí HCN+Cl elementární analýzy. V případě ligandu BDO3A-*p*-X se podařilo vypěstovat monokrystal difuzí methanolu do vodného roztoku ligandu a následně stanovit strukturu ligandu v pevné fázi pomocí RTG. Stejným způsobem se podařilo vypěstovat krystaly ligandu BDO3A-*m*-X, ale struktura změřena nebyla.

¹H NMR 400 MHz (D₂O + NaOD)

BDO3A-*p*-X: 3,56–3,64 (bm, N-CH₂, 8H); 3,74–3,88 (bm, N-CH₂, 16H); 3,88–3,94 (bm, N-CH₂, 12H); 3,98 (s, N-CH₂, 8H); 4,14 (s, N-CH₂, 4H); 4,58 (s, N-CH₂, 4H); 8,07 (s, CH_{Ar}, 4H)

BDO3A-*m*-X: 3,18 (s, N-CH₂, 4H); 3,58–3,66 (bm, N-CH₂, 8H); 3,72–3,84 (bm, N-CH₂, 16H); 3,86–3,94 (bm, N-CH₂, 8H); 3,96–4,02 (bm, N-CH₂, 8H); 4,62 (s, CH₂-C_{Ar}, 4H); 8,01 (bs, CH_{Ar}, 3H); 8,23 (s, CH_{Ar}, 1H)

EA

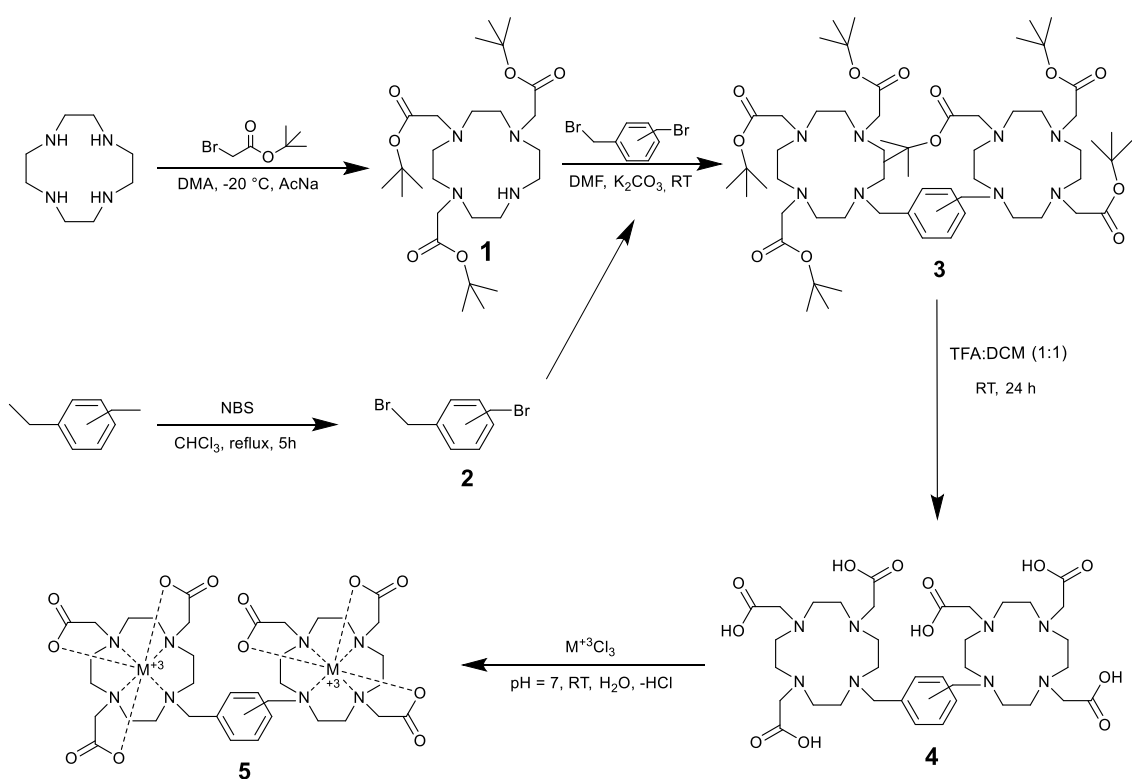
BDO3A-*p*-X: (C₃₆H₅₈N₈O₁₂·5HCl·9H₂O) C 38,0 (37,95), H 6,50 (7,17), N 9,60 (9,83), Cl 15,8 (15,56), O 30,10 (29,49)

BDO3A-*m*-X: (C₃₆H₅₈N₈O₁₂·4HCl·12H₂O) C 37,20 (37,34), H 6,10 (7,57), N 9,40 (9,68), Cl 11,80 (12,25), O 35,50 (33,16)

3.10.4 Komplexy

10 mg (9 μmol) ligandu BDO3A-*p*-X nebo BDO3A-*m*-X bylo rozpuštěno v 0,5 ml vody ve 4ml vialkách. K roztokům bylo přidáno 1,0 ml roztoku CeCl_3 (50 mmol/l). Do roztoků byla vložena pH elektroda a pH roztoků bylo upraveno pomalým přidáváním 5% roztoku NaOH na hodnotu pH = 5. Po 30 minutách bylo přidávkem NaOH pH zvýšeno na hodnotu pH = 8. Roztoky byly zfiltrovány s aktivním uhlím přes vatou vloženou do skleněné pipety. Takto připravené roztoky komplexu byly použity ke krystalizaci difuzí methanolem.

3.11 Diskuse syntézy



Obrázek 17 - Kompletní schéma syntézy ligandů BDO3A-*p*(*m*)-X

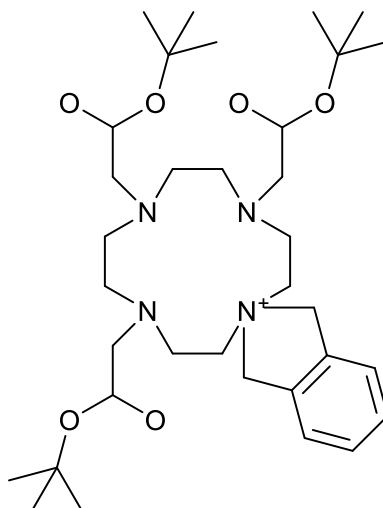
Látka *t*- $\text{Bu}_3\text{DO3A}$ (**1**) byla připravena přesně podle publikovaného návodu²⁸, jedná se o mnohokrát ověřený postup, poskytující konzistentní a vysoké výtěžky. K roztoku Cyklenu v DMA, ochlazeném na -20 °C byl pomalu, za stálého chlazení přikapáván mírný nadbytek *t*-butylbromoacetátu. Po ukončení přidavku byl roztok ponechán 24 h míchat za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs vlita do ledové vody a neutralizována KHCO_3 . Získaná sraženina byla odfiltrována, rozpuštěna

v CHCl_3 a nečistoty byly vymyty extrakcí do vody. Produkt ve formě lehké a objemné sraženiny byl z vysušené organické fáze získán srážením pomocí etheru. Neutralizace reakční směsi pomocí KHCO_3 probíhá velmi bouřlivě a je nutné jej přidávat po malém množství, aby se zabránilo překypění a ztrátám produktu. Žádaná látka $t\text{-Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ vzniká přednostně, jelikož poslední nesubstituovaný aminový atom dusíku reaguje výrazně pomaleji a tím je výrazně omezen vznik vedlejšího produktu $t\text{-Bu}_4\text{DOTA}$ i při mírném nadbytku t -butylbromoacetátu a vznik $t\text{-Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ je naopak tímto nadbytkem omezen. Takto připravená $t\text{-Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ je hydrobromid ve formě bílého prášku, na vzduchu stálá. Čistota získané látky byla ověřena pomocí $^1\text{HNMR}$.

Dibromované xyleny (**2**) byly připraveny reakcí příslušného xylenu s nadbytkem NBS v CHCl_3 za zvýšené teploty.²⁷ Reakce byla iniciována pomocí 2-butanon peroxidu, ale v principu může být použita jakákoliv látka schopná odštěpení volného radikálu nebo UV záření. Dibromované xyleny jsou na vzduchu a světle nestabilní látky, které podléhají pomalému rozkladu. Je tudíž vhodné pracovat vždy s čerstvě vykrystalizovaným produktem. Během opakované přípravy produktu bylo zjištěno, že se část produktů v horké krystalizační směsi nerozpouští. Rozpuštění bylo nakonec dosaženo přidáním malého množství EtOH. Produkty této krystalizace však poskytovaly nižší výtěžky v následujících reakcích. Opakovaným naměřením $^1\text{HNMR}$ produktů těchto krystalizací bylo zjištěno, že se jedná o směs požadovaných produktů a succinimidu, který vzniká v reakční směsi po debromaci NBS. Signál succinimidu byl původně chybně určen jako signál H_2O . Succinimidu se dá částečně zbavit filtrací horké filtrační směsi od špatně rozpustných zbytků, případně i důkladnějším promytím reakční směsi vodou. Ačkoliv přítomnost succinimidu nebrání další reakci, větší množství succinimidu ve výsledném produktu (**2**) způsobuje problémy se stechiometrií v dalším kroku, kde je potřeba co nejpřesnější navážka reaktantů.

Látka (**3**) byla připravena reakcí dvou ekvivalentů $t\text{-Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ (**1**) s jedním ekvivalentem příslušného dibromovaného xylenu (**2**). Byly zkoumány dvě varianty přípravy. První variantou, uvedenou v literatuře²⁹ bylo použití MeCN jako rozpouštědla, NaHCO_3 jako báze a 48h refluxu. Pomocí těchto reakčních podmínek se sice podařilo meziprodukt (**3**) připravit, avšak nakonec byly zvoleny podmínky jiné. Nahrazením MeCN za DMF a NaHCO_3 za K_2CO_3 byly nastaveny reakční podmínky, které

umožňovaly velmi rychlou reakci již při laboratorní teplotě. Ačkoliv byla reakční směs ponechána reagovat 7 dní, tak pokusné reakce ověřily, že reakce zcela proběhne již během hodin. Izolace produktu z reakční směsi se dlouhou dobu nedařila. Nejprve byla k čištění využita sloupcová chromatografie na silikagelu, avšak na rozdíl od TLC, kde se oddělení produktu od nečistot jevílo dostatečně efektivní, na sloupci docházelo k rozmývání a nedařilo se izolovat čistý produkt (**3**). Nakonec byla vyzkoušena metoda Flash, kde se produkt podařilo vyčistit. V literatuře²⁹ popisované čištění na alumině zkoušeno nebylo. Touto cestou se podařilo připravit meziprodukt (**3**) s meta i para xylenem, ale s ortho xylenem nikoliv. Zběžná analýza reakčních směsí pomocí MS neukázala přítomnost žádaného meziproduktu ($m/z = 1132$) a to pro žádné z popsaných, použitých reakčních podmínek. Podařilo se však určit, že reakce probíhá pouze do prvního stupně, což může mít dvě příčiny. Jednou z příčin může být sterická nemožnost navázání dvou *t*-Bu₃DO3A fragmentů na *o*-xylen, další příčinou může být kvarternizace sekundárního aminu *t*-Bu₃DO3A a navázáním obou ramen *o*-xylenu k jednomu dusíkovému atomu makrocyklu (**Obrázek 18**). Ať už byl důvod jakýkoliv, nebyly provedeny další pokusy o syntézu ligandu pomocí *o*-xylenu a vedlejší produkty nebyly dále zkoumány.



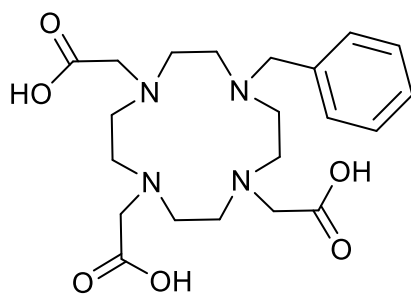
Obrázek 18 - Kvarternizace prekurzoru *t*-Bu₃DO3A s *o*-xylenem, jako jeden z možných důvodů, zabraňujících vzniku žádaného produktu

Žádané ligandy BDO3A-*p(m)*-X (4) byly z vyčištěných meziproduktů (3) připraveny odtržením *t*-butylových chránících skupin pomocí směsi CF₃COOH:DCM (1:1). Jedná se o kvantitativní reakci, avšak výsledné produkty váží CF₃COOH, které je vhodné se zbavit. Několikanásobné odpaření produktů s DCM a MeOH není pro odstranění CF₃COOH dostatečně efektivní. Pomocí několikanásobného rozpuštění produktů v koncentrované HCl a následného odpaření se také nepodařilo odstranit veškerou CF₃COOH. Pro úplné odstranění CF₃COOH bylo potřeba použít iontoměnič Dowex 1.

Komplexy obou připravených ligandů (5) byly připraveny a vyčištěny od mechanických nečistot a nadbytku iontů kovů. Bylo provedeno několik různých pokusů tyto komplexy izolovat v pevném stavu ve formě monokrystalů, avšak vždy se z roztoku vyloučila olejovitá látka, nevhodná pro další analýzu. Strukturu v pevné fázi se tak nepodařilo zjistit ani pro jeden Ce³⁺ komplex zkoumaných ligandů.

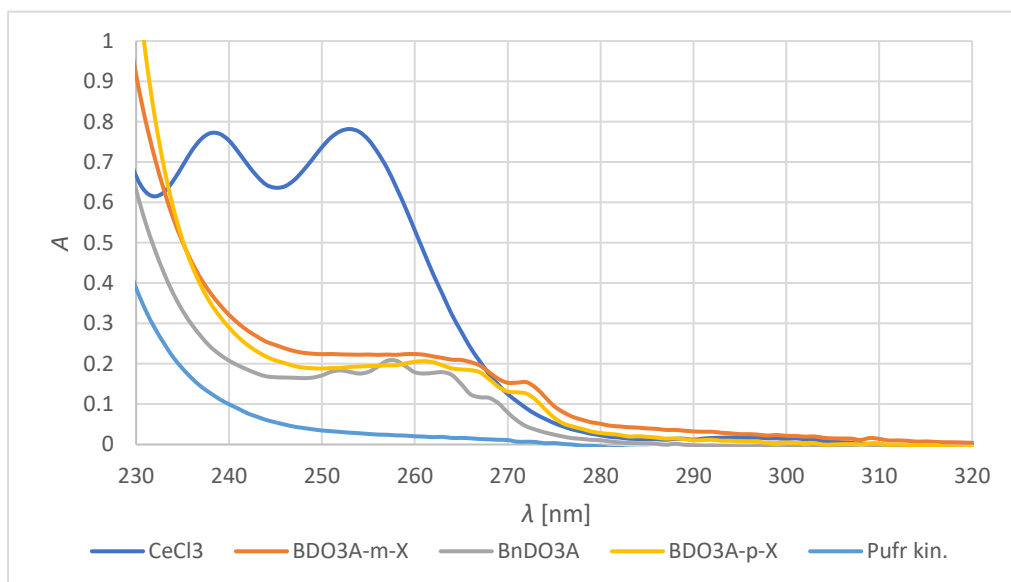
3.12 UV/VIS měření – Výsledky a diskuse

Připravené ligandy BDO3A-*p*-X a BDO3A-*m*-X byly zkoumány pomocí UV/VIS spektrofotometrie. Jako referenční látka byl využit ligand BnDO3A (Obrázek 19).



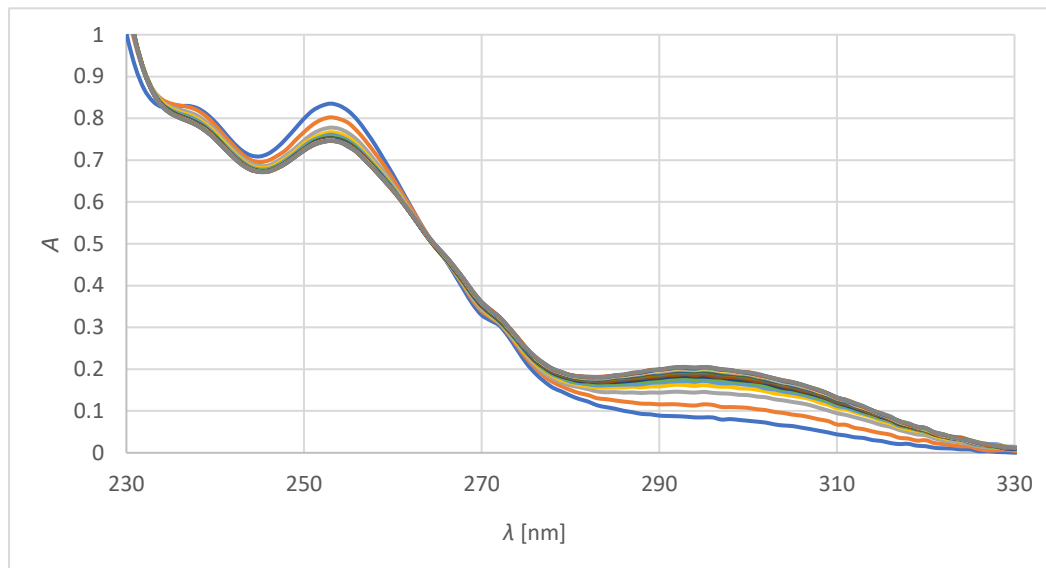
*Obrázek 19 - Ligand DO3A, použitý jako reference při kinetických měřeních ligandů BDO3A-*p*-X a BDO3A-*m*-X*

Pomocí UV/VIS spektrofotometrie byly proměřeny všechny roztoky použité pro další měření, v rozmezí 200–400 nm. V grafu na **Obrázku 20** jsou vynesena absorpční spektra volných látek v rozmezí 230–320 nm.



Obrázek 20 - Absorpční spektra jednotlivých složek měřených roztoků při 50 °C v koncentracích a za podmínek použitých pro kinetická měření. $c_{\text{CeCl}_3} = 10 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{BDO3A-m-X}} = 0,5 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{BDO3A-p-X}} = 0,5 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{BnDO3A}} = 1 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{Pufr}} = 0,1 \text{ mol/l DABCO} + 0,1 \text{ mol/l DMP} + 0,1 \text{ mol/l Pip}$

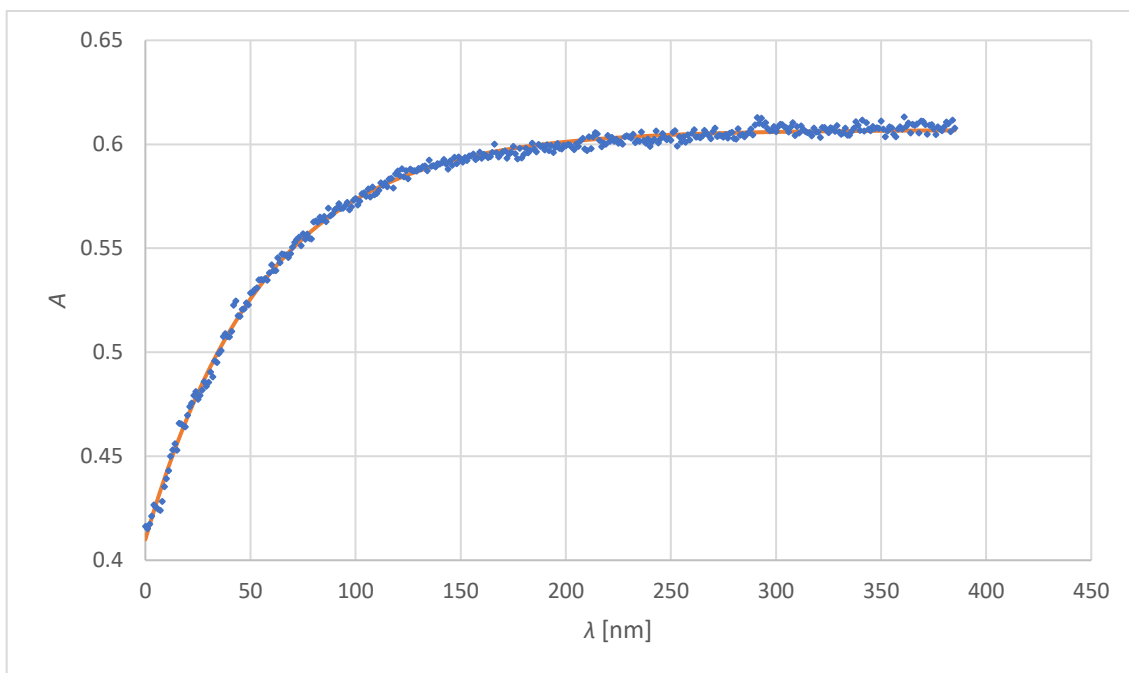
Pro každý ze zkoumaných ligandů byla změřena změna absorbance v průběhu komplexace s CeCl_3 v poměru 1:1 při $\text{pH} = 4,6$. V grafu na **Obrázku 21** jsou vyobrazena tato spektra pro ligand BDO3A-m-X .



Obrázek 21 - Změna absorpce roztoku ligandu BDO3A-m-X při komplexaci Ce^{3+} iontů v poměru 1:1 při 50 °C, měřená v intervalu 60 s. Absorbance v oblasti 300 nm s časem roste. $c_{\text{CeCl}_3} = 1 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{BDO3A-m-X}} = 0,5 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{Pufr}} = 0,1 \text{ mol/l DABCO} + 0,1 \text{ mol/l DMP} + 0,1 \text{ mol/l Pip}$

Ihned po přípravě reakční směsi by mělo dojít ke kvantitativnímu vzniku Out-of-Cage komplexu s předpokládaným maximem absorpce při 260–280 nm. Pokud je tento intermediární komplex dostatečně stabilní, měl by být jeho úbytek ve prospěch In-Cage komplexu pozorovatelný. Avšak z důvodu nízké absorpce, malého množství vznikajícího Out-of-Cage komplexu nebo překrytí absorpčního pásu aditivní absorpce hydratovaného Ce^{3+} iontu s benzylovou skupinou ligandu, je pozorovatelný pouze minimální projev Out-of-Cage komplexu v počátku komplexace při 273 nm.

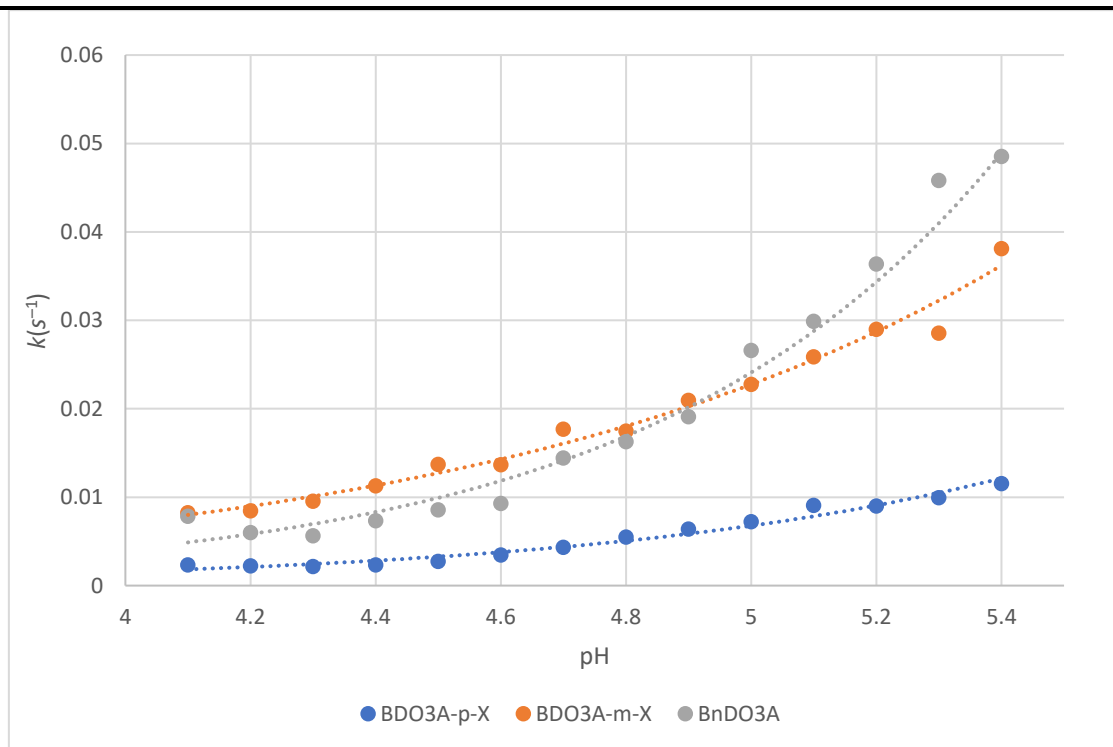
UV/VIS spektrofotometrií byla naměřena série dat a proložením pomocí rovnice pseudoprvního řádu (**Obrázek 22**) byly vypočteny experimentální hodnoty rychlostních konstant komplexace ligandů BDO3A-*p*-X, BDO3A-*m*-X a BnDO3A s Ce^{3+} ionty v poměru 10:1. Hodnoty vypočtených konstant pro jednotlivé hodnoty pH jsou uvedeny v **Tabulce 4** a vyneseny v grafu na **Obrázku 23** včetně proložení exponenciální rovnicí, kterou by se závislost na pH měla řídit, vzhledem k bazické katalýze In-Cage komplexace.



Obrázek 22 – Příklad proložení experimentálních dat pomocí rovnice pseudoprvního řádu pro ligand BDO3A-*m*-X a $\text{pH} = 4,7$. $c_{\text{CeCl}_3} = 10 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{BDO3A-}m\text{-X}} = 0,5 \text{ mmol/l}$; $c_{\text{Pip}} = 0,1 \text{ mol/l}$ DABCO + $0,1 \text{ mol/l}$ DMP + $0,1 \text{ mol/l}$ Pip; $50 \text{ }^\circ\text{C}$

Tabulka 4 - Rychlostní konstanty k (s^{-1}) pro různé hodnoty pH, vypočtené pro všechny zkoumané ligandy při teplotě 50 °C.

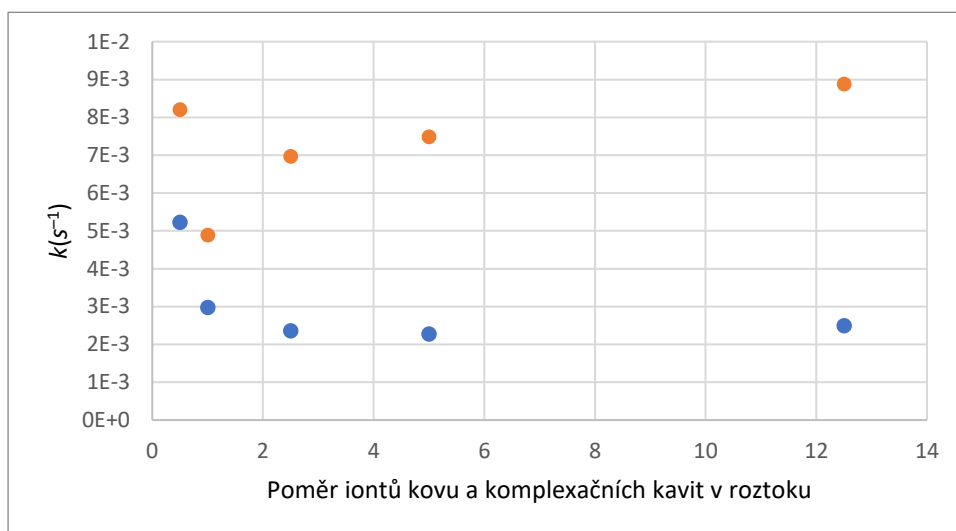
pH	BDO3A- <i>p</i> -X	BDO3A- <i>m</i> -X	BnDO3A
4,1	$236 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-5}$	$824 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-5}$	$785 \times 10^{-5} \pm 29 \times 10^{-5}$
4,2	$225 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-5}$	$848 \times 10^{-5} \pm 7 \times 10^{-5}$	$598 \times 10^{-5} \pm 21 \times 10^{-5}$
4,3	$215 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-5}$	$956 \times 10^{-5} \pm 12 \times 10^{-5}$	$562 \times 10^{-5} \pm 17 \times 10^{-5}$
4,4	$235 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-5}$	$1130 \times 10^{-5} \pm 18 \times 10^{-5}$	$734 \times 10^{-5} \pm 22 \times 10^{-5}$
4,5	$273 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-5}$	$1373 \times 10^{-5} \pm 27 \times 10^{-5}$	$859 \times 10^{-5} \pm 28 \times 10^{-5}$
4,6	$335 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-5}$	$1368 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-5}$	$929 \times 10^{-5} \pm 25 \times 10^{-5}$
4,7	$434 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-5}$	$1770 \times 10^{-5} \pm 11 \times 10^{-5}$	$1445 \times 10^{-5} \pm 12 \times 10^{-5}$
4,8	$549 \times 10^{-5} \pm 4 \times 10^{-5}$	$1749 \times 10^{-5} \pm 21 \times 10^{-5}$	$1628 \times 10^{-5} \pm 29 \times 10^{-5}$
4,9	$638 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-5}$	$2094 \times 10^{-5} \pm 21 \times 10^{-5}$	$1911 \times 10^{-5} \pm 27 \times 10^{-5}$
5,0	$723 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-5}$	$2278 \times 10^{-5} \pm 25 \times 10^{-5}$	$2662 \times 10^{-5} \pm 36 \times 10^{-5}$
5,1	$909 \times 10^{-5} \pm 6 \times 10^{-5}$	$2856 \times 10^{-5} \pm 41 \times 10^{-5}$	$2990 \times 10^{-5} \pm 31 \times 10^{-5}$
5,2	$902 \times 10^{-5} \pm 7 \times 10^{-5}$	$2898 \times 10^{-5} \pm 43 \times 10^{-5}$	$3636 \times 10^{-5} \pm 42 \times 10^{-5}$
5,3	$996 \times 10^{-5} \pm 7 \times 10^{-5}$	$2856 \times 10^{-5} \pm 36 \times 10^{-5}$	$4584 \times 10^{-5} \pm 58 \times 10^{-5}$
5,4	$1155 \times 10^{-5} \pm 17 \times 10^{-5}$	$3812 \times 10^{-5} \pm 72 \times 10^{-5}$	$4855 \times 10^{-5} \pm 75 \times 10^{-5}$



Obrázek 23 - Experimentálně vypočtené rychlostní konstanty zkoumaných ligandů v závislosti na pH, proložené exponenciální rovnicí, 50 °C

Z naměřených rychlostních konstant je patrné, že ligand BDO3A-*p*-X komplexuje ve srovnání s ligandy BnDO3A a BDO3A-*m*-X pomaleji. Závislost rychlosti komplexace na pH se u ligandu BnDO3A projevuje výrazněji, než u ligandů BDO3A-*m*-X a BDO3A-*p*-X. Pro rychlost komplexace dvoukavitových ligandů mohou hrát významnou roli sterické podmínky, vzájemná poloha a interakce kavit mezi sebou i s iontem kovu. V případě, že by spolu kavity ligandů nijak neinteragovaly, podléhaly by všechny tři zkoumané ligandy stejnému trendu. Tento závěr podporuje i patrný rozdíl rychlosti komplexace ligandů BDO3A-*m*-X a BDO3A-*p*-X.

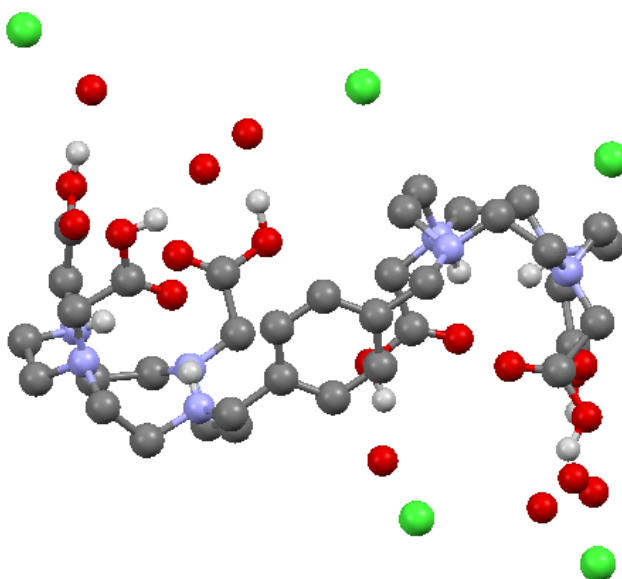
Dále byly ligandy BDO3A-*m*-X a BDO3A-*p*-X zkoumány z hlediska vlivu poměru Ce^{3+} iontů na hodnotu experimentální rychlostní konstanty k . Pro oba zmíněné ligandy byla naměřena data pro poměry 0,5, 1, 2,5, 5 a 12,5 ku 1. Vypočtené hodnoty rychlostní konstanty jsou uvedeny v grafu na **Obrázku 24**. Stejná data pro BnDO3A změřena nebyla.



Obrázek 24 - Rychlostní konstanty komplexace připravených ligandů pro různé poměry Ce^{3+} iontů v roztoku, 50 °C

Z vypočtených hodnot rychlostních konstant v **Obrázku 24** je patrná odlišnost chování obou ligandů s rostoucím poměrem Ce^{3+} iontů v roztoku. Ligand BDO3A-*p*-X vykazuje s rostoucím poměrem Ce^{3+} iontů v roztoku pokles rychlostní konstanty. Ligand BDO3A-*m*-X vykazuje tento pokles pouze při poměrech 0,5:1 a 1:1. V poměrech odpovídajících nadbytku iontů Ce^{3+} je patrný mírný nárůst rychlosti komplexace. Toto chování může být důsledkem různé stability Out-of-Cage komplexů a různých interakcí kavit ligandu.

3.13 Rentgenová strukturní analýza



Obrázek 25 - Struktura ligandu BDO3A-*p*-X v pevné fázi. Ligand byl krystalizován difuzí ethanolu do vodného roztoku ligandu

Sloučenina	BDO3A- <i>p</i> -X
Vzorec	C ₃₆ H ₇₄ Cl ₄ N ₈ O ₁₈
M_r	1048,83
Barva	Bezbarvý
Tvar	Prisma
Krystalová soustava	Triklinická
Prostorová grupa	P-1
a [Å]	12,1415(8)
b [Å]	16,0250(11)
c [Å]	16,3571(11)
α [°]	90,070(2)
β [°]	109,017(2)
γ [°]	109,638(2)
V [Å ³]	2811,9(3)
Z	2
ρ [g·cm ⁻³]	1,239
μ [mm ⁻¹]	0,278
Difrakcí celkem	12893
Intenz. difrakcí [$I > 2\sigma(I)$]	12185
R	0,1078
R' [$I > 2\sigma(I)$]	0,1053
wR	0,3010
wR' [$I > 2\sigma(I)$]	0,2992

V pevné fázi se ligand BDO3A-*p*-X (**Obrázek 25**) vyskytuje jako hexahydrát, tetrahydrochlorid. Dvě kavity DO3A, navázané na xylenovém můstku jsou proti sobě otočeny o 180 °, ale nalézají se na stejné straně aromatického kruhu. Mezi jednotlivými kavitami není patrná žádná interakce na základě vodíkových vazeb.

4 Závěr

Byly připraveny ligandy BDO3A-*m*-X a BDO3A-*p*-X. tyto ligandy byly charakterizovány pomocí NMR, MS, EA a v případě BDO3A-*p*-X pomocí rentgenové strukturní analýzy. Krystaly ligandu BDO3A-*m*-X byly připraveny, ale z technických důvodů nebyla určena struktura ligandu v pevné fázi. Dále byly připraveny komplexy těchto ligandů s Ce³⁺ ionty, u kterých se však strukturu v pevné fázi určit nepodařilo. Oba připravené ligandy a referenční ligand BnDO3A byly podrobeny sérii UV/VIS spektrofotometrických experimentů za účelem odhalení mechanismu vzniku Out-of-Cage komplexů, avšak vzhledem k vlnové délce, při které jsou tyto komplexy pozorovatelné a jejich překryvu s absorpčními pásy benzylových skupin ligandu, nebylo možné jednoznačně určit vznik odlišných Out-of-cage komplexů. Dále byly všechny tři ligandy podrobeny sérii UV/VIS měření za účelem určení rychlostních konstant komplexace s Ce³⁺ ionty a závislosti rychlosti komplexace na pH. Pomocí těchto experimentů bylo zjištěno, že dvoukavitové ligandy BDO3A-*m*-X a BDO3A-*p*-X vykazují menší závislost rychlosti komplexace na pH ve srovnání se strukturně podobným monomerním ligandem BnDO3A. Toto chování může být vysvětleno sterickou nebo vazebnou interakcí kavit dvoukavitových ligandů (například vodíkové vazby mezi acetátovými rameny kavit nebo částečnou koordinací obou kavit k jednomu iontu kovu). Původně předpokládaný odlišný mechanismus Out-of-Cage komplexace se tímto sice nepodařilo ověřit, ale nedošlo ani k jednoznačnému vyvrácení. Srovnáním rychlostních konstant obou zkoumaných ligandů při různých poměrech Ce³⁺ bylo zjištěno, že se ligandy BDO3A-*m*-X a BDO3A-*p*-X chovají odlišně. Ligand BDO3A-*p*-X vykazuje snížení rychlosti komplexace se zvyšujícím se poměrem. Příčinou by mohla být nízká stabilita Out-of-Cage komplexů a vysoká rychlost výměny, ale i horší sterická dostupnost vnitřních kavit ligandu. Naopak v případě ligandu BDO3A-*m*-X je toto snížení patrné pouze v případě poměrů nižších, než stechiometrických a při vyšších poměrech je patrné opětovné zvýšení rychlosti komplexace. Příčinou by naopak mohla být vyšší sterická dostupnost vnitřní kavity a vyšší kompetice mezi molekulami ligandu.

5 Literatura

- 1 K. We, 5.11: Chelate and Macrocyclic Effects, <https://chem.libretexts.org/@go/page/188709>.
- 2 R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 3533–3539.
- 3 Y. Moiseev, Y. Ben-eliyahu, M. Audras, L. Berthon, P. Moisy, A. Bettelheim and I. Zilbermann, *J. Coord. Chem.*, 2016, **69**, 2895–2907.
- 4 E. M. Gale, P. Caravan, A. G. Rao, R. J. Mcdonald, M. Winfeld, R. J. Fleck and M. S. Gee, 2017, 507–521.
- 5 NMR kontrast, Bookmyscans.com/blog/contrast-scans-mri-ct/.
- 6 E. M. Agency, EMA ’ s final opinion confirms restrictions on use of linear gadolinium agents in body scans Recommendations conclude EMA ’ s scientific review of gadolinium deposition, <https://www.ema.europa.eu/en/news/emas-final-opinion-confirms-restrictions-use-linear-gadolinium-agents-body-scans>.
- 7 T. Grobner and F. C. Prischl, *Int. Soc. Nephrol.*, 2007, **72**, 260–264.
- 8 P. Marckmann, L. Skov, K. Rossen, A. Dupont, M. B. Damholt, J. G. Heaf and H. S. Thomsen, *Am. Soc. Nephrol.*, 2006, **17**, 2359–2362.
- 9 T. Kanda, T. Fukusato, M. Matsuda, K. Toyoda, H. Oba, T. Haruyama, K. Kitajima and S. Furui, *Radiology*.
- 10 K. A. Layne, P. I. Dargan, J. R. H. Archer and D. M. Wood, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2018, **84**, 2522–2534.
- 11 A. Gupta, P. Caravan, W. S. Price, C. Platas-iglesias and E. M. Gale, *Inorg. Chem.*, 2020, **59**, 6648–6678.
- 12 S. R. Cherry and S. Gambhir, *LIAR J.*, 2001, **42**, 219–232.
- 13 T. I. Kostelnik and C. Orvig, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 902–956.
- 14 K. Tanaka and K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 815–828.
- 15 P. A. Schubiger, R. Alberto and A. Smith, *Am. Chem. Soc.*, 1996, **7**, 165–179.

- 16 E. Balogh, Z. He, W. Hsieh and S. Liu, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 238–250.
- 17 T. Gunnlaugsson and A. J. Harte, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 1572–1579.
- 18 A. Mishra, P. Fousková, G. Angelovski, E. Balogh, A. K. Mishra, N. K. Logothetis and É. Tóth, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 1370–1381.
- 19 A. Khan, J. Greenman, S. J. Archibald, D. Cancer and C. Road, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 2257–2277.
- 20 Y. M. Li, Y. Pan, Y. Wei, X. Cheng, B. P. Zhou, M. Tan, X. Zhou, W. Xia, G. N. Hortobagyi, D. Yu and M. Hung, *Cancer Cell*, 2004, **6**, 459–469.
- 21 M. Subat, K. Woinaroschy, S. Anthofer, B. Malterer and B. Ko, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 4336–4356.
- 22 M. Subat, K. Woinaroschy, C. Gerstl, B. Sarkar, W. Kaim and B. Ko, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 4661–4668.
- 23 K. Nwe, C. M. Andolina and J. R. Morrow, *Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 14861–14871.
- 24 A. A. Neverov, C. T. Liu, S. E. Bunn, D. Edwards, C. J. White, S. A. Melnychuk and R. S. Brown, *Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6639–6649.
- 25 Z. Lu, C. T. Liu, A. A. Neverov and R. S. Brown, *Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 11642–11652.
- 26 E. Arturoni, C. Bazzicalupi, A. Bencini, C. Caltagirone, A. Danesi, A. Garau, C. Giorgi, V. Lippolis, B. Valtancoli, D. Chimica, V. Uni, S. Cagliari, C. Uni and S. S. V Bi, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 6551–6563.
- 27 X. Tan, P. Wang, S. Nian and G. Wang, *Chem. Pharm. Bull.*, 2014, **62**, 112–117.
- 28 B. Jagadish, G. L. Brickert-albrecht, G. S. Nichol and E. A. Mash, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 2058–2061.
- 29 S. J. A. Pope, A. M. Kenwright, A. Boote and S. Faulkner, *Dalt. Trans.*, 2003, 3780–3784.

Rád bych poděkoval vedoucímu své práce doc. RNDr. Vojtěchu Kubíčkovi, Ph.D. za vstřícný a profesionální přístup. Dále bych rád poděkoval celému osazenstvu laboratoře za přátelský přístup a ochotu pomoci, kdykoli to bylo potřeba. Velké díky patří mé rodině za bezmeznou podporu a trpělivost v průběhu celého mého studia.