

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Anorganická chemie

Studijní obor: Anorganická chemie



**Tereza Šrolerová**

Kontrastní látky pro měření pH pomocí magnetické rezonance

pH-probes for Magnetic Resonance Imaging

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2023

**Prohlášení:**

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

V Praze, 29. 08. 2023

Tereza Šrolerová

## Abstrakt

Makrocyclické ligandy jsou známy pro svou schopnost vázat paramagnetické ionty kovů lanthanoidů za vzniku kineticky inertních a termodynamicky stabilních komplexů, které lze využít jako kontrastní látky pro MRI.

Tato práce se zabývá studiem nových ligandů odvozených od známého ligandu H<sub>8</sub>DOTP – 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu se čtyřmi pendantními methylenfosfonátovými skupinami. Připravené nové deriváty obsahují dvě různé dvojice pendantních skupin, vždy vzájemně v protějších polohách makrocyccklu. Jednou z dvojic jsou skupiny methylenfosfonátové, druhou dvojicí jsou skupiny methylenfosfinátové s různými substituenty na atomu fosforu. Konkrétně se jedná o látku s P–H fosfinátovou skupinou (H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>H</sup>), fenylovou skupinou (H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>Ph</sup>) a trifluorethylovou skupinou (H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfc</sup>). V práci je popsána syntéza cílových látek, příprava jejich komplexů s paramagnetickými ionty Eu<sup>3+</sup> a Yb<sup>3+</sup> a jejich další studium pomocí NMR spektroskopie (pH NMR titrace a relaxometrická NMR měření).

Klíčová slova:

H<sub>4</sub>DOTA, H<sub>8</sub>DOTP, MRI, kontrastní látka, lanthanoidy, makrocyclické ligandy, paramagnetické komplexy

## Abstract

Macrocyclic ligands are known for their ability to bind paramagnetic lanthanide metal ions to form kinetically inert and thermodynamically stable complexes that can be used as contrast agents for MRI.

This thesis deals with the study of new ligands derived from the known parent ligand H<sub>8</sub>DOTP – 1,4,7,10-tetraazacyclododecane with four pendant methylenephosphonate groups. The prepared new derivatives contain two different pairs of pendant groups, always in opposite positions of the macrocycle. One of the pairs are methylenephosphonate groups, the other pair are methylenephosphinate groups with different substituents on the phosphorus atom. Specifically, it is a compound with a P–H phosphinate group (H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>H</sup>), a phenyl group (H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>Ph</sup>) and a trifluoroethyl group (H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfe</sup>). The thesis describes the synthesis of the target ligands, the preparation of their complexes with paramagnetic ions Eu<sup>3+</sup> and Yb<sup>3+</sup> and their further study using NMR spectroscopy (pH NMR titration and relaxometric NMR measurements).

Keywords:

H<sub>4</sub>DOTA, H<sub>8</sub>DOTP, MRI, contrast agent, lanthanides, macrocyclic ligands, paramagnetic complexes

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce prof. RNDr. Janu Kotkovi, Ph.D., za odborné vedení, ochotu, dobré rady, za množství času, který mi věnuje a za jeho nekonečný optimismus.

Děkuji Filipovi za měření NMR spekter a relaxačních časů, za veškeré jeho rady, dobrou náladu a všechny zalité čaje. Poděkování patří také všem ostatním v laboratoři, kteří tvořili příjemnou pracovní atmosféru a vždy ochotně pomohli.

Děkuji RNDr. Ivaně Císařové, CSc., za měření krystalových struktur.

A v neposlední řadě patří velké DĚKUJI mé rodině a všem blízkým, kteří mne podporují.

## Obsah

Abstrakt .....	3
Abstract.....	4
Poděkování .....	5
Seznam zkratk a symbolů .....	8
1. Úvod.....	10
1.1 Diagnostické zobrazovací metody .....	10
1.1.1 Princip nukleární magnetické rezonance (NMR) .....	11
1.1.2 Princip zobrazování magnetickou rezonancí (MRI).....	13
1.2 Design ligandů pro použití <i>in vivo</i> .....	16
1.2.1 H <sub>4</sub> DOTA a její analoga.....	18
1.3 NMR spektroskopie komplexů paramagnetických iontů kovů.....	23
2. Cíl práce .....	25
3. Experimentální část.....	26
3.1 Použité chemikálie .....	26
3.2 Metody charakterizace připravených látek .....	26
3.2.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	26
3.2.2 Hmotnostní spektrometrie MS .....	26
3.2.3 NMR .....	26
3.2.4 RTG strukturní analýza .....	27
3.3 Syntetická část .....	28
3.3.1 Příprava 1,7-bis(benzyloxykarbonyl)cyklenu (2).....	28
3.3.2 Příprava 1,7-bis {[diethoxyfosforyl]methyl}-4,10- bis(benzyloxykarbonyl)cyklenu (3) .....	28
3.3.3 Příprava H <sub>4</sub> DO2P (4).....	29
3.3.4 Příprava H <sub>6</sub> DO2P2P <sup>H</sup> (5).....	30
3.3.5 Příprava H <sub>6</sub> DO2P2P <sup>Ph</sup> (6).....	31
3.3.6 Příprava H <sub>6</sub> DO2P2P <sup>tfé</sup> (7).....	32
3.4 Příprava komplexů.....	33
3.5 NMR pH titrace .....	33
4. Výsledky a diskuze .....	34
4.1 Příprava H <sub>4</sub> DO2P (4).....	35
4.2 Příprava H <sub>6</sub> DO2P2P <sup>H</sup> (5).....	36

4.3	Příprava $H_6DO_2P_2P^{Ph}$ (6).....	36
4.4	Příprava $H_6DO_2P_2P^{tfc}$ (7).....	37
4.5	Příprava komplexů.....	37
4.6	Krystalové struktury ligandů .....	38
4.7	pH NMR titrace ligandů a jejich komplexů.....	39
4.7.1	$H_6DO_2P_2P^H$ .....	39
4.7.2	$H_6DO_2P_2P^{Ph}$ .....	40
4.7.3	$H_6DO_2P_2P^{tfc}$ .....	41
4.8	Měření $T_1$ a $T_2^*$ relaxačních časů ligandů a jejich komplexů .....	46
5.	Závěr .....	49
	Použitá literatura.....	50

## Seznam zkratek a symbolů

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
CAs	kontrastní látky
CT	počítačová tomografie
Ekv.	ekvivalent
Et <sub>2</sub> O	diethylether
EtOH	ethanol
<sup>18</sup> F <sub>FDG</sub>	2-deoxy-2-( <sup>18</sup> F)fluor-D-glukóza
H <sub>3</sub> NOTA	1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina
H <sub>4</sub> DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
H <sub>4</sub> TETA	1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11-tetraoctová kyselina
H <sub>5</sub> DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
H <sub>8</sub> DOTP	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrakis(methylenfosfonová kyselina)
IPAV	směs izopropanol, konc. aq. amoniak, voda v objemovém poměru 7:3:3
Ln	lanthanoidy
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí
MRSI	zobrazování magnetickou rezonanční spektroskopii
NMR	nukleární magnetická rezonance
PET	pozitronová emisní tomografie
RTG	rentgenové snímkování
RVO	rotační vakuová odparka
SA	čtvercové antiprisma (square antiprism)
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie
TACN	1,4,7-triazacyklononan
TFA	trifluoroctová kyselina
TFEPA	2,2,2-trifluorethylfosfinová kyselina
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	tetramethylsilan
TSA	zkřížené čtvercové antiprisma (twisted square antiprism)
s	singlet
d	dublet



t	triplet
q	kvartet
bs	široký signál (broad signal)

# 1. Úvod

## 1.1 Diagnostické zobrazovací metody

Mezi diagnostické zobrazovací metody řadíme počítačovou tomografii (CT, computed tomography), jednofotonovou emisní počítačovou tomografii (SPECT, single photon emission computed tomography) nebo pozitronovou emisní tomografii (PET, positron emission tomography), což jsou metody založené na ionizujícím záření. Další běžně užívaná metoda zobrazování magnetickou rezonancí (MRI, magnetic resonance imaging) je založena na principu NMR (nuclear magnetic resonance).

Transmisní metoda CT využívá rentgenového záření (RTG) k prozáření objektu z nejrůznějších úhlů v jedné rovině. Matematickou rekonstrukcí získaných rentgenových snímků je následně vytvořen trojrozměrný obraz. Záření RTG je nejvíce absorbováno kostmi, tuto metodu lze však také použít pro vyšetření měkkých tkání.

Metody SPECT a PET získávají prostorové informace díky lokalizaci rozdílného množství radioaktivity v zobrazovaných tkáních. Sledované ionizující záření pochází z aplikované radioaktivní látky, která je v těle pacienta selektivně distribuována. Těmito metodami je možné sledovat metabolickou aktivitu orgánů.

Jednofotonová emisní počítačová tomografie detekuje  $\gamma$  záření emitované radioizotopem. Nejčastěji užívaným izotopem je  $^{99m}\text{Tc}$  [1].

Pozitronová emisní tomografie naopak detekuje dva kolineární fotony vznikající anihilací emitovaného pozitronu radioizotopem s elektronem tkáně. Detekce dvou fotonů ve stejný okamžik umožňuje přesnější zjištění polohy zdroje záření ve sledovaném objektu. Kromě vynikajícího prostorového rozlišení se metoda PET vyznačuje také vysokou citlivostí – je schopna detekovat již pikomolární koncentrace radioizotopu. Mezi tradičně používané izotopy vhodné pro PET patří  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$  a  $^{11}\text{C}$  z nichž nejčastěji užívaným je izotop  $^{18}\text{F}$  [2]. Dominantním radiofarmakem pro PET zobrazování je 2-deoxy-2- $(^{18}\text{F})$ fluor-D-glukóza ( $^{18}\text{F}$ FDG) [3].

Zobrazování magnetickou rezonancí je v lékařství hojně využívanou diagnostickou metodou, která oproti předchozím metodám (CT, SPECT, PET) nevyužívá ionizujícího záření, ale využívá elektromagnetického záření v oblasti radiofrekvenčních vln. Metoda MRI je založena na principu NMR.

### 1.1.1 Princip nukleární magnetické rezonance (NMR)

Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie patří mezi jednu z nejdůležitějších rutinních metod v chemické analýze. Své uplatnění ovšem nachází i v medicíně či technologiích.

Tato metoda je založena na interakci atomových jader s magnetickým polem. Jádra atomů mají tzv. spin (jaderný spinový moment hybnosti) charakterizovaný spinovým kvantovým číslem  $I$ , které může nabývat hodnot 0, 1/2, 1, 3/2, 2, 5/2, atd. Jádra se sudým počtem protonů i neutronů mají nulové kvantové číslo  $I$ , nemají tedy jaderný magnetický moment a nejsou v NMR aktivní ani nijak neovlivňují spektra jiných izotopů. Jedná se například o jádra  $^{12}\text{C}$  a  $^{16}\text{O}$ . Ostatní jádra jaderný magnetický moment mají a speciálně jádra se spinem 1/2 jsou pomocí NMR snadno měřitelná. Příkladem je proton  $^1\text{H}$ , který má vysoké přírodní zastoupení a je nejčastěji měřeným izotopem. Dalšími často měřenými jádry jsou  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  a  $^{31}\text{P}$ . Jádra se spinovým kvantovým číslem větším než 1/2 mají kromě jaderného magnetického momentu také elektrický kvadrupólový moment a jsou jen obtížně měřitelná (např.  $^{17}\text{O}$ ) [4].

Součet všech spinových momentů vztažených na jednotku objemu popisuje vektorová veličina celková jaderná magnetizace. V případě, že se NMR aktivní jádra nenacházejí ve vnějším magnetickém poli, jsou jaderné spiny v prostoru orientovány nahodile. Pokud však vzorek umístíme mezi póly silného magnetu, dochází k Zeemanovu rozštěpení energetických hladin a spiny jader se natočí jen v určitých směrech. Jádra se spinem 1/2 poskytují dvě různé energetické hladiny – spiny jader se orientují ve směru (paralelně) nebo proti směru (antiparalelně) vnějšího magnetického pole. Tyto dvě možné orientace spinu nemají stejnou energii a nejsou proto stejně zastoupeny [5]. Energetický rozdíl  $\Delta E$  mezi spinovými hladinami je závislý na síle vnějšího magnetického pole a je dán vztahem (1):

$$\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (1)$$

kde  $\gamma$  je gyromagnetický poměr (konstanta charakteristická pro daný nuklid),  $h$  Planckova konstanta a  $B_0$  magnetická indukce vnějšího magnetického pole. Ozáříme-li takto orientovaná jádra elektromagnetickým zářením o vhodné frekvenci, dochází ke splnění rezonanční podmínky, absorpci záření a překlopení spinu. Tato frekvence se nazývá Larmorova frekvence  $\nu$  a je definována vztahem (2):

$$\nu = \gamma \frac{B_0}{2\pi} \quad (2)$$

Protože se Larmorova frekvence pohybuje v oblasti desítek až stovek MHz, NMR spektroskopie využívá elektromagnetického záření v oblasti radiofrekvenčních vln, tedy s vlnovou délkou řádově v decimetrech až metrech. S rostoucí silou magnetického pole je energetický rozdíl mezi spinovými hladinami větší a k překlopení spinu je potřeba záření o vyšší energii (vyšší frekvenci).

Rezonanční frekvence také závisí na chemickém okolí daného měřeného jádra, neboť každé jádro je obklopeno elektrony, které jej odstiňují proti vloženému magnetickému poli. Říkáme, že jádra jsou stíněna. Každý typ jader v molekule (různé funkční skupiny ve kterých se vyskytuje) má odlišné elektronové okolí, a proto jsou odpovídající jádra stíněna rozdílně, což se projevuje změnou rezonanční frekvence. V NMR spektru pak pozorujeme různé signály pro různé typy jader. Jsou-li jádra ekvivalentní, vykazují stejné stínění a poskytují jeden signál.

Rezonanční frekvence jsou zjišťovány NMR spektrometrem a jsou přepočítávány na tzv. chemický posun  $\delta$ , který je uváděn nejčastěji v jednotkách ppm. Tato veličina se zavádí, aby bylo možné porovnávat NMR spektra naměřená při různých experimentálních podmínkách a na různých přístrojích, neboť je nezávislá na pracovní frekvenci spektrometru. Jedná se o relativní rezonanční frekvenci, která je definována rovnicí (3):

$$\delta = \frac{\nu - \nu_S}{\nu_S} \cdot 10^6 \quad (3)$$

kde  $\nu$  je hodnota rezonanční frekvence skupiny ekvivalentních jader a  $\nu_S$  je rezonanční frekvence standardu. NMR spektra pak vyjadřují intenzitu signálu pro různé chemické posuny. Pro  $^1\text{H}$  NMR se jako standard většinou používá tetramethylsilan (TMS) v jehož struktuře je zcela identicky vázáno dvanáct vodíkových atomů.

Jak již bylo zmíněno, jádra s  $I = 1/2$  nabývají dvou spinových stavů. V rovnovážném stavu – v nepřítomnosti magnetického pole – mají jaderné magnetické momenty náhodou orientaci. V prostředí magnetického pole mají jaderné magnetické momenty také náhodnou orientaci, ale postupně začínají převažovat jádra, jejichž spiny jsou orientovány souhlasně se směrem magnetického pole. Tato jádra mají kladný průmět jaderného magnetického

momentu do osy magnetického pole (osa  $z$ ). V magnetickém poli všechny jaderné magnetické momenty vykonávají precesní pohyb (vektor jaderného magnetického momentu mění svou orientaci po plášti hypotetického kužele) kolem osy  $z$ . Přebytek jader na energeticky nižší hladině tak způsobí, že celková magnetizace má směr osy  $z$ .

Aplikací radiofrekvenčního pulzu dochází ke stáčení magnetizace ze směru osy  $z$  a jaderný spinový systém se tak vychyluje z rovnováhy. Spinová relaxace pak popisuje děj, kdy se spinový systém postupně navrácí zpět do rovnovážného stavu. Rychlost relaxace je velmi důležitá pro NMR experimenty a její studium poskytuje řadu důležitých informací. Rozlišujeme dva mechanismy spinové relaxace – podélná relaxace a příčná relaxace.

Podélná (spin-mřížková, longitudinální) relaxace je charakterizována spin-mřížkovým relaxačním časem  $T_1$ , který popisuje, za jak dlouho se obnoví rovnovážná magnetizace v ose  $z$ . Čím kratší je čas  $T_1$ , tím rychleji je dosaženo rovnovážného stavu. V důsledku této relaxace dochází ke snižování výšky signálu.

Příčná (spin-spinová, transverzální) relaxace je popisována spin-spinovým relaxačním časem  $T_2$ . Během této relaxace dochází k úbytku magnetizace v rovině  $xy$ . Díky molekulovým pohybům dochází k fluktuacím lokálních magnetických polí, což vede k rozfázování precesního pohybu jaderných magnetických momentů a vektor magnetizace se tak zmenšuje. Následkem této relaxace je snižování intenzity signálu a krátké relaxační časy  $T_2$  způsobují jeho rozšíření. Relaxační čas  $T_2$  je vždy kratší nebo stejný jako čas  $T_1$  [4].

Na principu nukleární magnetické rezonance (NMR) je založena metoda zobrazování magnetickou rezonancí (MRI).

### 1.1.2 Princip zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)

Zobrazování magnetickou rezonancí je neinvazivní diagnostickou metodou používanou především v lékařství. Zobrazuje molekuly a molekulové procesy až na buněčné úrovni, čímž poskytuje informace o stavu organismu nebo tkáně. Jak již bylo zmíněno, jedná se o neinvazivní metodu, která nevyužívá škodlivé ionizující záření, ale využívá záření v oblasti radiofrekvenčních vln. V případě metody MRI se využívají gradienty magnetického pole, díky čemuž mají sledovaná jádra v různých bodech v prostoru různou rezonanční frekvenci. To umožňuje následnou rekonstrukci 3D obrazu a určení pozice signálu v prostoru. Aby bylo možno získat 3D obraz sledované látky (tkáně), je potřeba používat gradienty magnetického pole podél tří os. Klasická magnetická rezonance je založena na principu  $^1\text{H}$  NMR a sleduje tak chování jader  $^1\text{H}$  v molekule vody, která se hojně vyskytuje ve všech měkkých tkáních. Naměřený signál je tak velmi intenzivní. V důsledku

rozdílné koncentrace vody v tkáních vzniká kontrast, jenž umožňuje zobrazit rozdíly mezi jednotlivými typy tkáně.

Pro umocnění daného kontrastu lze použít kontrastních látek (CAs, contrast agents), které ovlivňují intenzitu sledovaného signálu. Kontrastní látky jsou magneticky aktivní sloučeniny, jež se před vyšetřením intravenózně aplikují do těla pacienta a zkracují relaxační časy okolních jader  $^1\text{H}$  molekuly vody – při volbě vhodných experimentálních podmínek tak zvyšují kontrast. Kontrastní látky zkracují oba relaxační časy –  $T_1$  i  $T_2$ . V případě, že CAs významněji zkracují relaxační čas  $T_1$ , vzniká při volbě vhodné pulzní sekvence pozitivní kontrast – tkáň obsahující kontrastní látku vykazuje vyšší signál a jeví se světlejší. Mezi takovéto kontrastní látky patří komplexy paramagnetických iontů kovů, z nichž nejvýznamnějším je ion  $\text{Gd}^{3+}$ . Tento ion se jeví jako ideální pro využití v MRI vzhledem ke svým vlastnostem (v důsledku zcela obsazené elektronové konfiguraci  $f^7$  má dlouhý elektronový relaxační čas a velký magnetický moment). Je-li kontrastní látkou významněji zkracován relaxační čas  $T_2$ , při použití vhodné pulzní sekvence dochází k negativnímu kontrastu a tkáň vykazující nižší signál se jeví tmavší. Zde se jedná o superparamagnetické nanočástice oxidů železa (Superparamagnetic Iron Oxide, SPIO).

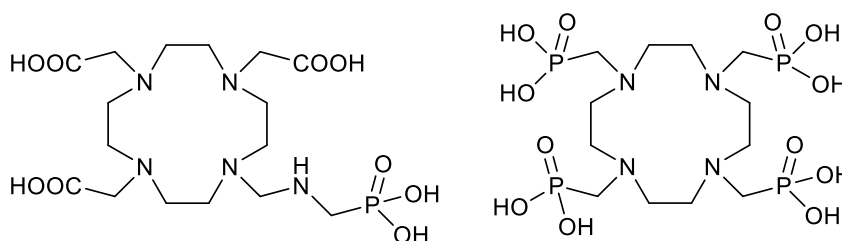
V rámci MRI lze kromě jadra  $^1\text{H}$  využít dalších NMR aktivních jader, jako například jádra  $^{19}\text{F}$  a  $^{31}\text{P}$ , jejichž hlavní výhodou je monoizotopičnost daných prvků.  $^{19}\text{F}$  MRI využívá faktu, že se fluor v lidském těle vyskytuje pouze ve stopovém množství v zubech a kostech, kdežto v měkkých tkáních se nenachází vůbec. Naměřený signál tak pochází výhradně od atomů fluoru obsažených v kontrastní látce [6].  $^{19}\text{F}$  MRI proto nachází využití například pro tzv. „hot spot imaging“, tedy pro selektivní zobrazení označené tkáně nebo orgánu [7], a dále pro buněčné značení, tzv. „cell tracking“, kdy lze sledovat migraci transplantovaných buněk označených kontrastní látkou obsahující jádra  $^{19}\text{F}$  [8]. Aby byl naměřený signál  $^{19}\text{F}$  anatomicky a prostorově lokalizován, je potřeba také naměřit  $^1\text{H}$  pozadí a oba obrazy překrýt do výsledného tomografu. To vzhledem k blízké hodnotě gyromagnetického poměru jádra  $^{19}\text{F}$  ( $\gamma = 251,8 \cdot 10^6 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ ) a jádra  $^1\text{H}$  ( $\gamma = 267,5 \cdot 10^6 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ ) [9] není zásadní problém a pro jejich měření tak lze použít standardní MRI přístroje [10].

Nevýhodou jádra  $^{19}\text{F}$  je jeho pomalá relaxace. Zkrácení relaxačního času  $T_1$  měřeného jádra lze však dosáhnout jeho umístěním do blízkosti paramagnetického iontu kovu.

Jádra  $^{31}\text{P}$  mají také poměrně vysoký gyromagnetický poměr ( $\gamma = 108,4 \cdot 10^6 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ ) [9] a díky spinu  $1/2$  jsou jejich spektra relativně snadno interpretovatelná. Fosfor se v lidském těle nachází jako minerál hydroxoapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , který tvoří až 50 % hmotnosti kostí, a dále jako složka nejrůznějších

metabolitů – ATP, ADP, kreatinfosfát nebo jako anorganický (volný) fosfát [11]. Metody založené na NMR dávají možnosti studovat metabolismus a morfologii až na buněčné úrovni. Kombinací NMR a MRI je metoda MRSI (magnetic resonance spectroscopic imaging), která studuje prostorovou distribuci některých metabolitů v buňkách a buněčných agregátech/tkáních [12]. Sledování koncentrace různých metabolitů dává důležitý přehled o stavu tkáně, a proto je *in vivo*  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie a  $^{31}\text{P}$  MRI tak důležitou aplikací tohoto jádra. Vedle výzkumu metabolických drah, kdy se sleduje koncentrace metabolitů obsahujících atomy fosforu, lze také nepřímou sledovat i pH. Již před více jak 90 lety popsal Warburg [13,14] proces transformace zdravých buněk v buňky nádorové, kdy dochází k významným změnám v jejich metabolismu – je zvýšená syntéza DNA, využití aminokyselin a glukózy. Předpokládalo se, že rakovinové buňky díky zvýšenému metabolismu a nedostatečnému přísunu kyslíku produkují velké množství kyseliny mléčné a mají tak hodnoty intracelulárního pH v kyselé oblasti. S příchodem  $^{31}\text{P}$  MRS se ukázalo, že intracelulární pH nádorových buněk je vyšší, než je tomu v případě extracelulárního pH [15]. Nádorové extracelulární mikroprostředí je však často mírně kyseléjší než zdravá tkáň v důsledku zvýšené anaerobní glykolýzy a související akumulace kyseliny mléčné, snížené pasivní pufrací kapacity a špatné perfuze tkání [16]. Například extracelulární pH v pevných nádorech se typicky pohybuje v rozmezí 6,5 až 7,2 [17].

Vzhledem k tomu, jaký význam má pH ve vztahu k rakovinovým buňkám, byla vyvinuta snaha připravit vhodné pH responzivní kontrastní látky pro jeho určení *in vivo*. V případě, že tyto komplexy nesou vhodné funkční skupiny, jejichž hodnoty  $\text{pK}_\text{A}$  spadají do oblasti zájmu, získáváme látky použitelné jako NMR pH indikátory. U komplexu  $\text{Eu-H}_5\text{DO}_3\text{ANP}$  (Obrázek 1) bylo pozorováno vzájemné přelévání integrální intenzity mezi dvěma  $^{31}\text{P}$  NMR signály v závislosti na protonizačním stavu. Signály byly separovány o zhruba 190 ppm a toto chování bylo vysvětleno rozdílnou koordinací při různém pH [18]. Byla také pozorována závislost chemického posunu  $^{31}\text{P}$  rezonancí u komplexů  $\text{Ln-H}_8\text{DOTP}$  (Obrázek 1) se změnou pH [19,20].



Obrázek 1 Struktura ligandů  $\text{H}_5\text{DO}_3\text{ANP}$  a  $\text{H}_8\text{DOTP}$

Jak již bylo zmíněno, fosfor se v lidském těle vyskytuje v hojném množství v nejrůznějších sloučeninách. Aby bylo možné rozlišit mezi signály endogenního původu a signály CA, používají se v komplexech kontrastních látek paramagnetické ionty kovů, jejichž přítomnost způsobuje posun signálů CA po škále chemického posunu mimo oblast, kde se nacházejí signály biogenních sloučenin. Přítomnost paramagnetika také zkracuje relaxační časy signálu  $^{31}\text{P}$  NMR, což zrychluje měření.

## 1.2 Design ligandů pro použití *in vivo*

Paramagnetické ionty vnitřně přechodných kovů jsou velmi toxické. Pro jejich využití v MRI je třeba tuto toxicitu snížit převedením na komplexní sloučeninu. Vzniklý komplex by měl být termodynamicky stabilní a kineticky inertní, aby v těle pacienta nedocházelo k disociaci na volný ligand a centrální ion kovu.

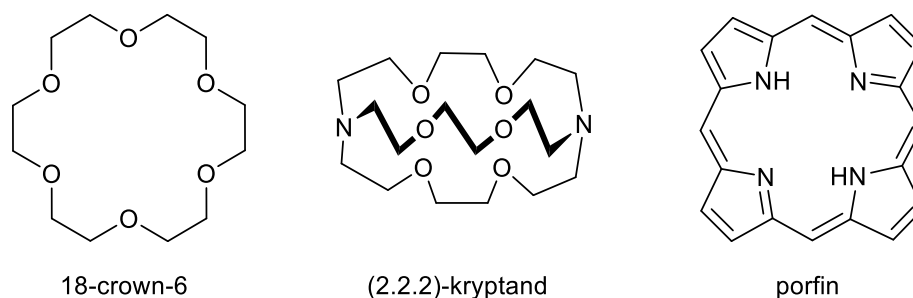
Stabilitu komplexu lze zvýšit tzv. chelatací, kdy vzniká chelátový komplex. Tento komplex obsahuje vícevazný (polydentátní) ligand, který se váže alespoň dvěma donorovými atomy k jednomu centrálnímu iontu kovu. Vzniklé cheláty jsou stabilnější než komplexy centrálního atomu kovu s příslušným počtem jedno vazných ligandů.

Další skupinou vícevazných ligandů jsou makrocikly. Makrocyclické ligandy lze definovat jako cyklické látky složené z minimálně devíti atomů (heteroatomů), které obsahují alespoň tři donorové atomy [21]. Jako donorové atomy mohou sloužit například atomy kyslíku, dusíku či síry a jejich vzájemné kombinace. Komplexy makrocyclických ligandů jsou stabilnější než odpovídající komplexy s necyklickými ligandy. Tento nárůst stability se označuje jako makrocyclický efekt [22].

Makrocyclické ligandy jsou schopné vytvářet komplexní sloučeniny se širokou škálou iontů kovů. Selektivitu ligandů lze ovlivnit počtem atomů v cyklu – tedy velikostí vzniklé kavity – a druhem donorových atomů. V případě, že se ion co nejlépe vejde do kavity, je centrální atom dokonale obalen makrocyclickým ligandem a dochází tak ke vzniku velmi pevného komplexu. Pokud je ion kovu příliš velký a do kavity se nevejde, může dojít ke vzniku komplexu, kdy bude kation umístěn výrazně nad rovinou makrocyclického ligandu. Stabilitu takového komplexu lze zvýšit přítomností vhodných pendantních skupin (viz dále).

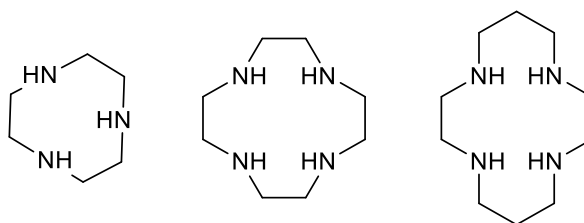
Mezi nejběžnější makrocyclické ligandy patří crown-ethery, kryptandy a polyazamakrocyclické ligandy – příklady zástupců jednotlivých skupin viz Obrázek 2.





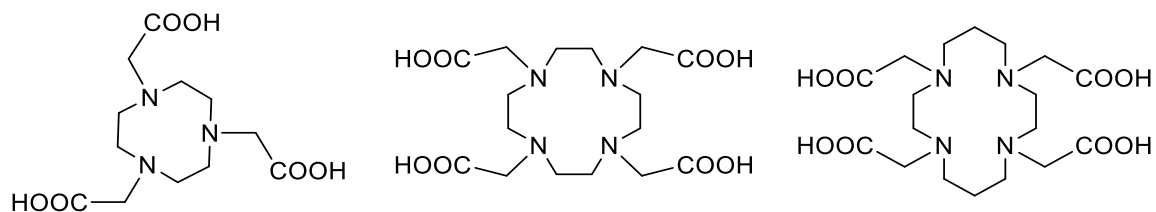
Obrázek 2 Příklady makrocyclických ligandů; crown-ethery (18-crown-6), kryptandy ((2.2.2)-kryptand) a polyazamakrocyclické ligandy (porfin)

Polyazamakrocyclické ligandy jsou nejvýznamnější skupinou makrocyclických ligandů. Jejich molekuly mohou obsahovat různý počet dusíkatých donorových atomů. Nejznámější a nejčastěji studovaní zástupci jsou triamin TACN (1,4,7-triazacyklononan) a tetraaminy cyklen (1,4,7,10-tetraazacyklododekan) a cyklam (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan) (Obrázek 3).



Obrázek 3 Nejvýznamnější polyazamakrocyclické ligandy; zleva TACN, cyklen a cyklam

Uvedené ligandy lze modifikovat zavedením funkčních skupin (tzv. pendantních ramen) na atomy dusíku a tím ovlivnit selektivitu a komplexační vlastnosti ligandů. Nejčastěji používanými pendantními skupinami jsou karboxylové kyseliny (octová, propionová), oxokyseliny fosforu a jejich deriváty. Nahradíme-li všechny aminové atomy vodíků makrocyclů TACN, cykvenu a cyklamu karboxymethylovými pendantními rameny, vznikají makrocyclické ligandy označované jako H<sub>3</sub>NOTA (1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina), H<sub>4</sub>DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina) a H<sub>4</sub>TETA (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11-tetraoctová kyselina), viz Obrázek 4.



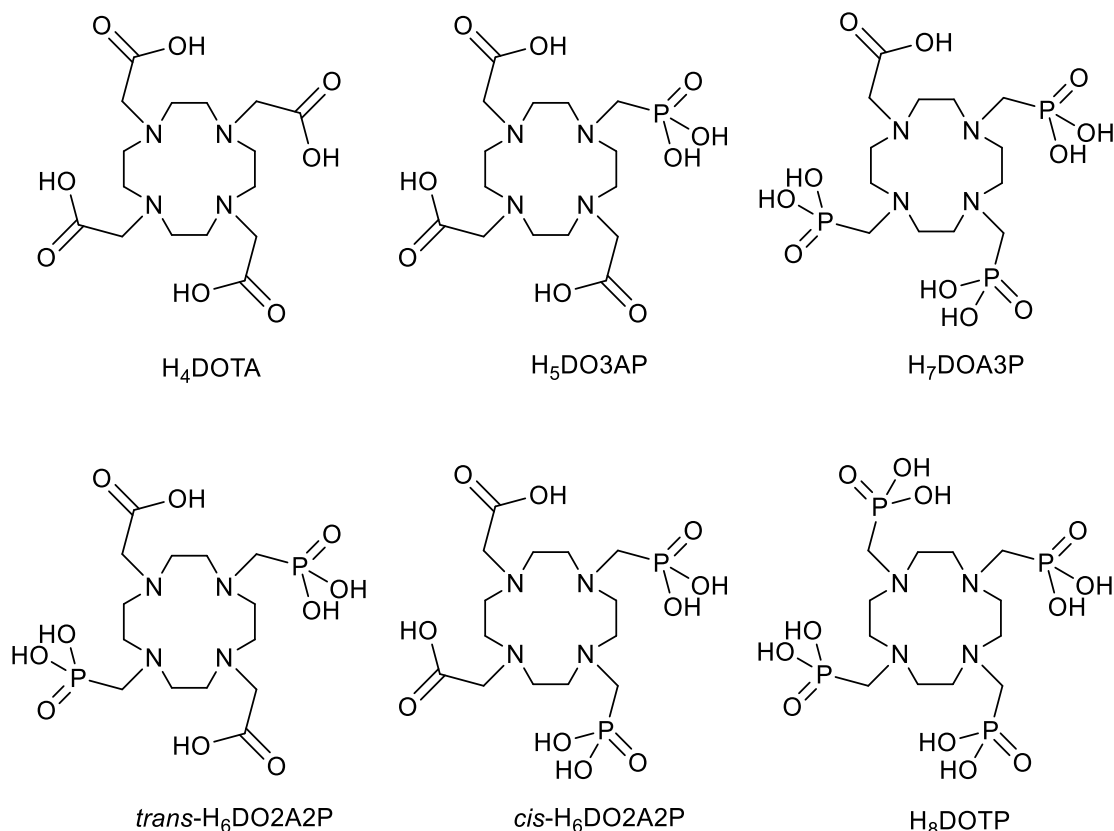
Obrázek 4 Makrocyclické ligandy; zleva H<sub>3</sub>NOTA, H<sub>4</sub>DOTA a H<sub>4</sub>TETA

Tyto tři ligandy (a jejich deriváty) obsahují kavitu odlišných rozměrů a vykazují tak různou selektivitu k různým iontům kovů. Ligand TACN a od něj odvozené sloučeniny nejlépe komplexují menší ionty jako trojmocný hliník či gallium. Cyklam (respektive TETA apod.) je vhodný pro komplexaci dvojmocných iontů mědi, niklu nebo zinku. Oproti tomu sloučeniny obsahující cyklenový skelet se osvědčily jako vhodné ligandy pro komplexaci trojmocných iontů kovů skupiny lanthanoidů a jsou tak využívány v kontrastních látkách pro MRI. Právě ligandům odvozeným od cyklenu je v této práci věnována pozornost.

### 1.2.1 H<sub>4</sub>DOTA a její analoga

H<sub>4</sub>DOTA je nejznámějším derivátem cyklenu. Acetátové skupiny jsou schopné odštěpovat proton a vznikají tak čtyři nová místa schopná koordinace. Spolu se čtyřmi atomy dusíku v základním skeletu cyklenu je k dispozici celkem osm koordinačních míst – H<sub>4</sub>DOTA je oktadentátním ligandem. Je tak vhodným ligandem pro ionty lanthanoidů, které preferují nejčastěji koordinační číslo osm a devět. Tyto ionty se díky oxidačnímu stavu +3 chovají jako tvrdé lewisovské kyseliny (díky velké povrchové hustotě náboje) a tak jsou koordinovány tvrdými atomy kyslíku a středně tvrdými atomy dusíku velmi dobře. Koordinační číslo 8 je preferováno menšími ionty v druhé polovině lanthanoidové série. Naopak koordinační číslo 9 upřednostňují větší ionty ze začátku série s tím, že poslední deváté místo je nejčastěji obsazováno molekulou vody.

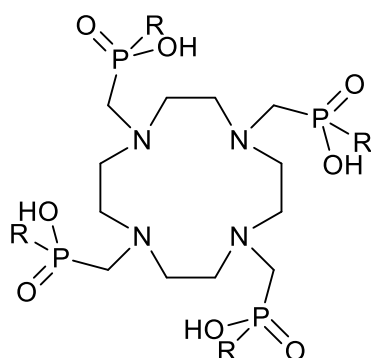
Postupem času byly připravovány různé strukturní modifikace ligandu H<sub>4</sub>DOTA, kdy docházelo k nahrazení jednoho nebo více acetátových pendantních ramen jinými funkčními skupinami (např. aminy, alkoholy či fosfináty a fosfonáty). V případě ligandů s pendantními rameny obsahujícími fosfor byla pozorována vyšší komplexační selektivita při zachování dostatečné termodynamické stability [23]. Tato zjištění vedla k syntéze ligandů s různým poměrem acetátových a fosfonátových pendantních ramen, tzv. DOTA-like sloučenin (Obrázek 5) [24,25].



Obrázek 5 Série ligandů odvozených od ligandu H<sub>4</sub>DOTA nahrazením acetátových ramen fosfonátovými pendantními rameny v různém poměru

Za zmínku stojí také využití ligandu H<sub>4</sub>DOTA jako chelátoru iontů kovů pro zobrazování pomocí PET. Konkrétním příkladem může být komplex <sup>68</sup>Ga-DOTA, který je navázaný na somatostatinový analog octreotid (SomaKit TOC<sup>®</sup>). Tato látka byla v roce 2016 schválena v Evropě pro zobrazování pomocí metody PET. V budoucnu by tak mohla být potenciálně využita pro terapii neuroendokrinních nádorů [26,27].

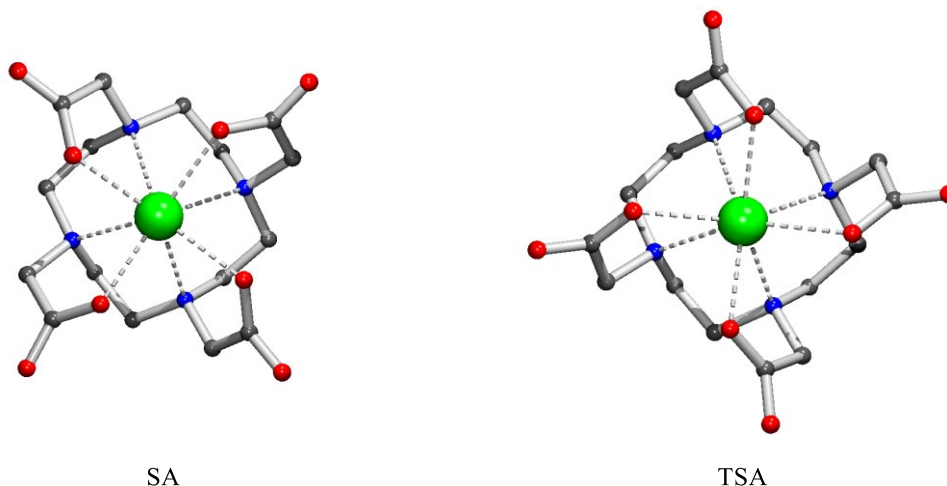
Již před více než třiceti lety započaly významné studie tetrafosforových analogů ligandu H<sub>4</sub>DOTA za účelem přípravy nových sloučenin s potenciálně lepšími vlastnostmi oproti mateřské molekule. Základním fosforovým skeletem je ligand H<sub>8</sub>DOTP, který vzniká nahrazením všech čtyř acetátových pendantních ramen za methylfosfonové skupiny. Od něj byla odvozena řada monoesterových derivátů. Dále byla syntetizována řada ligandů s různě substituovanými fosfinovými kyselinami, tj. lišících se substituentem na atomu fosforu (Obrázek 6).



R = H	H <sub>4</sub> DOTP <sup>H</sup>
CH <sub>3</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>Me</sup>
CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>Et</sup>
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>Ph</sup>
CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>Bn</sup>
CH <sub>2</sub> OH	H <sub>4</sub> DOTP <sup>hm</sup>
OH	H <sub>8</sub> DOTP <sup>OH</sup>
OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>OEt</sup>
O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>OPr</sup>
O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>OBu</sup>
OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>F</sup>
2-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>o</sup>
3-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>m</sup>
4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub>	H <sub>4</sub> DOTP <sup>p</sup>

Obrázek 6 Ligandy odvozené od molekuly H<sub>8</sub>DOTP [19,28–39]

V komplexech s ligandy typu H<sub>4</sub>DOTA leží centrální ion kovů lanthanoidové série mezi dvěma koplanárními rovinami tvořenými atomy dusíku (N<sub>4</sub>) cyklenového kruhu a atomy kyslíku (O<sub>4</sub>) pendantních ramen. Tyto komplexy se v roztoku vyskytují v různých izomerních formách. Prvním typem izomerie je různá orientace koordinujících skupin pendantních ramen, respektive vzájemné natočení dusíkových a kyslíkových rovin vůči (pseudo)čtyřčetné ose komplexu (označováno jako  $\Delta$  nebo  $\Lambda$ ) – ze sterických důvodů jsou vždy všechna čtyři ramena zatočena stejným směrem. Druhým typem izomerie je konformace ethylenových můstků makrocyklu ( $\delta$  nebo  $\lambda$ ). Aby bylo dosaženo minimálního vnitřního pnutí makrocyklu, mají všechny ethylenové můstky stejnou konformaci, tj.  $\delta\delta\delta\delta$  nebo  $\lambda\lambda\lambda\lambda$ . Vznikají tak celkem čtyři izomery – dva enantiomerní páry diastereoizomerů, které jsou v roztoku v dynamické rovnováze. Jednotlivé enantiomery není možné pomocí NMR spektroskopie rozlišit, a proto jsou z těchto čtyř izomerů pozorovány pouze dvě sady signálů reprezentující po jednom enantiomerním páru. Důležitým rozlišovacím parametrem těchto izomerů je torzní úhel ( $\omega$ ) mezi rovinami N<sub>4</sub> a O<sub>4</sub>, tj. zatočení pendantních skupin vůči axiální ose. Enantiomerní pár  $\Delta(\delta\delta\delta\delta)/\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)$  je označován jako izomer TSA (twisted square antiprism, zkřížené čtvercové antiprisma), neboť hodnota torzního úhlu se blíží teoretické hodnotě 22,5° pro zkřížené antiprisma, a pár enantiomerů  $\Delta(\lambda\lambda\lambda\lambda)/\Lambda(\delta\delta\delta\delta)$  je označován jako izomer SA (square antiprism, čtvercové antiprisma), ve kterém je hodnota úhlu  $\omega$  blízká teoretické hodnotě 45° (viz Obrázek 7 a Obrázek 8).



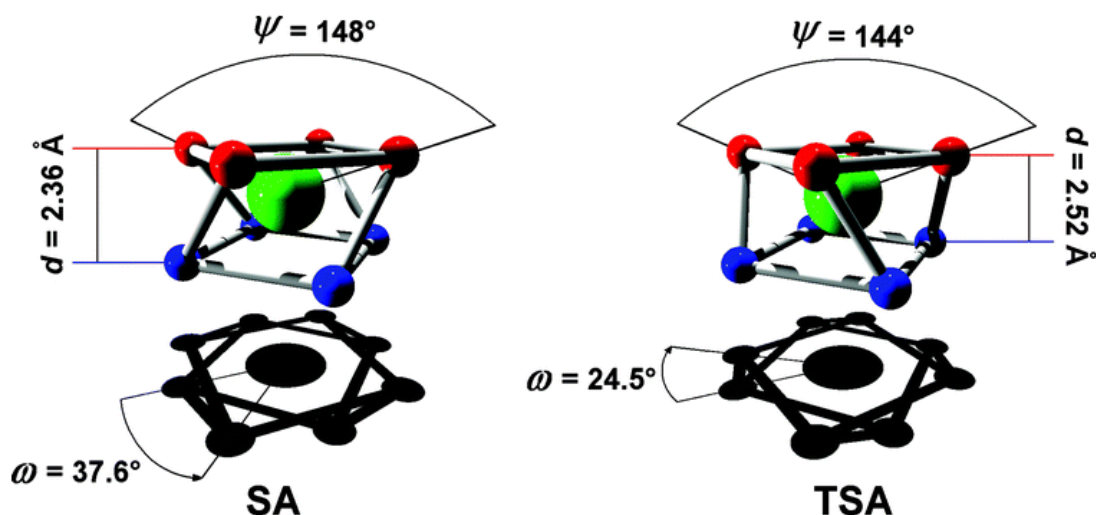
Obrázek 7 Strukturální model izomerů SA a TSA komplexů Ln-DOTA. Obrázek převzat a upraven z [40].

V případě komplexů  $H_4DOTA$  s ionty lanthanoidů bývá na devátém koordinačním místě nad rovinou  $O_4$  koordinována molekula vody. Výjimkou jsou TSA izomery nejmenších iontů  $Yb^{3+}$  a  $Lu^{3+}$ , které nemají molekulu vody v první koordinační sféře. Naopak komplexy iontů  $Ln^{3+}$  s ligandem  $H_8DOTP$  přímo koordinovanou molekulu vody neobsahují, až na komplexy největších iontů ( $Ce^{3+}$ ,  $Pr^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$ ) [32]. Pokud není molekula vody na centrální atom koordinována, označuje se tato skutečnost apostrofem – oktakoordinované izomerní částice se tedy označují jako SA' a TSA', nonakoordinované izomerní částice jako SA a TSA [41].

Izomery TSA a SA se liší mj. velikostí kavity, která je dána vzdáleností ( $d$ ) rovin  $N_4$  a  $O_4$  (Obrázek 8). To se projevuje především změnou zastoupení obou izomerů v roztocích komplexů v závislosti na iontovém poloměru lanthanoidového iontu  $Ln^{3+}$ . U větších iontů na začátku lanthanoidové řady převažuje izomer TSA, který nabízí prostornější kavitu. Naopak izomer SA převažuje na konci řady, tedy u iontů s menším iontovým poloměrem. U komplexů iontů  $Ln^{3+}$  s ligandem  $H_4DOTA$  se tak setkáváme s různým poměrem izomerů TSA/SA, zatímco komplexy iontů  $Ln^{3+}$  s ligandy obsahujícími fosfonátová ( $H_8DOTP$ ) nebo fosfinátová ( $H_4DOTP^R$ ) pendantní ramena se vyskytují výhradně v uspořádání TSA. To je způsobeno přítomností objemného atomu fosforu v pendantním ramenu [23,32,42,43]. Zvýšený výskyt izomeru TSA v porovnání s komplexy  $H_4DOTA$  se objevuje již v případě přítomnosti jednoho pendantního ramene obsahujícího atom fosforu (příklad ligandu  $H_5DO3AP$ ).

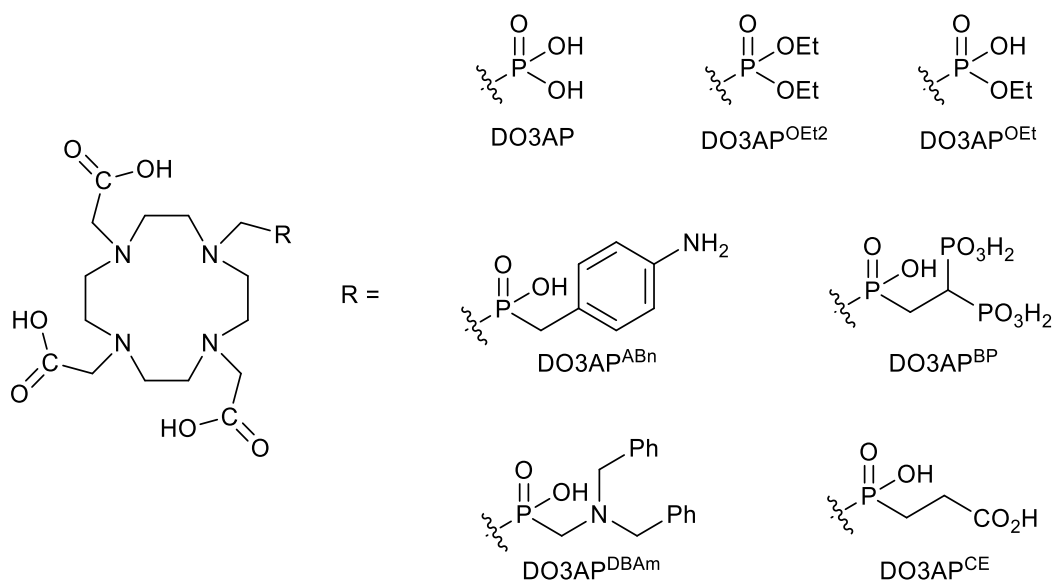
Dalším důležitým parametrem izomerů TSA a SA je také tzv. „opening angle“ ( $\psi$ ) – úhel, který mezi sebou svírá atom kovu a dva protilehlé koordinované atomy kyslíku pendantních ramen (Obrázek 8). Jeho velikost udává možnost koordinace

molekuly vody v první koordinační sféře. Přítomnost vody vázané přímo na centrální ion kovů je důležitá především pro kontrastní látky používané v  $^1\text{H}$  MRI, které jsou založené na iontu  $\text{Gd}^{3+}$ . Molekula vody je koordinována v případě, že velikost toho úhlu neklesne pod zhruba  $135^\circ$  [23,40]. Bylo zjištěno, že komplex  $\text{Gd-DO3AP}$  koordinovanou molekulu vody obsahuje, stejně jako komplex mateřského ligandu  $\text{H}_4\text{DOTA}$ . Obsahuje-li však ligand dva a více pendantních ramen s atomy fosforu ( $\text{H}_6\text{DO2A2P}$ ,  $\text{H}_8\text{DOTP}$ ), pak ke koordinaci molekuly vody v  $\text{Gd}^{3+}$  komplexu nedochází. V izomeru TSA je tento prostor těsnější, což má za následek destabilizaci vazby koordinované molekuly vody. Takovéto komplexy pak vykazují mnohem vyšší rychlost výměny vody, což je důležitý parametr ovlivňující účinnost  $T_1$   $^1\text{H}$  MRI kontrastních látek.



Obrázek 8 Koordinační mnohostěny SA ( $[\text{Pr}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ ) a TSA ( $[\text{Ce}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ ). Koordinované molekuly vody jsou pro přehlednost vynechány. Obrázek převzatý z literatury [40].

Již v minulosti započaly významné studie fosforových analogů ligandu  $\text{H}_4\text{DOTA}$ . Základním fosforovým analogem je ligand  $\text{H}_8\text{DOTP}$ , který vzniká nahrazením všech čtyř acetátových pendantních ramen za methylfosfonové skupiny. Dále byla syntetizována řada ligandů s různým poměrem acetátových a fosfonátových pendantních ramen (viz Obrázek 5). Poté byla připravena fosfinátová analoga. Nejvýznamnějšími a také nejvíce studovanými ligandy byla tetrafosfinátová analoga molekuly  $\text{H}_8\text{DOTP}$  ( $\text{H}_4\text{DOTP}^{\text{R}}$ ) (včetně  $\text{H}_8\text{DOTP}$  samotné). V důsledku snahy o zdokonalení kontrastních látek bylo vynaloženo značné úsilí na přípravu ligandů, které by v komplexech s iontem  $\text{Gd}^{3+}$  preferovaly izomer TSA. Jako takové se ukázaly být tetrasubstituované deriváty cyklenu s jednou fosfinovou či fosfonovou pendantní skupinou, tedy sloučenina  $\text{H}_5\text{DO3AP}$  a její analoga (Obrázek 9).



Obrázek 9 Ligandy odvozené od molekuly  $H_5DO_3AP$  [44–48]

Molekuly  $H_6DO_2A_2P$  a  $H_7DOA_3P$  příliš studovány nebyly, neboť se ukázaly jako nevhodnými ligandy pro  $T_1$  kontrastní látky z důvodu absence koordinované molekuly vody. Sloučeniny  $H_4DOTP^R$  jsou sice nevhodné pro použití jako  $^1H$  MRI kontrastní látky, ale byly studovány např. jako nosiče radionuklidů a nebo pro využití v  $^{31}P$  MRI. Velkou výhodou této skupiny látek je relativně snadná syntéza.

Vzhledem k přítomnosti čtyř pendantních ramen obsahujících atom fosforu dostáváme pro komplexy těchto ligandů šest diastereoizomerů ( $RRRR$ ,  $RRRS$ ,  $RSRS$ ,  $RRSS$ ,  $RSSS$ ,  $SSSS$ ), jež poskytují velice komplikovaná NMR spektra. Izomerie  $R/S$  byla u některých těchto tetrafosforových analogů  $H_4DOTA$  již dříve detailně studována [33,49].

Kupříkladu  $^{31}P$  NMR spektra komplexů  $[Eu(DOTP^H)]^-$ ,  $[Eu(DOTP^{OEt})^-]$ ,  $[Eu(DOTP^{OBu})^-]$  a  $[Ln(DOTP^{Ph})^-]$  poskytují celou sadu možných izomerů (šestnáct  $^{31}P$  NMR signálů pro šest izomerů  $R/S$ ) [28,32,49]. Naopak  $^{31}P$  NMR spektra komplexů  $[Eu(DOTP^{hm})^-]$ ,  $[Eu(DOTP^{Et})^-]$  a  $[Ln(DOTP^{Bn})^-]$  obsahují jeden majoritní signál. Například u komplexů  $[Eu(DOTP^{hm})^-]$  a  $[Eu(DOTP^{Et})^-]$  je integrální intenzita majoritního signálu cca 70 %. Majoritní signál lze přiřadit totálně symetrickému izomeru  $RRRR$  (nebo  $SSSS$ ), minoritní signály pak izomeru  $RRRS$  (nebo  $SSSR$ ) [32,50].

### 1.3 NMR spektroskopie komplexů paramagnetických iontů kovů

Jsou-li všechny elektrony v orbitalech centrálního iontu kovu komplexu spárovány, jedná se o diamagnetický ion. Naopak, obsahují-li orbitály jeden nebo více nepárových elektronů, mluvíme o iontu paramagnetickém [51]. Jak již bylo zmíněno, mezi MRI

kontrastní látky zkracující primárně  $T_1$  relaxační čas patří komplexy paramagnetických iontů – těmi mohou být ionty přechodných kovů nebo ionty lanthanoidů, jejichž magnetický projev se od sebe liší.

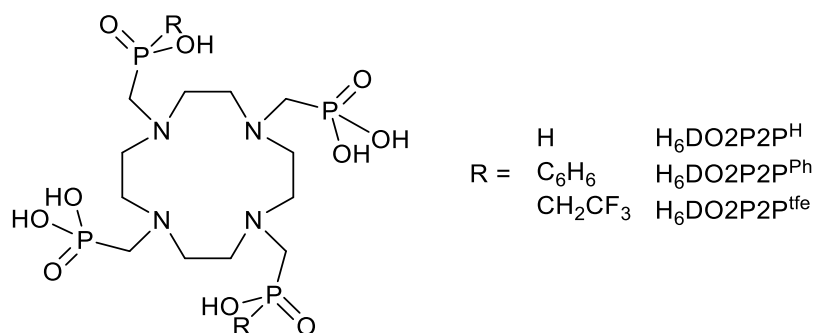
V případě přechodných kovů hraje významnou roli ligand, který má vliv na rozštěpení d-hladin a ovlivňuje tak jejich obsazování. Teorie krystalového pole (CFT, Crystal Field Theory) je elektrostatický model, který popisuje, jakým způsobem se rozštěpí energie původně degenerovaných d-orbitalů iontu přechodného kovu v komplexu, působí-li na ně záporný náboj lokalizovaný na ligandech, které obsazují definované pozice v prostoru (dle symetrie koordinačního okolí). Síla krystalového pole (a velikost štěpení) závisí na druhu centrálního iontu a jeho oxidačním stavu, a také na druhu ligandu, respektive na donorovém atomu [51]. U určitých elektronových konfigurací iontů ( $d^4$ ,  $d^5$ ,  $d^6$  a  $d^7$  v oktaedrických komplexech) jsou možná dvě uspořádání elektronů – nízkospinové (LS, Low-Spin) a vysokospinové (HS, High-Spin), přičemž vzniká to, které má nižší energii. To závisí na velikosti stabilizační energie krystalového pole a párovací energie.

V případě lanthanoidů v podstatě záleží pouze na počtu f-elektronů. Elektronová konfigurace iontů  $\text{Ln}^{3+}$  je  $[\text{Xe}]4f^n$ , kde  $n = 0-14$ . Ionty kovů  $\text{La}^{3+}$  a  $\text{Lu}^{3+}$  nemají žádné nepárové elektrony a jsou proto diamagnetické. Naproti tomu ostatní prvky lanthanoidové série v oxidačním stavu  $3+$  mají 1 až 7 nepárových 4f elektronů a jsou tak paramagnetické. Orbitály 4f jsou umístěny poměrně hluboko směrem k jádru a nejsou tak schopné kovalentní interakce s ligandy. Interakce jsou převážně elektrostatické a geometrie jejich komplexů je určena především velikostí iontu  $\text{Ln}^{3+}$  a spíše sterickými než elektrostatickými důvody. Štěpení energie f-orbitalů v krystalovém poli je malé a stabilizace krystalového pole má jen malý vliv – druh přistupujícího ligandu má tak zanedbatelný vliv na štěpení [51,52]. V důsledku stínění 4f elektronů si jsou lanthanoidové ionty chemicky velmi podobné, přesto však má každý z nich charakteristické účinky na NMR posuny jader v jejich blízkosti. Koordinací paramagnetických iontů  $\text{Ln}^{3+}$  totiž dochází k rozsáhlým posunům NMR frekvencí jader v jejich blízkosti. Tyto posuny jsou citlivé na strukturní změny a je tak možné například učit počet koordinovaných molekul vody, molekulovou konformaci nebo rozlišit jednotlivé diastereoizomery.



## 2. Cíl práce

Cílem této práce je syntéza makrocyclických ligandů odvozených od ligandu  $H_8DOTP$  a dále příprava jejich komplexů s vybranými paramagnetickými ionty lanthanoidů ( $Eu^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ) s potenciálem velké změny chemického posunu v  $^{31}P$  NMR spektrech v závislosti na pH. Součástí práce jsou také naměřené relaxační časy  $T_1$  připravených ligandů a jejich komplexů.



Výhodou ligandu  $H_6DO2P2P^{tfe}$  je pak možnost prostorového mapování i s využitím  $^{19}F$  MRI. Jak bylo uvedeno výše, MRI využívá k prostorové lokalizaci gradient magnetického pole, který ovlivňuje rezonanční frekvenci. Protože změna chemického posunu je též spjata se změnou rezonanční frekvence, může být přesná lokalizace místa, odkud pochází měřený signál, obtížná. Použití signálu  $^{19}F$  NMR k nezávislému určení polohy by tak mohlo být výhodou.

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Použité chemikálie

Pro syntézu byly použity komerčně dostupné chemikálie od prodejců (Lach-Ner, Fluka, Sigma-Aldrich). Tyto chemikálie o běžné čistotě nebyly dále nijak dočištěny ani sušeny. Kyselina 2,2,2-trifluorethylfosfinová (TFEPA) ve formě amonné soli byla syntetizována Mgr. F. Kouckým.

Je-li uvedeno množství  $\text{SiO}_2$ , jedná se o množství suchého silikagelu. V případě kationtového iontoměníče (Dowex 50) se jedná o objem volně sesednuté suspenze.

#### 3.2 Metody charakterizace připravených látek

##### 3.2.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Průběh reakcí a čištění reakčních směsí byly kontrolovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC; Thin Layer Chromatography) na chromatografických destičkách Silica gel (tloušťka vrstvy 200  $\mu\text{m}$ , velikost pórů 60 Å) od firmy VWR International.

Vizualizace skvrn na destičce byla prováděna pomocí roztoku  $\text{KMnO}_4$  (1 g  $\text{KMnO}_4$  a 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) a Dragendorfova činidla (vodný roztok  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  a KI v  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ).

##### 3.2.2 Hmotnostní spektrometrie MS

Hmotností spektra byla naměřena na hmotnostním spektrometru Waters ACQUITY QDa s ionizací duálním ortogonálním elektrosprejem interface (Z-sprej) pro API (ionizace za atmosférického tlaku), s kvadrupólovým analyzátozem (full scan v rozsahu 30 až 1250  $m/z$ ), s integrovanou turbomolekulární vakuovou pumpou a externí rotační vakuovou pumpou.

##### 3.2.3 NMR

Průběh reakce, čistota a charakterizace připravovaných látek byly určovány měřením NMR spekter na spektrometru Varian NMR System 300 s rezonanční frekvencí 300 MHz pro jádro  $^1\text{H}$ , 282 MHz pro jádro  $^{19}\text{F}$ , 121 MHz pro jádro  $^{31}\text{P}$  a 75 MHz pro jádro  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , dále na spektrometru Varian Inova 400 s rezonanční frekvencí 400 MHz pro jádro  $^1\text{H}$ , 376 MHz pro jádro  $^{19}\text{F}$ , 162 MHz pro jádro  $^{31}\text{P}$  a 101 MHz pro jádro  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , a na spektrometru Bruker Avance III 600 s rezonanční frekvencí 600 MHz pro jádro  $^1\text{H}$ , 565 MHz pro jádro  $^{19}\text{F}$ , 243 MHz pro jádro  $^{31}\text{P}$  a 151 MHz pro jádro  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ .

Rozpouštědlem pro měření NMR spekter byla D<sub>2</sub>O. <sup>1</sup>H NMR spektra byla referencována na signál HDO ( $\delta_{\text{H}} = 4,70$  ppm) nebo na vnitřní standard *tert*-butanol (*t*-BuOH) ( $\delta_{\text{H}} = 1,24$  ppm (CH<sub>3</sub>)). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR spektra byla referencována na vnitřní standard *tert*-butanol ( $\delta_{\text{C}} = 30,29$  ppm (CH<sub>3</sub>)) [53]. Pro měření <sup>31</sup>P NMR spekter byl jako vnější standard použit vodný roztok kyseliny H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ( $\delta_{\text{P}} = 1,00$  ppm, referencovaný na 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> s  $\delta_{\text{P}} = 0,00$  ppm). Při měření <sup>31</sup>P NMR spekter nebyl použit „decoupling“ jader <sup>1</sup>H. <sup>19</sup>F NMR spektra byla referencována na vnější standard kyseliny trifluoroctové ( $\delta_{\text{F}} = -75,0$  ppm).

Naměřená spektra byla vyhodnocována v programu MestReNova. Chemické posuny  $\delta$  jsou uvedeny v ppm, interakční konstanty *J* jsou uvedeny v Hz. Multiplicita signálu je vyjádřena následovně: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), m (multiplet). Pro široký signál je použita zkratka bs (broad signal).

### 3.2.4 RTG strukturní analýza

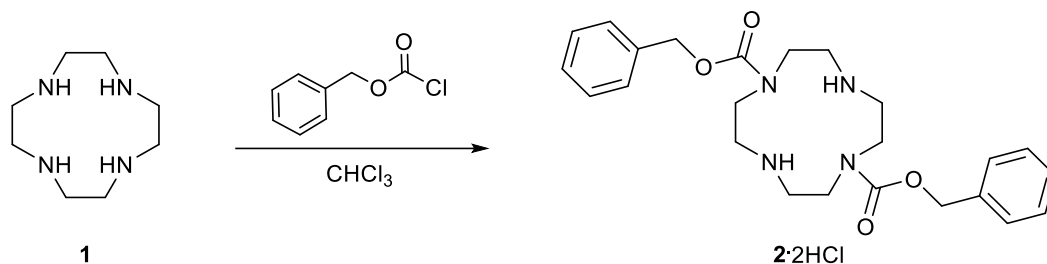
Monokrystal látky H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>H</sup>·3,5H<sub>2</sub>O se podařilo připravit pozvolným odpařením vodného roztoku ligandu H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>H</sup>. Monokrystal y látky (H<sub>7</sub>DO2P2P<sup>Ph</sup>)(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>PO<sub>3</sub>H)·CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H·4H<sub>2</sub>O byly připraveny při pokusu o krystalizaci odpařené reakční směsi z přípravy ligandu z horké vody. Rekrystalizací tohoto materiálu byly připraveny krystaly o složení H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>Ph</sup>·7,5H<sub>2</sub>O. Krystalové struktury byly naměřeny RNDr. Ivanou Císařovou, CSc., na difraktometru Bruker D8 VENTURE Kappa Duo PHOTON100 se zářením Mo-K $\alpha$  o vlnové délce  $\lambda = 0,71073$  Å. Upřesnění krystalových struktur bylo provedeno školitelem (Tabulka 1).

Tabulka 1 Základní krystalografická data krystalových struktur stanovených v této práci

sloučenina	H <sub>6</sub> DO2P2P <sup>H</sup> ·3,5H <sub>2</sub> O	(H <sub>7</sub> DO2P2P <sup>Ph</sup> )(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> PO <sub>3</sub> H) ·CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H·4H <sub>2</sub> O	H <sub>6</sub> DO2P2P <sup>Ph</sup> ·7,5H <sub>2</sub> O
vzorec	C <sub>12</sub> H <sub>39</sub> N <sub>4</sub> O <sub>13,5</sub> P <sub>4</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>19</sub> P <sub>5</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>55</sub> N <sub>4</sub> O <sub>17,5</sub> P <sub>4</sub>
<i>M<sub>r</sub></i>	579,4	1012,65	803,60
krystalová soustava	triklinická	monoklinická	monoklinická
prostorová grupa	<i>P</i> -1	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>
<i>a</i> / Å	10,0086(5)	16,4153(4)	25,6646(9)
<i>b</i> / Å	18,6280(9)	13,7050(3)	13,6249(5)
<i>c</i> / Å	27,2248(12)	20,8878(5)	21,0046(7)
$\alpha$ / °	99,451(2)	90	90
$\beta$ / °	90,462(2)	111,438(1)	100,928(1)
$\gamma$ / °	95,921(2)	90	90
<i>V</i> / Å <sup>3</sup>	4978,6(4)	4374,0(2)	7211,6(4)
<i>Z</i>	4	4	8
<i>R</i> ; <i>R'</i>	0,0458; 0,0521	0,0547; 0,0608	0,0438; 0,0454

### 3.3 Syntetická část

#### 3.3.1 Příprava 1,7-bis(benzyloxykarbonyl)cyklenu (2)

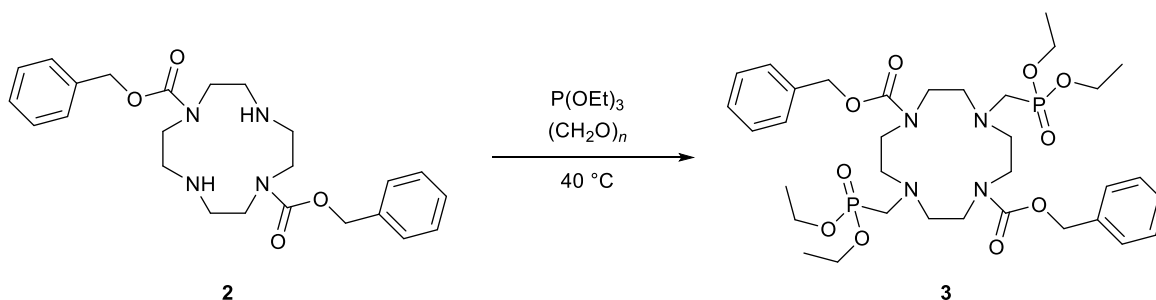


Cyklen (**1**) (5,02 g; 29 mmol) byl rozpuštěn ve 100 ml  $\text{CHCl}_3$  v 500ml baňce, která byla umístěna do ledové lázně. K baňce byla připevněna příkapávačka s 100 ml  $\text{CHCl}_3$  a 13,4 g benzyl-chloroformiátu (79 mmol; 2,7 ekv.). Směs byla příkapávána po dobu jedné hodiny. Reakční směs byla míchána přes noc za vzniku bílé suspenze. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce a pevná část byla triturována pomocí  $\text{Et}_2\text{O}$ . Suspenze byla odfiltrována na fritě (S4), pevný podíl byl několikrát promyt matečným louhem, na závěr čistým diethyletherem a sušen na vzduchu za vzniku bílého prášku **2**·2HCl (12,0 g; 80 %).

Převedení látky do formy volné báze bylo provedeno extrakcí. Do děličky byl nalit roztok  $\text{NaHCO}_3$  (20 g; 238 mmol; 20 ekv.) ve vodě. Dále bylo přisypáno 12,0 g látky **2**·2HCl (23 mmol) a poté byl přidán chloroform. Extrakce byla provedena několikrát s čistým přídatkem  $\text{CHCl}_3$ . Organická fáze byla sbírána do zábrusové Erlenmeyerovy baňky a poté bylo přidáno sušidlo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Suspenze byla přefiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO za vzniku produktu v podobě hustého žlutého oleje (11,0 g; 86 %).

Naměřená NMR spektra odpovídají publikovaným datům [54].

#### 3.3.2 Příprava 1,7-bis{[(diethoxy)fosforyl]methyl}-4,10-bis(benzyloxykarbonyl)cyklenu (3)



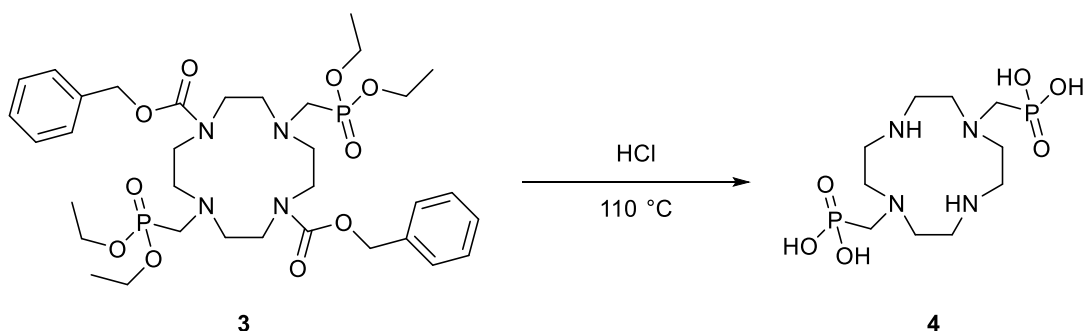
Do 100ml baňky bylo naváženo 11,0 g látky **2** ve formě volné báze (25 mmol) a zhruba 2,26 g paraformaldehydu (75 mmol; 3 ekv.). Dále bylo přidáno 40 ml  $\text{P}(\text{OEt})_3$ . Směs byla

míchána při 40 °C po dobu 14 dnů. Během této doby byla reakční směs kontrolována pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR spekter a byly postupně přidány další 3 ekv. paraformaldehydu. Reakční směs byla po zchladnutí naředěna toluenem, nezreagovaný paraformaldehyd byl odfiltrován na fritě (S4) a filtrát byl jímán do 250ml baňky. Poté byl triethylfosfit odpařen na rotační vakuové odparce, která byla napojena na dvě pumpy (kvůli vysoké teplotě varu triethylfosfitu). Vodní lázeň byla přitom vyhřívána na 75 °C. Pro snadnější odpařování  $\text{P}(\text{OEt})_3$  byla směs několikrát naředěna toluenem a odpařena. Bylo získáno 23,9 g produktu **3** ve formě hustého oleje.

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 22,87 ppm (s)

MS-ESI: (+) 741,7  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 3.3.3 Příprava $\text{H}_4\text{DO2P}$ (**4**)



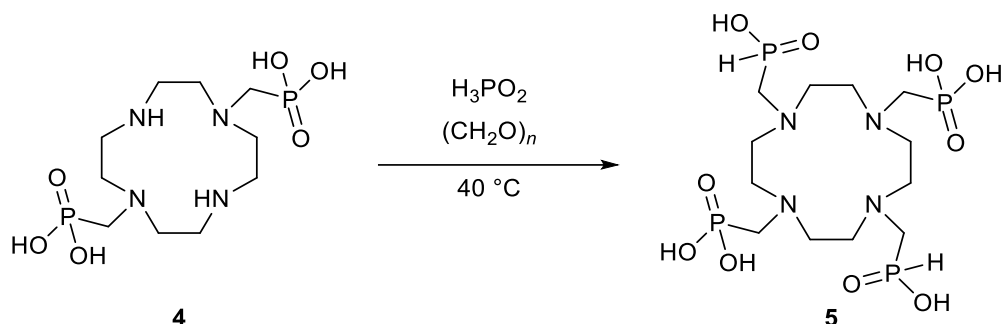
Do 250ml baňky obsahující látku **3** (23,9 g) bylo přidáno 50 ml 36% HCl. Pod zpětným chladičem byla reakční směs zahřívána při teplotě lázně 110 °C. Po dvou dnech byla baňka vytažena z olejové lázně a nechána chladnout. Poté byla reakční směs extrahována 5 × 25 ml diethyletheru [55]. Vodná fáze byla odpařena na RVO za vzniku lehce oranžového oleje. Odparek byl rozpuštěn v malém množství destilované vody a nanesen na silný kationtový iontoměnič Dowex 50 v  $\text{H}^+$  cyklu. Kolona byla promývána destilovanou vodou, dokud nebylo pH eluátu neutrální (kontrolováno univerzálními indikátorovými papírky). Tato frakce byla odpařena a byla naměřena kontrolní  $^1\text{H}$  a  $^{31}\text{P}$  NMR spektra, která potvrdila odstranění vedlejších kyselých produktů. Produkt  $\text{H}_4\text{DO2P}$  (**4**) byl eluován 800 ml 6M HCl. Eluát byl odpařen za vzniku lepivé hmoty, která byla dále triturována v acetonu, čímž bylo získáno 9,0 g (79 %) sypkého lehce nažloutlého prášku  $\text{H}_4\text{DO2P}\cdot 2,3\text{HCl}\cdot 2,8\text{H}_2\text{O}$ .

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 3,17 ppm a 3,08 ppm (bs; N- $\text{CH}_2$ ), 2,78 ppm (d; N- $\text{CH}_2$ -P)

$^{31}\text{P}$  NMR (243 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 22,11 ppm (s; N- $\text{CH}_2$ -P)

Elem. anal.: nalezeno (vypočteno pro  $\text{H}_4\text{DO}_2\text{P}\cdot 2,3\text{HCl}\cdot 2,8\text{H}_2\text{O}$ ): C 24,3 (24,3); H 6,1 (6,9); N 11,0 (11,3); Cl 16,7 (16,5)

### 3.3.4 Příprava $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{H}}$ (**5**)



Látka  $\text{H}_4\text{DO}_2\text{P}\cdot 2,3\text{HCl}\cdot 2,8\text{H}_2\text{O}$  (**4**) (2,00 g; 4,0 mmol) byla rozpuštěna v malém množství vody v 50ml baňce. Dále byla přidána 50% vodná kyselina fosforná (5 ml; 46 mmol; 11 ekv.) a zhruba 40 ml vody. Reakční směs byla míchána a zahřívána na 40 °C. Během jedné hodiny byl po malých dávkách přidáván paraformaldehyd (0,42 g; 14 mmol; 3,5 ekv.) [32,38]. Průběh reakce byl kontrolován pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR spekter a hmotnostní spektrometrie; byly dodány další 2 ekv. paraformaldehydu. Reakce byla po 14 dnech ukončena. Reakční směs byla zahuštěna na RVO. Odparek byl rozpuštěn v malém množství vody a nanesen na silný kationtový iontoměnič Dowex 50 v  $\text{H}^+$  cyklu. Kolona byla promývána vodou do zkumavek – kyselina fosforná a další kyselé nečistoty byly eluovány jako první, následované produktem  $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{H}}$  (**5**). Jednotlivé frakce byly kontrolovány pomocí TLC a detekovány Dragendorfovým činidlem. Frakce, které na činidlo reagovaly, byly kontrolovány pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR – produkt vytékal společně s kyselinou fosfornou a nebyla objevena žádná frakce obsahující čistý ligand **5**.

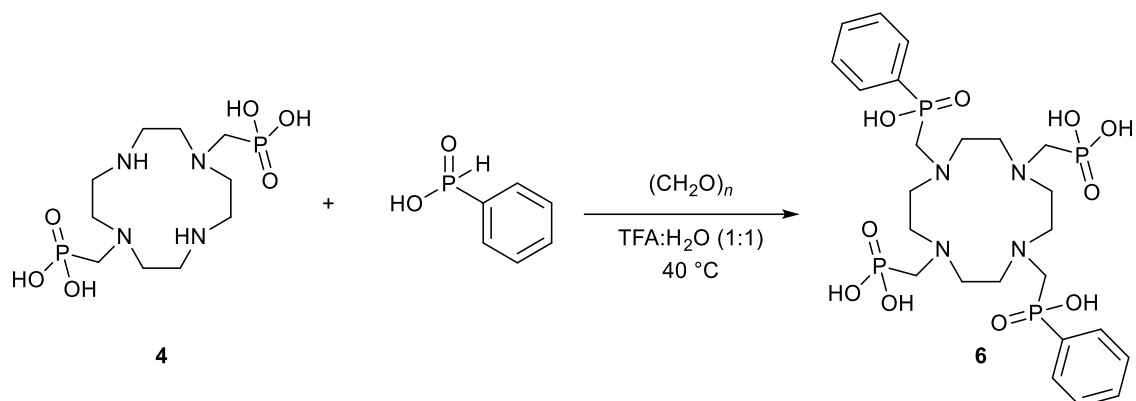
Opakovanou chromatografií na silném kationtovém iontoměniči Dowex 50 v  $\text{H}^+$  cyklu s elucí vodou byly postupně vybírány obohacené frakce, které se dále chromatograficky čistily a obohacovaly až do konečné čistoty cca 90 % (podle  $^{31}\text{P}$  NMR).

Výtěžek 50 mg (cca 2,4 %), látka zůstává mírně kontaminována kyselinou fosfornou, obsah nečistot nelze přesně určit, neboť signály produktu v  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech jsou velmi široké a nelze je přesně integrovat.

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 10): 23,21 ppm (dt;  $^1J_{\text{PH}} = 502$  Hz,  $^2J_{\text{PH}} = 8,07$  Hz; N- $\text{CH}_2\text{-P-H}$ ), 16,81 ppm (t; N- $\text{CH}_2\text{-P-OH}$ )

MS-ESI: (+) 517,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 539,3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; (-) 515,1  $[\text{M}-\text{H}]^-$

### 3.3.5 Příprava H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>Ph</sup> (6)



Do 25ml baňky byl odvážen 1,01 g H<sub>4</sub>DO2P (4) (2,3 mmol), který byl rozpuštěn v 20 ml vodné TFA (TFA/H<sub>2</sub>O 1:1). Dále byla do baňky přidána komerčně dostupná fenylfosfinová kyselina (0,97 g; 6,8 mmol; 3 ekv.) a paraformaldehyd (0,17 g; 5,8 mmol; 2,5 ekv.). Směs byla míchána při 40 °C. Reakční směs byla v průběhu reakce kontrolována pomocí <sup>31</sup>P NMR spekter – reakce probíhala velice pomalu, a proto byla postupně zvyšována teplota až na 80 °C. Reakční směs byla ponechána reagovat celkem 13 dní a bylo přidáno celkem 8 ekv. ekvivalentů paraformaldehydu.

Reakční směs byla několikrát odpařena s vodou na RVO za vzniku olejovitého produktu (2,18 g). Poté byla směs ponechána krystalizovat z vody při pokojové teplotě. Pevná látka byla odfiltrována, promyta ledovou vodou a sušena prosáváním vzduchu (0,46 g). Ve vyloučené pevné fázi byly nalezeny i krystaly vhodné kvality pro rentgenostrukturní analýzu. Z té byla zjištěna přítomnost jak produktu, tak i trifluoroctové kyseliny a také fenylfosfonové kyseliny, vzniklé oxidací výchozí fenylfosfinové kyseliny. Produkt byl proto dále přečištěn rekrystalizací z vody a triturací v acetonitrilu, jemný prášek byl odfiltrován na fritě (S4) (0,24 g; cca 16 %), podle NMR se jednalo o čistou látku.

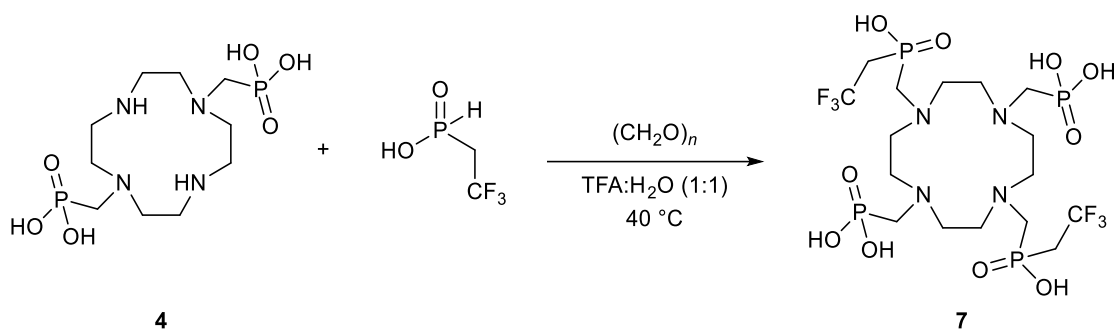
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, 25 °C, D<sub>2</sub>O): 7,68 ppm (t, 4H; P-CH-CH), 7,44 ppm (s; 6H; Ph), 3,71 ppm (d; 4H; N-CH<sub>2</sub>-P), 3,43 ppm (bs; N-CH<sub>2</sub>), 3,07 – 3,03 ppm (bs; N-CH<sub>2</sub>), 3,00 ppm (d; 4H; N-CH<sub>2</sub>-P)

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, 25 °C, D<sub>2</sub>O): 137 ppm (d; *J*<sub>CP</sub> = 119 Hz), 130 ppm (dd; *J*<sub>CP</sub> = 308 Hz, *J*<sub>CP</sub> = 9,6 Hz), 131 ppm (dd; *J*<sub>CP</sub> = 137 Hz, *J*<sub>CP</sub> = 9,4 Hz), 129 ppm (dd; *J*<sub>CP</sub> = 84,5 Hz, *J*<sub>CP</sub> = 11,6 Hz) (uhlíkové atomy fenylové skupiny), 61,4 ppm (d; <sup>1</sup>*J*<sub>CP</sub> = 121 Hz; N-CH<sub>2</sub>-P), 54,8 ppm (d; <sup>1</sup>*J*<sub>CP</sub> = 90,6 Hz; N-CH<sub>2</sub>-P) 51,9 ppm (bs), 51,9 ppm (d), 50,0 ppm (bs) (uhlíkové atomy makrocyklu)

<sup>31</sup>P NMR (243 MHz, 25 °C, D<sub>2</sub>O): 27,89 ppm (s; N-CH<sub>2</sub>-P-Ph), 5,65 ppm (s; N-CH<sub>2</sub>-P-OH)

MS-ESI: (+) 669,5 [M+H]<sup>+</sup>

### 3.3.6 Příprava H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfe</sup> (7)



Kyselina TFEPA ve formě amonné soli (1,75 g) byla nanesena na silný kationtový iontoměnič Dowex 50 v H<sup>+</sup> cyklu (140 ml). Kolona byla promývána vodou, dokud nevytekla veškerá kyselina (pH eluátu neutrální). Čistá TFEPA ve formě volné kyseliny byla zahuštěna na rotační vakuové odparce.

V 25ml baňce byla rozpuštěna látka (4) (1,00 g; 2,3 mmol) v zředěné TFA (TFA/H<sub>2</sub>O 1:1; 20 ml). Do baňky bylo přidáno 0,84 g kyseliny TFEPA (5,7 mmol; 2,4 ekv.) a dále byl přisypán paraformaldehyd (0,17 g; 5,8 mmol; 2,5 ekv.). Reakční směs byla míchána při 70 °C. Reakce probíhala 8 dní, během kterých bylo průběžně po dávkách přidáno celkem dalších 5 ekv. paraformaldehydu.

Reakční směs byla několikrát odpařena s vodou na RVO za vzniku produktu ve formě oleje. Do baňky byla poté přidána směs EtOH/NH<sub>3</sub> v poměru 25:1, směs byla zahřáta a nechána krystalizovat při laboratorní teplotě. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty zchlazeným roztokem EtOH/NH<sub>3</sub> (25:1), došlo však k jejich rozpuštění. Směs byla poté odpařena a triturována v EtOH za vzniku bílého prášku (0,47 g; cca 30 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, 25 °C, D<sub>2</sub>O): 3,57 ppm (bs; 8H; N-CH<sub>2</sub>), 3,22 ppm (d; 4H; N-CH<sub>2</sub>-P), 3,13 ppm (bs; 8H; N-CH<sub>2</sub>), 2,95 ppm (d; 4H; N-CH<sub>2</sub>-P), 2,58 ppm (p; 4H; P-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, 25 °C, D<sub>2</sub>O): 125,9 ppm (q; <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> 276 Hz CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>), 54,6 ppm (d; <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> 302 Hz, N-CH<sub>2</sub>-P), 51,9 ppm (bs; N-CH<sub>2</sub>), 52,2 a 51,3 ppm (d; N-CH<sub>2</sub>-P), 50,5 ppm (bs; N-CH<sub>2</sub>), 36,6 ppm (dq; CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>)

<sup>19</sup>F NMR (565 MHz, 25 °C, D<sub>2</sub>O): -57,1 ppm (td; 6F; P-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>)

<sup>31</sup>P NMR (243 MHz, 25 °C, D<sub>2</sub>O): 27,62 ppm (s; P-CH<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>), 6,79 ppm (t; P-CH<sub>2</sub>-OH)

MS-ESI: (+) 681,3 [M+H]<sup>+</sup>; (-) 679,2 [M-H]<sup>-</sup>



### 3.4 Příprava komplexů

Byly připraveny komplexy  $\text{Eu}^{3+}$  a  $\text{Yb}^{3+}$  ligandu  $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{Ph}}$  (6) a ligandu  $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfc}}$  (7). Z ligandů byly připraveny vodné roztoky o koncentraci cca 0,035 M. K ligandům bylo přidáno určité množství příslušné  $\text{Ln}^{3+}$  soli ve formě roztoku, jejichž koncentrace byla stanovena titračně s přesností  $10^{-5}$  M. Pro komplexace byly použity vodné roztoky 0,05742 M  $\text{EuCl}_3$  a 0,04817 M  $\text{YbCl}_3$ .

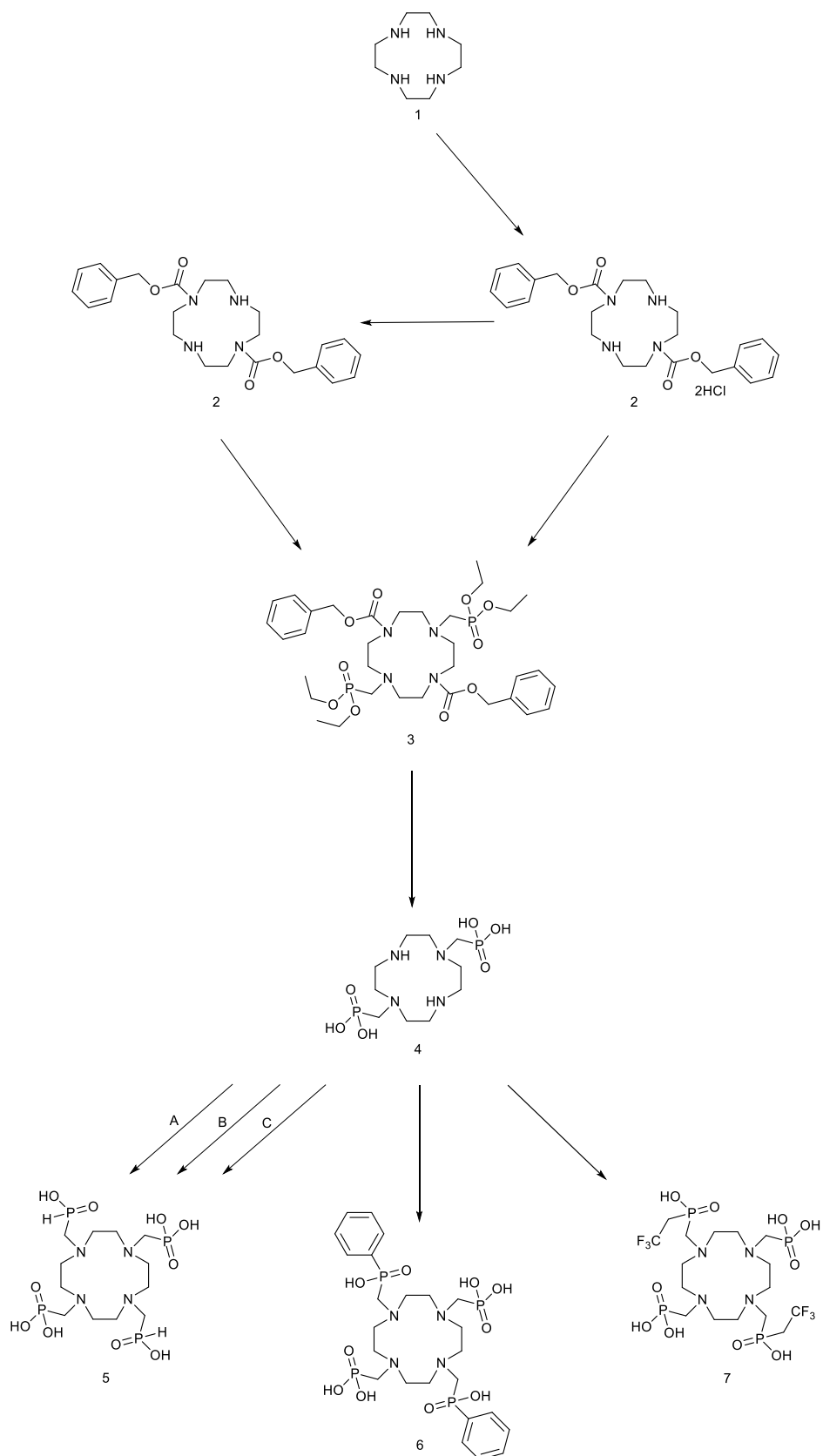
Komplexy ligandu  $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{Ph}}$  byly připraveny s použitím nadbytku příslušné  $\text{Ln}^{3+}$  soli. Přebytek kovu byl vysrážen pomocí NaOH ve formě hydroxidu (pH bylo upraveno na hodnotu cca 10). Komplexy byly zahřívány za stálého míchání přes noc při 60 °C.

V případě ligandu  $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfc}}$  bylo použito podstechiometrické množství (0,9 ekv.) příslušné soli a pH reakční směsi bylo upraveno na hodnoty 7 až 8 pomocí vodného roztoku NaOH. Během postupného přidávání NaOH po okamžitém zvýšení pH docházelo k jeho postupnému snižování vlivem pomalé komplexace. Pro kvantitativní zakomplexování  $\text{Ln}^{3+}$  iontu do kavity ligandu byl komplex míchán tři dny.

### 3.5 NMR pH titrace

NMR titrace byla provedena na spektrometru Varian Inova 300 s rezonanční frekvencí 300 MHz pro jádro  $^1\text{H}$ , 282 MHz pro jádro  $^{19}\text{F}$  a 121 MHz pro jádro  $^{31}\text{P}$ . Vzorek ligandů  $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfc}}$  a  $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{Ph}}$  byl rozpuštěn v  $\text{D}_2\text{O}$ . Jako titrační činidlo byla použita zředěná 10% a 5% HCl a dále 10M, 5M a 2M roztok NaOH. Titrační činidla byla přidávána pomocí automatické pipety tak, aby bylo docíleno rozdílu pH mezi jednotlivými body měření zhruba 0,3 jednotky pH. Titrace byla provedena v rozsahu pH zhruba 1 až 13. Vzorky komplexů ( $\text{Eu}^{3+}$  a  $\text{Yb}^{3+}$ ) obou ligandů byly připraveny rozpuštěním do  $\text{D}_2\text{O}$ . Titrace byla provedena v rozsahu pH 3 až 10 po 0,5 jednotce pH. Spektra byla zpracována v programu MestRenova.

## 4. Výsledky a diskuze



Obrázek 10 Souhrnné schéma přípravy ligandů

Syntéza cílových ligandů (Obrázek 10) vychází z makrocyclického prekursoru **4**, ke kterému byly zpočátku navrženy dvě obdobné reakční cesty lišící se formou látky **2** – ve formě hydrochloridu a ve formě volné báze. Ligand **5** byl připraven za třech různých reakčních podmínek. Veškeré syntetické a čistící kroky jsou diskutovány v následujících kapitolách.

#### 4.1 Příprava H<sub>4</sub>DO<sub>2</sub>P (**4**)

Příprava *trans*-dichráněného cykленu probíhala podle dříve publikovaného postupu [54]. Cyklen byl ponechán reagovat s benzyl-chloroformiátem v chloroformu za vzniku látky **2**. Po přečištění reakční směsi byl získán produkt **2** ve formě hydrochloridu. Výtěžek reakce je 80 %. Volná báze byla připravena extrakcí roztoku 2·HCl ve vodném NaHCO<sub>3</sub> chloroformem. Takto byl získán produkt **2** ve formě velmi hustého oleje. Následující Mannichovy reakce byly prováděny jak s *trans*-dichráněným cyklenem ve formě hydrochloridu, tak ve formě volné báze.

Látka **3** byla připravena reakcí látky **2** (ve formě hydrochloridu a také ve formě volné báze) s paraformaldehydem v nadbytku triethylfosfitu jako rozpouštědla. Směs reagovala po dobu 10 dní při teplotě 40 °C. Průběh reakce byl kontrolován pomocí <sup>31</sup>P NMR spekter, z nichž bylo zřejmé, že meziprodukt **2** ve formě volné báze reaguje poněkud rychleji. Vzhledem k vysoké teplotě varu P(OEt)<sub>3</sub> bylo k jeho odpaření potřeba poměrně vysoké vakuum, jehož bylo dosaženo za pomoci dvou pump. Pro jeho snadnější odpaření byla směs také několikrát naředěna toluenem a opakovaně odpařována. Přesto se nepodařilo zbývající triethylfosfit z reakční směsi odpařit úplně, což ale vzhledem k následující reakci nebyl přílišný problém.

Odparek surové látky **3** byl zahříván pod zpětným chladičem v 36% kyselině chlorovodíkové. Reakční směs byla po odpaření extrahována diethyletherem k odstranění nepolárních bočních produktů a odparek byl nanesen na silný kationtový iontoměnič Dowex 50 v H<sup>+</sup> cyklu. Produkt **4** byl eluován ve formě hydrochloridu (9,0 g; 79 %).

Obě reakční cesty (z hydrochloridu **2** a z volné báze **2**) vedly k cílovému meziproduktu **4** s podobnými výtěžky (z hydrochloridu 77 %; z volné báze 86 %), avšak při přípravě intermediátu **3** reagovala forma volná báze **2** o něco rychleji. Při opakování reakčních kroků v rámci optimalizace syntézy byla tedy používána již výhradně forma volné báze **2**.

## 4.2 Příprava $H_6DO_2P_2P^H$ (5)

Ligand **5** byl připraven reakcí Mannichova typu – reakcí  $H_4DO_2P$  (**4**) s paraformaldehydem a kyselinou fosforovou. Přitom byly testovány různé reakční podmínky. Nejprve byla látka **4** ponechána reagovat s paraformaldehydem v silném nadbytku 50% kyseliny fosforové [32,56]. Reakční směs byla poté několikrát čištěna na silném kationtovém iontoměníči Dowex 50 v  $H^+$  cyklu, čímž se postupně obohacovala. Produkt se však nepodařilo zcela oddělit od nadbytku kyseliny fosforové – konečná čistota produktu byla cca 90 %. S touto šarží byly provedeny orientační NMR měření (viz kapitoly 4.5 Příprava komplexů a 4.7.1  $H_6DO_2P_2P^H$ ). Dále byla reakční směs několikrát triturována pomocí THF, čištění bylo relativně účinné, ale ani v tomto případě nebyl získán zcela čistý produkt. V neposlední řadě byla reakční směs čištěna chromatografií na  $SiO_2$ . Mobilní fází  $EtOH/NH_3$  (25:1) byly eluovány vedlejší produkty včetně kyseliny fosforové a hydroxymethylfosforové. Ligand **5** byl eluován mobilní fází IPAV (izopropanol, amoniak, voda) (7:3:3). Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny za vzniku mikrokrystalického látky, avšak  $^{31}P$  NMR spektra prokázala přítomnost nečistoty, která byla produktu chemicky velmi podobná. Tato nečistota se nepodařila s jistotou identifikovat (patrně se jednalo o derivát s částečně nahydroxomethylovanými P–H vazbami na pendantních skupinách).

Jako další reakční podmínky byl testován lehký nadbytek kyseliny fosforové. Látka **4** byla ponechána reagovat s paraformaldehydem a s 4 ekv. kyseliny fosforové v prostředí 6M HCl jako rozpouštědla a dále v prostředí vodné TFA (1:1). V obou případech reakce probíhala obdobnou rychlostí a po ukončení reakce reakční směs stále obsahovala velké množství kyseliny fosforové. Směsi byly čištěny opakovanou triturací v THF, čímž se podařilo odstranit kyselinu fosforovou i kyselinu hydroxymethylfosforovou.  $^{31}P$  NMR spektra však neprokázala přítomnost zcela čistého produktu. Pravděpodobně se opět jednalo o hydroxymethylovanou formu látky **4**. Dle  $^{31}P$  NMR spektra je procentuální zastoupení čtěného produktu  $H_6DO_2P_2P^H$  cca 46 %.

## 4.3 Příprava $H_6DO_2P_2P^{Ph}$ (6)

Ligand **6** byl připravován reakcí látky **4** s komerčně dostupnou fenylfosfinovou kyselinou a paraformaldehydem v prostředí zředěné TFA (TFA/ $H_2O$  1:1). Reakční směs byla ponechána reagovat, dokud  $^{31}P$  NMR směsi neprokázalo vymizení signálu fenylfosfinové kyseliny. Reakční směs byla poté několikrát odpařena s vodou. Produkt byl

ponechán krystalizovat z vody za laboratorní teploty. Rentgenostrukturní analýza monokrystalu však prokázala přítomnost nejen produktu, ale také kyseliny trifluoroctové a dále kyseliny hydroxymethyl(fenyl)fosfinové. Krystalky byly proto přečištěny pomocí acetonitrilu za vzniku jemné suspenze a produkt byl odfiltrován (výtěžek cca 16 %). Produkt lze rekrystalizovat z horké vody.

#### 4.4 Příprava $H_6DO_2P_2P^{tfe}$ (7)

Ligand 7 byl připravován reakcí látky  $H_4DO_2P$  (4) s paraformaldehydem a 2,2,2-trifluorethylfosfinovou kyselinou v prostředí zředěné TFA (TFA/ $H_2O$  1:1). Reakce byla kontrolována pomocí  $^{31}P$  NMR spektroskopie a byla ukončena po vymizení signálu kyseliny TFEPA. Odparek reakční směsi byl triturován v EtOH za vzniku produktu ve formě bílého prášku (0,47 g; cca 30 %).

Během optimalizace čištění byly vyzkoušeny také další čistící metody. Reakční směs byla čištěna chromatografií na silném kationtovém iontoměničích v  $H^+$  cyklu. Pomocí chromatografie se však nepodařilo oddělit produkt od zbylých kyselých nečistot. Dále byla testována triturace do velkého objemu THF, která se ukázala jako nedostačující. Vzhledem k tomu, že po přikapání reakční směsi (rozpuštěné v malém objemu vody) do velkého objemu tetrahydrofuranu nedocházelo ke vzniku sraženiny, bylo prakticky nemožné od sebe jednotlivé složky oddělit. Docházelo také k přechodu chtěného produktu do složky THF. Tímto způsobem se podařilo vyčistit pouze 87 mg ligandu 7. Dalším způsobem čištění reakční směsi byla chromatografie na  $SiO_2$  za použití mobilní fáze EtOH/ $NH_3$  (25:1) a IPA V (izopropanol, amoniak, voda) (7:3:3). Ani v tomto případě se však nepodařilo zcela oddělit produkt od hydroxymethyl(2,2,2-trifluorethyl)fosfinové kyseliny.

#### 4.5 Příprava komplexů

Byly připraveny komplexy  $Eu^{3+}$  a  $Yb^{3+}$  ligandů  $H_6DO_2P_2P^{Ph}$  (6) a  $H_6DO_2P_2P^{tfe}$  (7). Komplexace probíhaly bezproblémově, avšak roztoky reakčních směsí komplexů ligandu 6 šlo jen těžko odpařit z důvodu velkého množství vznikající pěny. Proto byla z komplexů nadbytečná voda odstraněna pomocí lyofilizace.

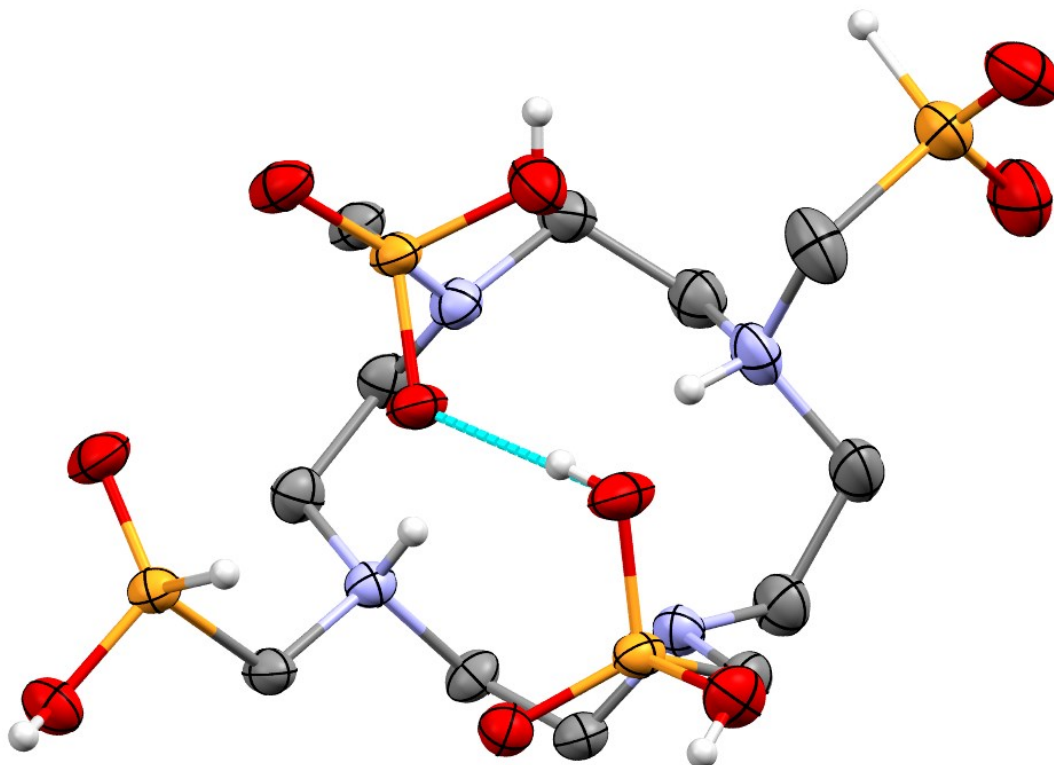
S komplexy  $Eu-H_6DO_2P_2P^{Ph}$ ,  $Yb-H_6DO_2P_2P^{Ph}$ ,  $Eu-H_6DO_2P_2P^{tfe}$  a  $Yb-H_6DO_2P_2P^{tfe}$  byla následně provedena NMR titrace; výsledky titrace jsou diskutovány dále.

V případě ligandu  $H_6DO_2P_2P^H$  (5) byl zkušebně připraven  $Yb^{3+}$  komplex.  $^{31}P$  NMR však prokázalo velice komplikované spektrum, a to i přes relativně vysokou čistotu daného

vzorku ligandu (cca 90 %). Lze proto usuzovat na velké množství izomerů tohoto komplexu. Vzhledem k značně složitému spektru bylo od tohoto ligandu upuštěno a další komplexace a měření provedeny nebyly.

#### 4.6 Krystalové struktury ligandů

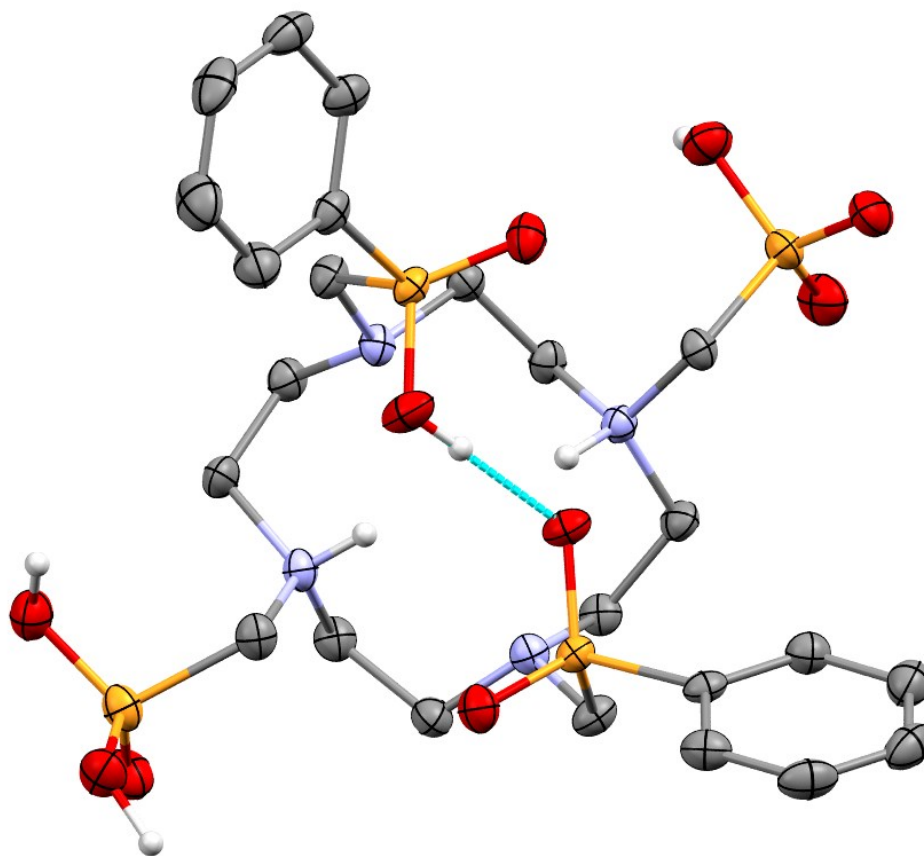
Molekulová struktura ligandu  $H_6DO_2P_2P^H$  (Obrázek 11) potvrdila předpokládanou strukturu produktu.



Obrázek 11 Molekulová struktura ligandu  $H_6DO_2P_2P^H$  z krystalové struktury  $H_6DO_2P_2P^H \cdot 3,5H_2O$ . Atomy vodíku vázané na atomech uhlíku jsou pro přehlednost vynechány. Intramolekulární vodíková vazba mezi pendantními fosfonátovými skupinami je zobrazena tyrkysovou barvou.

V případě přípravy ligandu  $H_6DO_2P_2P^{Ph}$  byl učiněn pokus o přímou krystalizaci produktu z reakční směsi. Ve vyloučeném produktu byly nalezeny krystaly vhodné pro rentgenostrukturní analýzu. Ta odhalila, že se jedná o adukty s kyselinou fenylfosfonovou (vzniklou oxidací výchozí fenylfosfinové kyseliny) a s kyselinou trifluoroctovou, která byla při reakci použita jako rozpouštědlo. Složení krystalů bylo určeno jako  $(H_7DO_2P_2P^{Ph})(C_6H_5PO_3H) \cdot CF_3CO_2H \cdot 4H_2O$ , nicméně vznik cílového ligandu  $H_6DO_2P_2P^{Ph}$  byl potvrzen. Rekrystalizací vyčištěného ligandu z horké vody pak byly připraveny krystaly o složení  $H_6DO_2P_2P^{Ph} \cdot 7,5H_2O$ . V obou krystalových strukturách mají molekuly ligandu

$H_6DO_2P_2P^{Ph}$  velmi podobná prostorová uspořádání, proto je na Obrázek 12 uvedena jen molekulová struktura nalezená v krystalové struktuře  $H_6DO_2P_2P^{Ph}\cdot 7,5H_2O$ .



Obrázek 12 Molekulová struktura ligandu  $H_6DO_2P_2P^{Ph}$  z krystalové struktury  $H_6DO_2P_2P^{Ph}\cdot 7,5H_2O$ . Atomy vodíku vázané na atomech uhlíku jsou pro přehlednost vynechány. Intramolekulární vodíková vazba mezi pendantními fosfinátovými skupinami je zobrazena tyrkysovou barvou.

#### 4.7 pH NMR titrace ligandů a jejich komplexů

Protonizace ligandů a komplexů byla studována pomocí pH NMR titrace jader  $^1H$ ,  $^{31}P$  a  $^{19}F$ . Jednotlivé signály jader  $^1H$  se od sebe nepodařilo zcela rozlišit u žádné ze studovaných sloučenin a proto nebyla získaná data dále zpracována. Titrace jader  $^{31}P$  poskytla vhodná data, jejichž fitováním byly získány hodnoty  $pK_A$ . Výsledky jednotlivých měření jsou diskutovány dále.

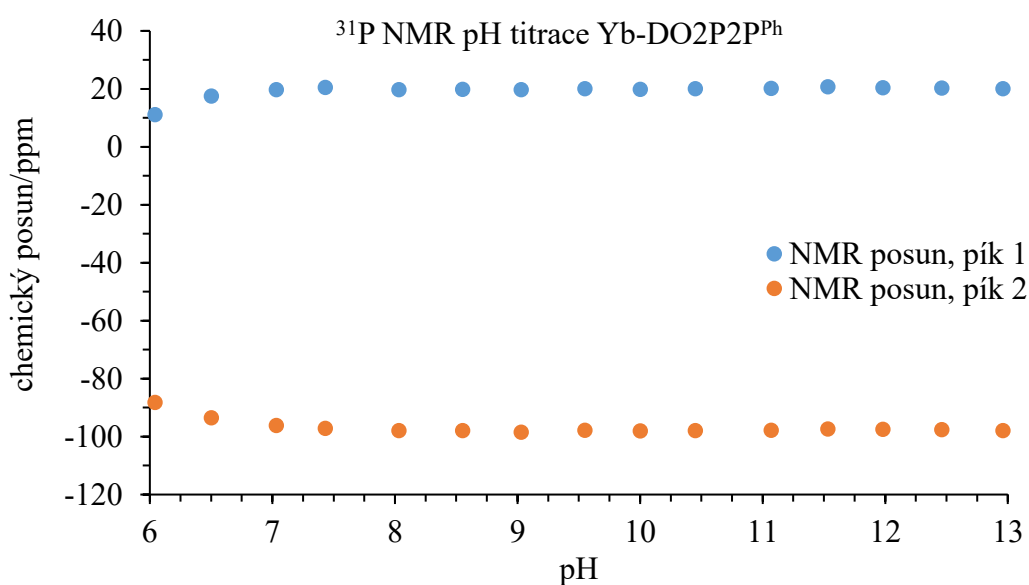
##### 4.7.1 $H_6DO_2P_2P^H$

Titrace ligandu  $H_6DO_2P_2P^H$  nebyla provedena z důvodu jeho nedostatečné čistoty. Dalším důvodem byl fakt, že tento ligand má v kyselé oblasti pH velice široké  $^{31}P$  NMR signály, jejichž pozici nebylo možné přesně určit (při některých pH je dokonce není možné ani pozorovat).

#### 4.7.2 H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>Ph</sup>

pH NMR titrace jádra <sup>31</sup>P pro daný ligand ukázala široké, od sebe nerozlišitelné signály v kyselé oblasti pH. Dalším problémem pak byla nízká rozpustnost ligandu a jeho opětovná krystalizace v NMR kyvetě. Naměřená data proto nebylo možné dále zpracovat a využít pro výpočet protonizačních konstant daného systému.

Spektra <sup>31</sup>P NMR komplexů Eu–H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>Ph</sup> a Yb–H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>Ph</sup> poskytují v bazické oblasti pH úzké signály, které se se snižující hodnotou pH postupně rozšiřují. V obou případech došlo při pH pod 6 k vytvoření bílé sraženiny, která znemožnila další měření. Závislost chemických posunů <sup>31</sup>P (Yb–H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>Ph</sup>) na pH je vynesena na Obrázek 13. Získaná data však nelze dále využít pro výpočet protonizačních konstant.

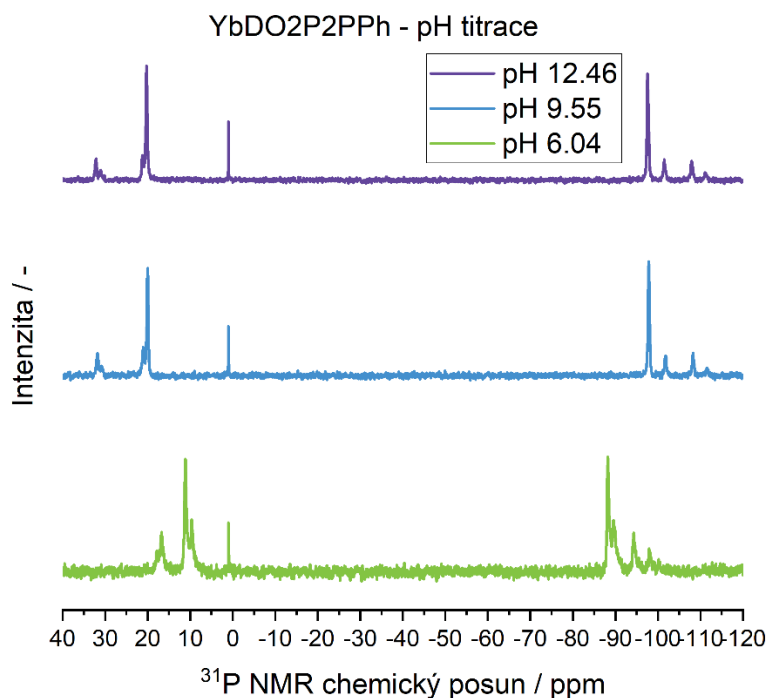


Obrázek 13 pH NMR titrace komplexu Yb-DO2P2P<sup>Ph</sup>

Na základě získaných dat nelze s jistotou přiřadit jednotlivé píky fosfonátovému nebo fosfinátovému pendantnímu ramenu dané sloučeniny. Z dostupné literatury [28] se však lze domnívat, že pík s posunem cca –88 až –98 ppm (Obrázek 13, pík 2) by mohl patřit fenylfosfinátovému pendantnímu ramenu.

Na Obrázek 14 lze vidět změnu šířky a posunu signálů <sup>31</sup>P v závislosti na pH pro komplex Yb-DO2P2P<sup>Ph</sup>. Ve spektru lze pozorovat několik sad signálů. Dva majoritní píky patří symetrickému izomeru *RR* (nebo *SS*, při jedné dané konformaci chelátových kruhů  $\Delta(\delta\delta\delta\delta)$  nebo  $\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)$ , správná kombinace deskriptorů však nelze určit). Čtyři minoritní píky (v integrálním poměru 1:1:1:1) lze přiřadit izomeru *RS* a další dva minoritní píky pak patří izomeru *SS* (nebo *RR*)





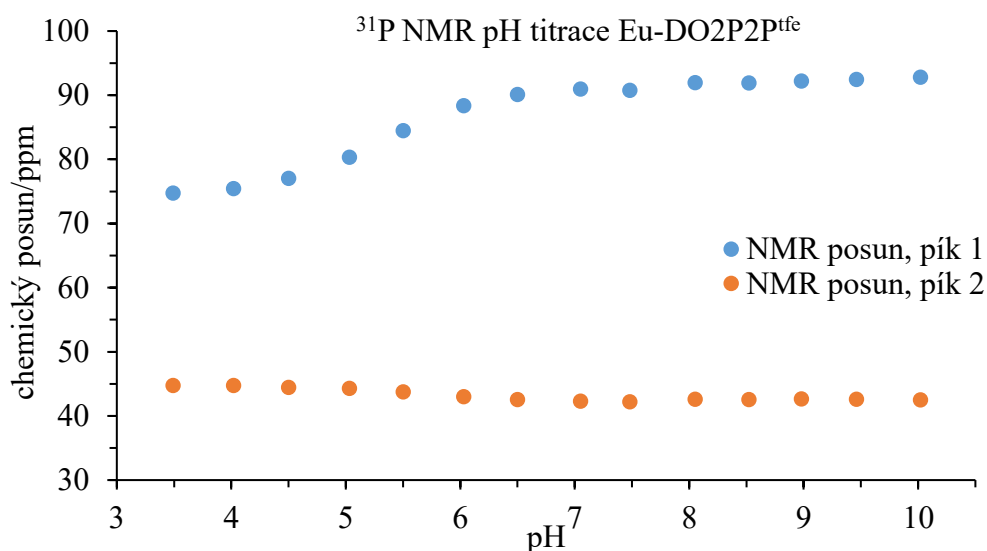
Obrázek 14  $^{31}\text{P}$  NMR titrace komplexu Yb-DO2P2P<sup>Ph</sup>, vybraná spektra při hodnotách pH 12,46, 9,55 a 6,04; referenční pik 1 ppm

Přítomnost dalších izomerů lze pozorovat i v  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech komplexu Eu–H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>Ph</sup>. Vzhledem ke špatné rozpustnosti dané látky se nepodařilo získat dobře rozlišená spektra.

#### 4.7.3 H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfe</sup>

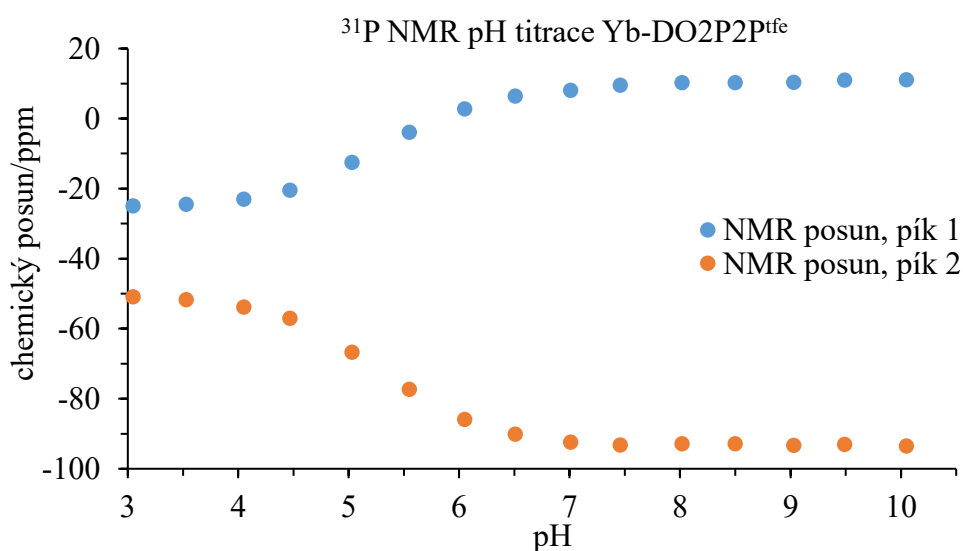
Pro studium ligandu H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfe</sup> a jeho komplexů s Eu<sup>3+</sup> a Yb<sup>3+</sup> ionty byla provedena pH NMR titrace jádra  $^{31}\text{P}$  a  $^{19}\text{F}$ . Chemický posun trifluorethylfosfinového pendantního ramene pro  $^{19}\text{F}$  NMR je dle očekávání téměř konstantní, a proto nebyla tato data využita pro výpočet protonizačních konstant. V  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech lze opět pozorovat rozšiřování signálů v kyselé oblasti pH, avšak zde není problém s rozpustností látky.

Závislost chemických posunů  $^{31}\text{P}$  NMR na pH pro komplexy Eu–H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfe</sup> a Yb–H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfe</sup> jsou zobrazeny na Obrázek 15 a Obrázek 16.



Obrázek 15 pH NMR titrace komplexu Eu-DO2P2P<sup>tfе</sup>

Na základě naměřených dat (Obrázek 15) [32,57] pro komplex Eu-DO2P2P<sup>tfе</sup> by se dalo usuzovat, že protonizovatelné fosfonátové pendantní rameno odpovídá píku 1, neboť v tomto případě dochází k velké změně chemického posunu s pH. Dostupná literatura [20,28,32] však ukazuje, že chemické posuny píku 1 jsou v oblasti chemických posunů typických pro fosfinátová pendantní ramena; fosfonátovému ramenu by tak zřejmě odpovídaly chemické posuny píku 2, které jsou víceméně konstantní. Přiřazení píku konkrétnímu pendantnímu ramenu je proto nejednoznačné.



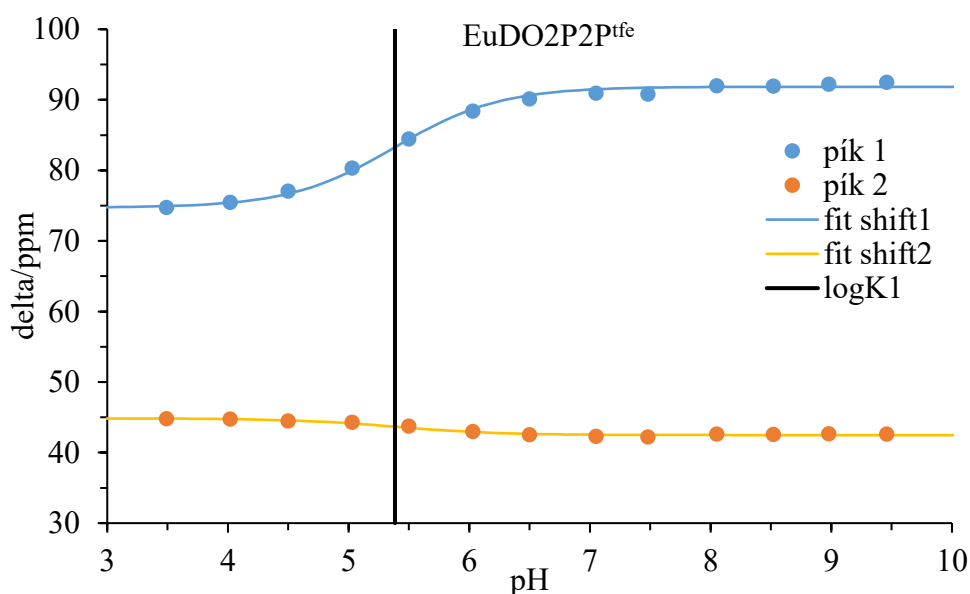
Obrázek 16 pH NMR titrace komplexu Yb-DO2P2P<sup>tfе</sup>

V případě komplexu Yb-H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfе</sup> byla pozorována výrazná změna chemického posunu u obou píků, respektive pendantních ramen, a její velikost je v obou případech

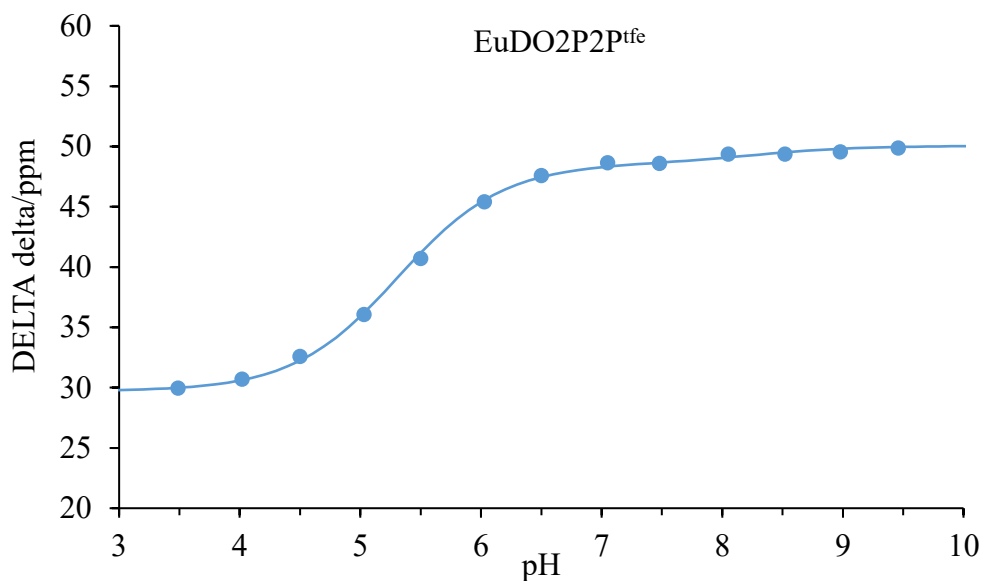
zhruba stejná (Obrázek 16). To je velice překvapivé zjištění vzhledem k silně kyselému charakteru trifluorethylfosfinového pendantního ramene, které se v dané oblasti pH nijak neprotonizuje. Lze proto spekulovat například nad vznikem intramolekulární vodíkové vazby po protonizaci fosfonátové skupiny. Tím by došlo ke geometrické změně (změně pozice atomu fosforu vzhledem k paramagnetickému iontu), což by následně mohlo výrazně ovlivnit i chemický posun kyselého  $-\text{CH}_2\text{P}(\text{O})\text{OH}(\text{CH}_2\text{CF}_3)$  pendantního ramene. Porovnání dat s literaturou [32,57] však nepřináší jednoznačné vysvětlení a nebylo proto možné přiřadit píky jednotlivým pendantním ramenům.

Z naměřených dat závislostí chemických posunů na pH byly vypočítány hodnoty protonizačních konstant komplexů  $\text{Eu}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  a  $\text{Yb}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$ . Z důvodu malého počtu dat byla vypočtena průměrná hodnota  $\text{p}K_{\text{A}}$  obou pendantních fosfonátových skupin. Data byla fitována a hodnoty  $\text{p}K_{\text{A}}$  byly vypočteny pomocí programu Opium.

Obrázek 17 ukazuje fitování naměřených dat, které poskytuje velice dobrou shodu s experimentálními body. Pro komplex  $\text{Eu}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  byla vypočtena průměrná hodnota  $\text{p}K_{\text{A}}$  5,4. Na Obrázek 18 je pak vidět závislost rozdílu chemických posunů obou majoritních signálů na pH. Největší změna však bohužel vzhledem k nízké hodnotě  $\text{p}K_{\text{A}}$  leží v příliš kyselé oblasti vzhledem k běžným fyziologickým podmínkám.

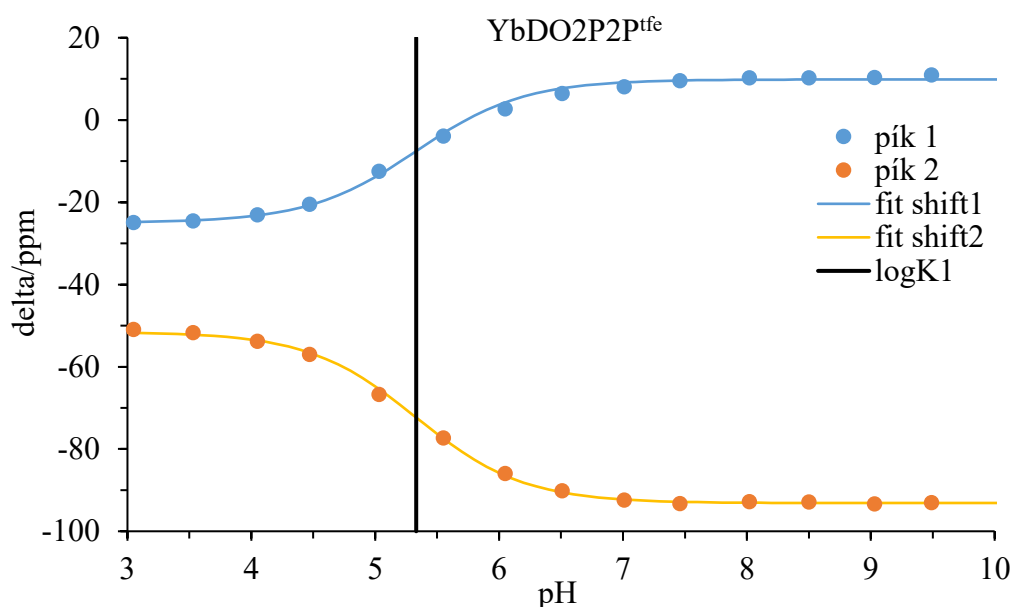


Obrázek 17 Fitování naměřených dat pro komplex  $\text{Eu}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$

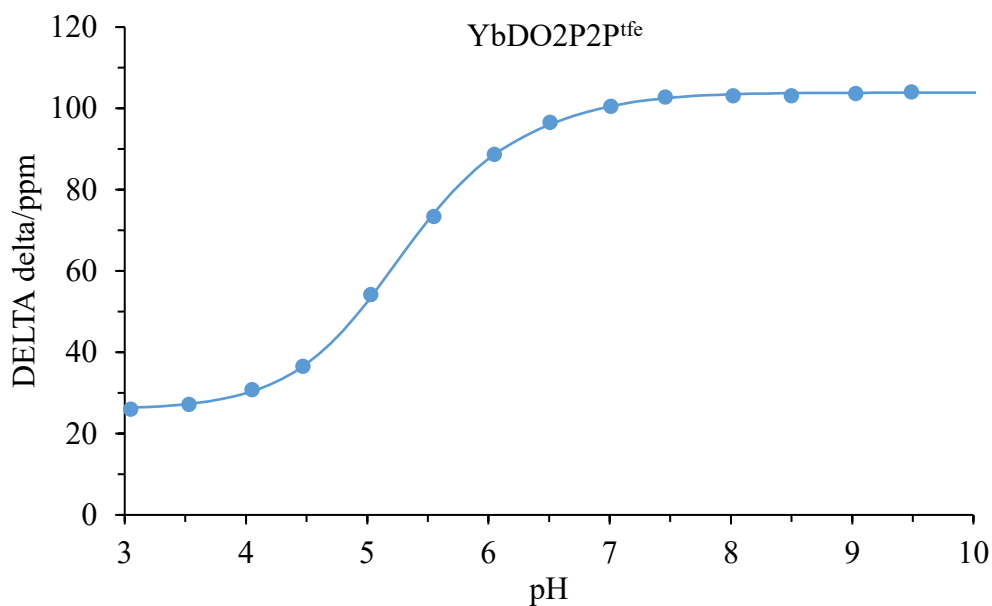


Obrázek 18 Závislost rozdílu chemických posunů signálů komplexu  $\text{Eu-H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  na pH

$^{31}\text{P}$  NMR titrace komplexu  $\text{Yb-H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  poskytla data, jejichž fitováním (Obrázek 19) byla vypočtena průměrná hodnota  $\text{pK}_A$  5,3. To je v souladu s tím, že ion  $\text{Yb}^{3+}$  je menší, než ion  $\text{Eu}^{3+}$ , a více polarizuje koordinovaný atom kyslíku (a potažmo celou fosfonátovou skupinu). Ačkoliv změna rozdílu chemických posunů je výraznější než v předchozím případě (Obrázek 20), leží bohužel tyto změny mimo oblast fyziologických hodnot pH.

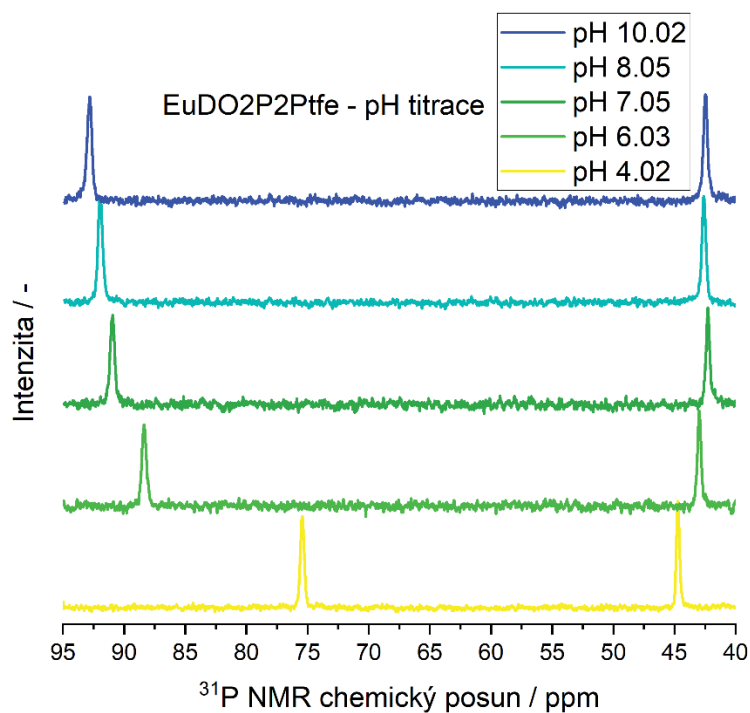


Obrázek 19 Fitování naměřených dat pro komplex  $\text{Yb-H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$

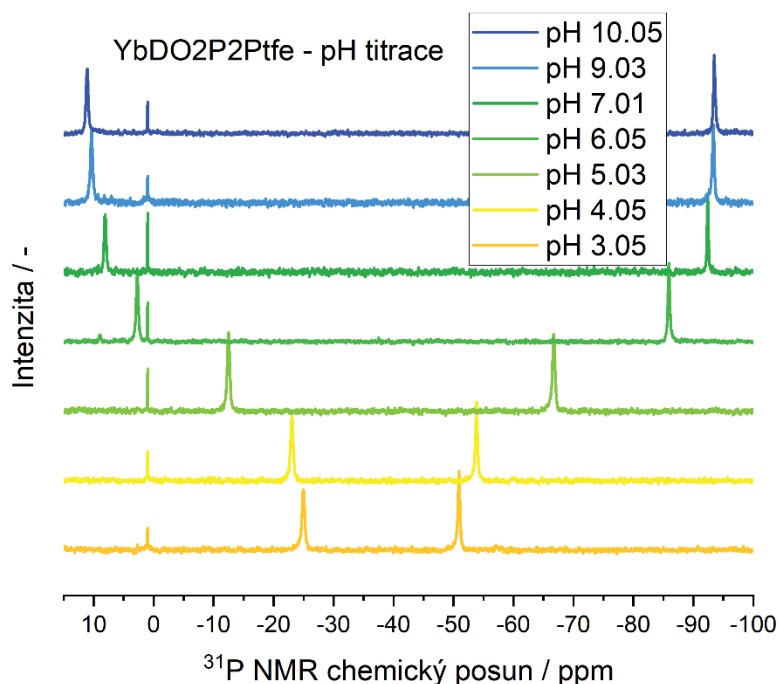


Obrázek 20 Závislost rozdílu chemických posunů signálů komplexu Yb–H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfe</sup> na pH

Komplexy Eu–H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfe</sup> (Obrázek 21) a Yb–H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfe</sup> (Obrázek 22) obsahují ve svých spektrech pouze jeden majoritní signál, který odpovídá symetrickému izomeru *RR* (nebo *SS*, při jedné dané konformaci chelátových kruhů  $\Delta(\delta\delta\delta\delta)$  nebo  $\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)$ , kombinaci deskriptorů však nelze určit), což daná spektra značně zjednodušuje a umožňuje tak jejich snadnější interpretaci. Připravený systém je tak slibným odrazovým můstkem pro přípravu dalších derivátů vykazujících vyšší (fyziologicky relevantnější) hodnoty  $pK_A$ .



Obrázek 21 <sup>31</sup>P NMR titrace komplexu Eu–H<sub>6</sub>DO2P2P<sup>tfe</sup>, NMR spektra při vybraných hodnotách pH



Obrázek 22  $^{31}\text{P}$  NMR titrace komplexu  $\text{Yb-H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfе}}$ , NMR spektra při vybraných hodnotách pH; referenční pik 1 ppm

#### 4.8 Měření $T_1$ a $T_2^*$ relaxačních časů ligandů a jejich komplexů

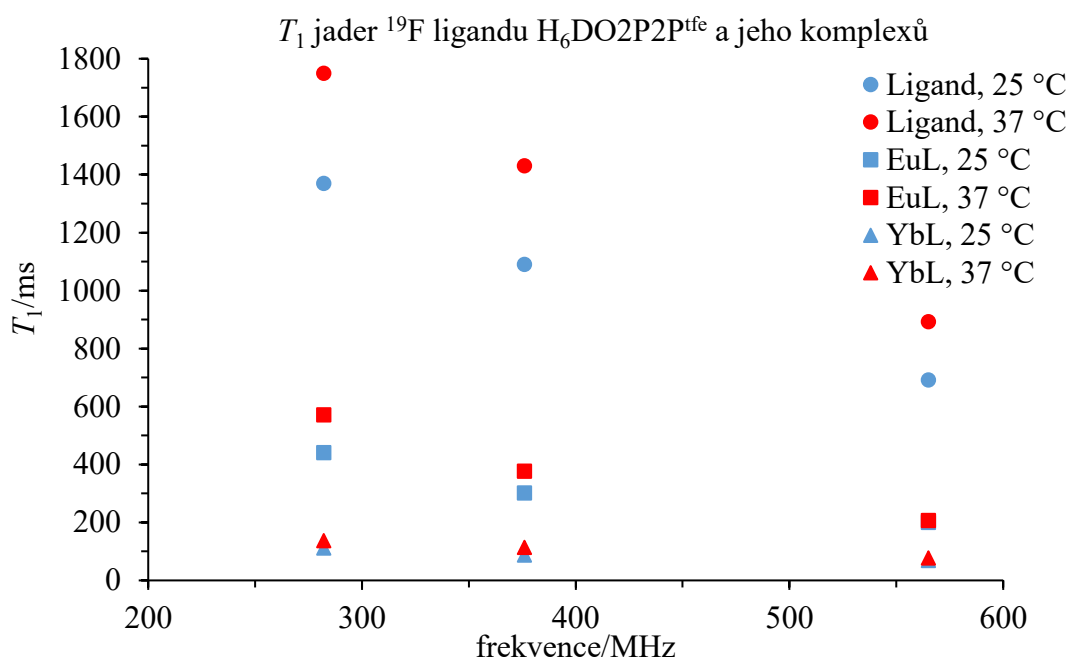
Relaxační časy  $T_1$  signálů  $^{31}\text{P}$  volných ligandů  $\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{Ph}}$ ,  $\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfе}}$  a jejich komplexů byly naměřeny při teplotě 25 °C (Tabulka 2). Relaxační časy komplexu  $\text{Eu-H}_6\text{DO2P2P}^{\text{Ph}}$  se naměřit nepodařilo. V případě ligandu  $\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfе}}$  a jeho komplexů byly také měřeny relaxační časy  $T_1$  signálů  $^{19}\text{F}$  při 282, 376 a 565 MHz, a to při teplotě 25 a 37 °C (Tabulka 3, Obrázek 23). Relaxační časy byly naměřeny pomocí pulzní sekvence „Inversion Recovery“. Pro ligand  $\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfе}}$  byl dále naměřen relaxační čas  $T_2$  metodou CPMG. Relaxační čas  $T_2^*$  komplexů  $\text{Eu-H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfе}}$  a  $\text{Yb-H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfе}}$  pro různá pole a různé teploty byl získán z pološířky signálu. Výsledné relaxační časy jsou shrnuty v Tabulka 3.

Tabulka 2 Relaxační časy  $T_1$  signálů  $^{31}\text{P}$  pro ligandy  $\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{Ph}}$ ,  $\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfe}}$  a jejich komplexy

		$^{31}\text{P}$ $T_1/\text{ms}$ (25 °C, 121 MHz)
$\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{Ph}}$	pík 1	1189
	pík 2	1518
$\text{Yb-H}_6\text{DO2P2P}^{\text{Ph}}$	pík 1	23,9
	pík 2	28,1
$\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfe}}$	pík 1	1236
	pík 2	1556
$\text{Eu-H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfe}}$	pík 1	139
	pík 2	137
$\text{Yb-H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfe}}$	pík 1	27,7
	pík 2	35,5

Tabulka 3 Relaxační časy jádra  $^{19}\text{F}$  pro ligand  $\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfe}}$  a jeho komplexy při různých frekvencích a teplotách 25 a 37 °C.

		relaxační časy jádra $^{19}\text{F}$ /ms		
		$\text{DO2P2P}^{\text{tfe}}$	$\text{EuDO2P2P}^{\text{tfe}}$	$\text{YbDO2P2P}^{\text{tfe}}$
$T_1$	(25 °C, 282 MHz)	1370	441	112
	(25 °C, 376 MHz)	1090	301	87,6
	(25 °C, 565 MHz)	691	200	68,5
	(37 °C, 282 MHz)	1750	571	137
	(37 °C, 376 MHz)	1430	377	114
	(37 °C, 565 MHz)	892	207	76,9
$T_2$	(25 °C, 376 MHz)	866	–	–
	(25 °C, 565 MHz)	511	–	–
	(37 °C, 376 MHz)	1188	–	–
	(37 °C, 565 MHz)	681	–	–
$T_2^*$	(25 °C, 282 MHz)	–	9,95	11,2
	(25 °C, 376 MHz)	–	9,83	13,3
	(25 °C, 565 MHz)	–	9,00	8,17
	(37 °C, 282 MHz)	–	10,3	11,8
	(37 °C, 376 MHz)	–	9,34	11,6
	(37 °C, 565 MHz)	–	8,32	11,6
$T_2/T_1$	(25 °C, 282 MHz)	–	0,023	0,100
	(25 °C, 376 MHz)	0,794	0,033	0,152
	(25 °C, 565 MHz)	0,740	0,045	0,119
resp.	(37 °C, 282 MHz)	–	0,018	0,086
$T_2^*/T_1$	(37 °C, 376 MHz)	0,831	0,025	0,102
	(37 °C, 565 MHz)	0,763	0,040	0,151



Obrázek 23 Závislost  $T_1$  ligandu  $\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfe}}$  a jeho komplexů na pracovní frekvenci spektrometru a teplotě

Naměřená data potvrzují, že paramagnetické ionty kovů významně zkracují relaxační časy.  $T_1$  relaxační časy (jader  $^{31}\text{P}$  a  $^{19}\text{F}$ ) komplexů byly řádově kratší v porovnání s volnými ligandy, největší zkrácení bylo pozorováno pro komplex  $\text{Yb-H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfe}}$  (až o dva řády). Obecně lze říci, že komplexy  $\text{Yb}^{3+}$  mají ve všech případech kratší  $T_1$  v porovnání s komplexy  $\text{Eu}^{3+}$ .

V případě relaxačních časů signálu  $^{19}\text{F}$  můžeme pozorovat zkrácení relaxačních časů v závislosti na rostoucí frekvenci spektrometru. Se zvyšující se teplotou však dochází k prodloužení časů  $T_1$ . Relaxační časy  $T_2$  pro ligand  $\text{H}_6\text{DO2P2P}^{\text{tfe}}$  jsou dle očekávání kratší oproti  $T_1$ .



## 5. Závěr

V rámci této diplomové práce byly syntetizovány ligandy  $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{H}}$ ,  $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{Ph}}$  a  $\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  a jejich komplexy s vybranými paramagnetickými ionty lanthanoidů –  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ . Připravené molekuly byly studovány pomocí NMR spektroskopie.

Byla provedena pH NMR titrace jader  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  a  $^{19}\text{F}$ . Spektra  $^{31}\text{P}$  prokázala očekávanou pH závislost chemických posunů pendantních ramen obsahujících atom fosforu. Pro výpočet protonizačních konstant byla využita naměřená data titrace jádra  $^{31}\text{P}$ , ze kterých bylo možné vypočítat pouze průměrnou hodnotu protonizační konstanty; hodnota  $\text{p}K_{\text{A}}$  pro komplex  $\text{Eu}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  je 5,4, pro komplex  $\text{Yb}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  pak 5,3. Tyto hodnoty jsou bohužel mimo fyziologickou oblast pH a připravené komplexy tak nejsou vhodné pro využití v  $^{31}\text{P}$  MRI, nicméně pozorované pH závislosti přinesly významný proof-of-principle, a získané poznatky jsou dobrým odrazovým můstkem pro design a studium příbuzných systémů.

Dle  $^{31}\text{P}$  NMR spekter vykazují komplexy strukturu izomeru TSA'. Komplex  $\text{Yb}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{Ph}}$  ve svém spektru obsahuje tři sady signálů pro izomery  $RR$  (nebo  $SS$  pro daný izomer  $\Delta(\delta\delta\delta\delta)$  nebo  $\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)$ ),  $RS$  a  $SS$  (nebo  $RR$ ). Přítomnost dalších izomerů lze najít i pro komplex  $\text{EuDO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{Ph}}$ . Naopak komplexy  $\text{Eu}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  a  $\text{Yb}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  ve svých  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech obsahují pouze jeden majoritní signál izomeru  $RR$  (nebo  $SS$  pro daný izomer  $\Delta(\delta\delta\delta\delta)$  nebo  $\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)$ ). Jednotlivé  $^{31}\text{P}$  píky ligandů a jejich komplexů se však nepodařilo přiřadit k příslušným pendantním ramenům.

Dále byla provedena relaxometrická charakterizace ligandů a jejich komplexů, a to pro jádra  $^{31}\text{P}$  a  $^{19}\text{F}$ . Pro každý komplex byla získána hodnota relaxačních časů  $T_1$  a  $T_2^*$ . Bylo potvrzeno, že přítomnost paramagnetického iontu kovu výrazně zkracuje relaxační časy oproti volnému ligandu. Z toho hlediska je možné považovat připravené komplexy  $\text{Yb}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{Ph}}$ ,  $\text{Eu}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  a  $\text{Yb}-\text{H}_6\text{DO}_2\text{P}_2\text{P}^{\text{tfe}}$  jako vhodné prototypy kontrastních látek pro  $^{31}\text{P}$ , respektive  $^{19}\text{F}$  MRI.

## Použitá literatura

- [1] Hassan, I.M.; Mohammed, M.M.J.; Constantinides, C.; Sadek, S.; Nair, M.; Belani, N.; Yousef, A.M.; Abdel-Dayem, H.M. Segmental Analysis of SPECT<sup>99mTc</sup>-Methoxy Isobutyl Isonitrile And<sup>201Tl</sup> Myocardial Imaging in Ischaemic Heart Disease. *Eur. J. Nucl. Med.*, **1990**, *16*, 705–711.
- [2] Wadas, T.J.; Wong, E.H.; Weisman, G.R.; Anderson, C.J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2858–2902.
- [3] Bar-Shalom, R.; Valdivia, A.Y.; Blaufox, M.D. PET Imaging in Oncology. *Semin. Nucl. Med.*, **2000**, *30*, 150–185.
- [4] Dračinský, M. *NMR Spektroskopie pro Chemiky*; Knihkupectví Karolinum: Praha, **2021**.
- [5] McMurry, J.E. *Organic Chemistry*; Cengage Learning, **2011**.
- [6] Peterson, K.L.; Srivastava, K.; Pierre, V.C. Fluorinated Paramagnetic Complexes: Sensitive and Responsive Probes for Magnetic Resonance Spectroscopy and Imaging. *Front. Chem.*, **2018**, *6*, 160.
- [7] Bulte, J.W.M. Hot Spot MRI Emerges from the Background. *Nat. Biotechnol.*, **2005**, *23*, 945–946.
- [8] Srinivas, M.; Heerschap, A.; Ahrens, E.T.; Figdor, C.G.; de Vries, I.J.M. <sup>19</sup>F MRI for Quantitative in Vivo Cell Tracking. *Trends Biotechnol.*, **2010**, *28*, 363–370.
- [9] Levitt, M.H. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*; John Wiley & Sons, **2013**.
- [10] Xie, D.; Yu, M.; Kadakia, R.T.; Que, E.L. <sup>19</sup>F Magnetic Resonance Activity-Based Sensing Using Paramagnetic Metals. *Acc. Chem. Res.*, **2020**, *53*, 2–10.
- [11] Gorenstein, D.G.; Luxon, B.A. NMR Spectroscopy, 31P. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*; Lindon, J.C.; Tranter, G.E.; Koppenaal, D.W., Eds.; Academic Press: Oxford, **2017**; pp. 294–302.
- [12] Cruz, F.; Cerdán, S. Cells Studied by NMR. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*; Lindon, J.C.; Tranter, G.E.; Koppenaal, D.W., Eds.; Academic Press: Oxford, **2017**; pp. 165–172.
- [13] Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J. Gen. Physiol.*, **1927**, *8*, 519–530.
- [14] Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*, **1956**, *123*, 309–314.
- [15] Stubbs, M.; Veech, R.L.; Griffiths, J.R. Tumor Metabolism: The Lessons of Magnetic Resonance Spectroscopy. *Adv. Enzyme Regul.*, **1995**, *35*, 101–115.
- [16] Gillies, R.J.; Raghunand, N.; Garcia-Martin, M.L.; Gatenby, R.A. PH Imaging. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, **2004**, *23*, 57–64.
- [17] Hingorani, D.V.; Bernstein, A.S.; Pagel, M.D. A Review of Responsive MRI Contrast Agents: 2005–2014. *Contrast Media Mol. Imaging*, **2015**, *10*, 245–265.
- [18] Krchová, T.; Herynek, V.; Gálisová, A.; Blahut, J.; Hermann, P.; Kotek, J. Eu(III) Complex with DO<sub>3</sub>A-Amino-Phosphonate Ligand as a Concentration-Independent PH-Responsive Contrast Agent for Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS). *Inorg. Chem.*, **2017**, *56*, 2078–2091.
- [19] Geraldès, C.F.G.C.; Sherry, A.D.; Cacheris, W.P. Synthesis, Protonation Sequence, and NMR Studies of Polyazamacrocyclic Methylene phosphonates. *Inorg. Chem.*, **1989**, *28*, 3336–3341.
- [20] Sherry, A.D.; Ren, J.; Huskens, J.; Brücher, E.; Tóth, É.; Geraldès, C.F.C.G.; Castro, M.M.C.A.; Cacheris, W.P. Characterization of Lanthanide(III) DOTP Complexes:

- Thermodynamics, Protonation, and Coordination to Alkali Metal Ions. *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 4604–4612.
- [21] Melson, G. *Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds*; Springer Science & Business Media, **2012**.
- [22] Lawrance, G.A. *Introduction to Coordination Chemistry*; John Wiley & Sons, **2013**.
- [23] Lukeš, I.; Kotek, J.; Vojtišek, P.; Hermann, P. Complexes of Tetraazacycles Bearing Methylphosphinic/Phosphonic Acid Pendant Arms with Copper(II), Zinc(II) and Lanthanides(III). A Comparison with Their Acetic Acid Analogues. *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, *216–217*, 287–312.
- [24] Kálmán, F.K.; Baranyai, Z.; Tóth, I.; Bányai, I.; Király, R.; Brücher, E.; Aime, S.; Sun, X.; Sherry, A.D.; Kovács, Z. Synthesis, Potentiometric, Kinetic, and NMR Studies of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,7-Bis(Acetic Acid)-4,10-Bis(Methylenephosphonic Acid) (DO2A2P) and Its Complexes with Ca(II), Cu(II), Zn(II) and Lanthanide(III) Ions. *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, 3851–3862.
- [25] Táborský, P.; Lubal, P.; Havel, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I. Thermodynamic and Kinetic Studies of Lanthanide(III) Complexes with H<sub>5</sub>Do3ap (1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7-Triacetic-10-(Methylphosphonic Acid)), a Monophosphonate Analogue of H<sub>4</sub>Dota. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, **2005**, *70*, 1909–1942.
- [26] Hennrich, U.; Benešová, M. [68Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging. *Pharmaceuticals*, **2020**, *13*, 38.
- [27] Gutfilen, B.; Souza, S.A.; Valentini, G. Copper-64: A Real Theranostic Agent. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2018**, *12*, 3235–3245.
- [28] Rohovec, J.; Vojtišek, P.; Hermann, P.; Mosinger, J.; Žák, Z.; Lukeš, I. Synthesis, Crystal Structures and NMR and Luminescence Spectra of Lanthanide Complexes of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane with N-Methylene(Phenyl)Phosphinic Acid Pendant Arms †. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1999**, 3585–3592.
- [29] Rohovec, J.; Kývala, M.; Vojtišek, P.; Hermann, P.; Lukeš, I. Synthesis, Crystal Structures, and Solution Properties of N-Methylene(Phenyl)Phosphinic Acid Derivatives of Cyclen and Cyclam. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, *2000*, 195–203.
- [30] P. Pulukkody, K.; J. Norman, T.; Parker, D.; Royle, L.; J. Broan, C. Synthesis of Charged and Uncharged Complexes of Gadolinium and Yttrium with Cyclic Polyazaphosphonic Acid Ligands for in Vivo Applications. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1993**, *0*, 605–620.
- [31] Lazar, I.; Hrcir, D.C.; Kim, W.D.; Kiefer, G.E.; Sherry, A.D. Optimized Synthesis, Structure, and Solution Dynamics of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetrakis(Methylenephosphonic Acid) (H8DOTP). *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 4422–4424.
- [32] Kotková, Z.; Pereira, G.A.; Djanashvili, K.; Kotek, J.; Rudovský, J.; Hermann, P.; Elst, L.V.; Muller, R.N.; Geraldes, C.F.G.C.; Lukeš, I.; Peters, J.A. Lanthanide(III) Complexes of Phosphorus Acid Analogues of H<sub>4</sub>DOTA as Model Compounds for the Evaluation of the Second-Sphere Hydration. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, *2009*, 119–136.
- [33] Kim, W.D.; Kiefer, G.E.; Huskens, J.; Sherry, A.D. NMR Studies of the Lanthanide(III) Complexes of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetrakis(Methanephosphonic Acid Mono(2',2',2'-Trifluoroethyl) Ester). *Inorg. Chem.*, **1997**, *36*, 4128–4134.
- [34] Geraldes, C.F.G.C.; Sherry, A.D.; Lázár, I.; Miseta, A.; Bogner, P.; Berenyi, E.; Sumegi, B.; Kiefer, G.E.; McMillan, K.; Maton, F.; Muller, R.N. Relaxometry, Animal Biodistribution, and Magnetic Resonance Imaging Studies of Some New Gadolinium

- (III) Macrocyclic Phosphinate and Phosphonate Monoester Complexes. *Magn. Reson. Med.*, **1993**, *30*, 696–703.
- [35] Delgado, R.; Siegfried, L.C.; Kaden, T.A. Metal Complexes with Macrocyclic Ligands. Part XXXI. Protonation Studies and Complexation Properties of Tetraazamacrocyclic Methylene phosphonates with Earth-Alkali Ions. *Helv. Chim. Acta*, **1990**, *73*, 140–148.
- [36] Burai, L.; Király, R.; Lázár, I.; Brücher, E. Formation and Dissociation Kinetics of the Complexes Gd(DOTP)<sup>5-</sup> and Gd(DOTPMB)<sup>-</sup>. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2001**, *2001*, 813–820.
- [37] BROAN, C.J.; COLE, E.; JANKOWSKI, K.J.; PARKER, D.; PULUKKODY, K.; BOYCE, B.A.; BEELEY, N.R.A.; MILLAR, K.; MILLICAN, A.T. Synthesis of New Macrocyclic Amino-Phosphinic Acid Complexing Agents and Their C- and P-Functionalised Derivatives for Protein Linkage. *Synth. New Macrocyclic Amino-Phosphinic Acid Complexing Agents Their C- P-Funct. Deriv. Protein Link.*, **1992**, 63–68.
- [38] Bazakas, K.; Lukeš, I. Synthesis and Complexing Properties of Polyazamacrocycles with Pendant N-Methylene phosphinic Acid. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1995**, 1133.
- [39] Aime, S.; Batsanov, A.S.; Botta, M.; Dickins, R.S.; Faulkner, S.; Foster, C.E.; Harrison, A.; Howard, J.A.K.; Moloney, J.M.; Norman, T.J.; Parker, D.; Royle, L.; Williams, J.A.G. Nuclear Magnetic Resonance, Luminescence and Structural Studies of Lanthanide Complexes with Octadentate Macrocyclic Ligands Bearing Benzylphosphinate Groups. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1997**, 3623–3636.
- [40] Hermann, P.; Kotek, J.; Kubíček, V.; Lukeš, I. Gadolinium(III) Complexes as MRI Contrast Agents: Ligand Design and Properties of the Complexes. *Dalton Trans.*, **2008**, *0*, 3027–3047.
- [41] Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Marques, M.P.M.; Geraldes, C.F.G.C.; Pubanz, D.; Merbach, A.E. Conformational and Coordination Equilibria on DOTA Complexes of Lanthanide Metal Ions in Aqueous Solution Studied by <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy. *Inorg. Chem.*, **1997**, *36*, 2059–2068.
- [42] Pereira, G.A.; Ball, L.; Sherry, A.D.; Peters, J.A.; Geraldes, C.F.G.C. NMR Characterization of Lanthanide(3+) Complexes of Tetraazatetrakisphosphinato and Tetraazatetra-kisphosphonato Ligands. *Helv. Chim. Acta*, **2009**, *92*, 2532–2551.
- [43] Avecilla, F.; Peters, J.A.; Geraldes, C.F.G.C. X-Ray Crystal Structure of a Sodium Salt of [Gd(DOTP)]<sup>5-</sup>: Implications for Its Second-Sphere Relaxivity and the <sup>23</sup>Na NMR Hyperfine Shift Effects of [Tm(DOTP)]<sup>5-</sup>. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2003**, *2003*, 4179–4186.
- [44] Vitha, T.; Kubíček, V.; Kotek, J.; Hermann, P.; Elst, L.V.; Müller, R.N.; Lukeš, I.; Peters, J.A. Gd(III) Complex of a Monophosphinate-Bis(Phosphonate) DOTA Analogue with a High Relaxivity; Lanthanide(III) Complexes for Imaging and Radiotherapy of Calcified Tissues. *Dalton Trans.*, **2009**, 3204–3214.
- [45] Urbanovský, P.; Kotek, J.; Carniato, F.; Botta, M.; Hermann, P. Lanthanide Complexes of DO3A-(Dibenzylamino)Methylphosphinate: Effect of Protonation of the Dibenzylamino Group on the Water-Exchange Rate and the Binding of Human Serum Albumin. *Inorg. Chem.*, **2019**, *58*, 5196–5210.
- [46] Rudovský, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Mainero, V.; Aime, S. Synthesis of a Bifunctional Monophosphinic Acid DOTA Analogue Ligand and Its Lanthanide(III) Complexes. A Gadolinium(III) Complex Endowed with an Optimal Water Exchange Rate for MRI Applications. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 112–117.
- [47] Rudovský, J.; Cígler, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vojtíšek, P.; Lukeš, I.; Peters, J.A.; Vander Elst, L.; Müller, R.N. Lanthanide(III) Complexes of a Mono(Methylphosphonate) Analogue of H4dota: The Influence of Protonation of the

- Phosphonate Moiety on the TSAP/SAP Isomer Ratio and the Water Exchange Rate. *Chem. – Eur. J.*, **2005**, *11*, 2373–2384.
- [48] Lebdušková, P.; Hermann, P.; Helm, L.; Tóth, É.; Kotek, J.; Binnemans, K.; Rudovský, J.; Lukeš, I.; Merbach, A.E. Gadolinium(III) Complexes of Mono- and Diethyl Esters of Monophosphonic Acid Analogue of DOTA as Potential MRI Contrast Agents: Solution Structures and Relaxometric Studies. *Dalton Trans.*, **2007**, 493–501.
- [49] Rohovec, J.; Lukeš, I.; Hermann, P. Lanthanide Complexes of a Cyclen Derivative with Phenylphosphinic Pendant Arms for Possible  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  MRI Temperature Sensitive Probes. *New J. Chem.*, **1999**, *23*, 1129–1132.
- [50] Aime, S.; Batsanov, A.S.; Botta, M.; Howard, J.A.K.; Parker, D.; Senanayake, K.; Williams, G. Solution and Solid-State Characterization of Highly Rigid, Eight-Coordinate Lanthanide(III) Complexes of a Macrocyclic Tetrabenzylphosphinate. *Inorg. Chem.*, **1994**, *33*, 4696–4706.
- [51] Housecroft, C.E. *Inorganic Chemistry: Solutions Manual*; Pearson, Prentice Hall: Harlow, **2005**.
- [52] Kettle, S.F.A. *Physical Inorganic Chemistry: A Coordination Chemistry Approach*; Springer, **2013**.
- [53] Gottlieb, H.E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 7512–7515.
- [54] De León-Rodríguez, L.M.; Kovacs, Z.; Esqueda-Oliva, A.C.; Miranda-Olvera, A.D. Highly Regioselective N-Trans Symmetrical Diprotection of Cyclen. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 6937–6940.
- [55] Burai, L.; Ren, J.; Kovacs, Z.; Brücher, E.; Sherry, A.D. Synthesis, Potentiometry, and NMR Studies of Two New 1,7-Disubstituted Tetraazacyclododecanes and Their Complexes Formed with Lanthanide, Alkaline Earth Metal,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  Ions. *Inorg. Chem.*, **1998**, *37*, 69–75.
- [56] Bazakas, K.; Lukeš, I. Synthesis and Complexing Properties of Polyazamacrocycles with Pendant N-Methylenephosphinic Acid. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1995**, 1133.
- [57] Herynek, V.; Martinisková, M.; Bobrova, Y.; Gálisová, A.; Kotek, J.; Hermann, P.; Koucký, F.; Jiráček, D.; Hájek, M. Low-Molecular-Weight Paramagnetic  $^{19}\text{F}$  Contrast Agents for Fluorine Magnetic Resonance Imaging. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.*, **2019**, *32*, 115–122.