

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



Zuzana Vacková

AMINOSACHARIDY JAKO SOUČÁST CYKlickÝCH POLYAMINŮ

Aminocarbohydrates as a part of cyclic polyamines

Bakalářská práce

Praha 2011

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Miroslav Lorenc

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím zdrojů,
které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Svoluji zapůjčení této práce pro studijní účely a souhlasím s tím, aby byla řádně vedena
v evidenci vypůjčovatelů.

V Praze dne 1. 7. 2011

Zuzana Vacková

Děkuji svému vedoucímu práce Ing. Miroslavu Lorencovi za pomoc, ochotu a trpělivost, které byla potřeba pro vypracování této bakalářské práce. Dále chci poděkovat mé rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Magnetická rezonance patří mezi zobrazovací metody, které jsou v medicíně nezbytné pro diagnostické účely. Tato metoda nevystavuje pacienta rentgenovému záření a ani žádné další negativní účinky na lidský organismus nejsou zatím známy. Další značnou výhodou magnetické rezonance je schopnost docílit velkého kontrastu i mezi strukturně velmi podobnými tkáněmi. Tomuto zvýraznění napomáhají i kontrastní látky, které se při magnetické rezonanci běžně používají. Součástí těchto látek je kovový iont, v dnešní době je nejčastěji používaný iont gadolinia (Gd^{III}). Ten ale musí být komplexován s vhodným ligandem. Tato práce se věnuje syntéze modelové řady potenciálně vhodných ligandů, jejichž součástí je sacharidová složka. Jejím navázáním by mělo být dosaženo větší rozpustnosti komplexu, nebo možnosti navázání další sacharidové jednotky, dalšího ligandu, či detekující skupiny. Bylo vytvořeno několik teoretických reakčních cest vedoucích k výsledné látce. Ne všechny se v praxi osvědčili jako použitelné. Výsledkem syntézy je připravený makrocycly, který je potenciálně vhodným ligandem pro komplexaci s Gd^{III} nebo i jiným iontem kovu, tedy možnou vhodnou součástí nové kontrastní látky.

Abstract

Magnetic resonance imaging is one of the imaging methods that are needed in medicine for diagnostic purposes. This method neither exposes the patient to X-rays, nor any other negative effects on the human organism are known by then. Another significant advantage of MRI is its ability to achieve high contrast even between structurally very similar tissues. The contrast agents commonly used with the magnetic resonance imaging help heighten this ability. Part of these contrast agents is a metal ion, the ion gadolinium (Gd^{III}) is the most commonly used nowadays. But it must be complexed by a suitable ligand. This work deals with the synthesis of a number of potentially suitable model ligands. The saccharide component is even a part of these ligands. This component should enable to achieve a greater solubility of the complex or the possibility of linking other additional saccharide units, another ligand or a detecting group. Several theoretical paths leading to the final fabric were created. Not all of them led to the target, only one was successful. The produced macrocycle is the potentially applicable ligand for complexation with Gd^{III} or other metal ion, it means a good part of the new potential contrast agent.

Obsah

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 <i>Zobrazovací metody.....</i>	9
2.1.1 <i>Zobrazovací metody obecně.....</i>	9
2.1.2 <i>Pozitronová emisní tomografie (PET).....</i>	9
2.1.3 <i>Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPEC).....</i>	10
2.1.4 <i>Rentgen (RTG)</i>	11
2.1.5 <i>Počítačová tomografie (CT).....</i>	12
2.1.6 <i>Ultrazvuk</i>	13
2.1.7 <i>Magnetická rezonance (MRI)</i>	15
2.1.8 <i>Kontrastní látky v MRI</i>	16
2.2 <i>Kovové komplexy se sacharidovými substituenty.....</i>	17
2.2.1 <i>Kovové komplexy se sacharidovými jednotkami a jejich transport přes membrány</i>	17
2.2.2 <i>Radioaktivní ligandy obsahující sacharidovou složku</i>	18
2.2.3 <i>Organokovové sloučeniny jako léčebné prostředky</i>	20
3. CÍLE PRÁCE.....	21
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1 <i>Obecná část.....</i>	26
4.2 <i>Syntetická část</i>	27
4.2.1 <i>N,N'-Bis(chloracetyl)ethylendiamin (I)</i>	27
4.2.2 <i>N,N'-Bis(chloracetyl)propylendiamin (II).....</i>	28
4.2.3 <i>1,6-anhydro-4-azido-4-deoxy-2-O-p-tolylsulfonyl-β-D-glukopyranosa (2)</i>	29
4.2.4 <i>1,6:2,3-Dianhydro-4-azido-deoxy- β-D-mannopyranosa (3).....</i>	30
4.2.5 <i>1,6-Anhydro-2,4-diazido-2,4-dideoxy-β-D-glukopyranosa (4)</i>	31
4.2.6 <i>1,6-Anhydro-2,4-diamino-2,4-dideoxy-β-D-glukopyranosa (5).....</i>	32
4.2.7 <i>1,6-Anhydro-2,4-dideoxy-2,4-dichloroacetamido-β-D-glukopyranosa (8).....</i>	33
4.2.8 <i>N,N'-Dibenzoyl-1,3-propandiamin (III)</i>	35
4.2.9 <i>N,N'-Dibenzyl-1,3-propandiamin (IV)</i>	36
4.2.10 <i>1,6:2,3-Dianhydro-4-benzylamino-4-deoxy-β-D-mannopyranosa (15).....</i>	37
4.2.11 <i>1,6-Anhydro-2,4-dibenzylamino-2,4-dideoxy-β-D-glukopyranosa (16).....</i>	38
4.2.12 <i>3,13-Dibenzyl-19-hydroxy-3,6,10,13tetraaza-17,18-dioxatricyklo[13.2.1.1^{2,14}]nonadekan-5,11-dion (11b).....</i>	39
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	41
6. ZÁVĚR.....	46
7. LITERATURA.....	47

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	49
9. PŘÍLOHY.....	50

1. Úvod

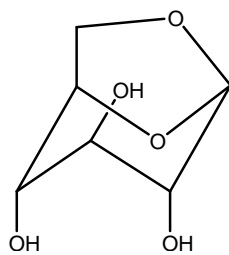
Zobrazovací metody jsou v dnešní době nepostradatelnou součástí zdravotnictví na celém světě, ať už se jedná o SPEC, PET, CT, rentgen, ultrazvuk nebo MRI. V této bakalářské práci bude zmíněna podstata těchto zobrazovacích technik, především se zaměřením na MRI a její kontrastní látky založené na gadolinitém iontu.

Kontrastní látky obsahující gadolinité ionty jsou dnes běžně používanými v oblasti MRI. Gadolinium, díky svým vynikajícím vlastnostem, napomáhá k vyššímu kontrastu snímků lidského těla. Tento kov, patřící do skupiny lanthanoidů, je však pro organismus toxický, proto je nutné ho komplexovat, a to s ligandy vhodných vlastností. U těchto komplexů je velmi důležitá termodynamická a kinetická stálost. Proto je základní výzkum, zejména tedy v oblasti anorganické chemie, zaměřen na vývoj nových ligandů, které budou vytvářet dostatečně stabilní komplexy. V dnešní době jsou klinicky používané kontrastní látky deriváty DOTA a DTPA (viz kapitola 2.1.8). V případě, že by komplex stabilní nebyl, nastávalo by riziko rozpadu a s tím i spojená intoxikace organismu kovovými ionty. [1]

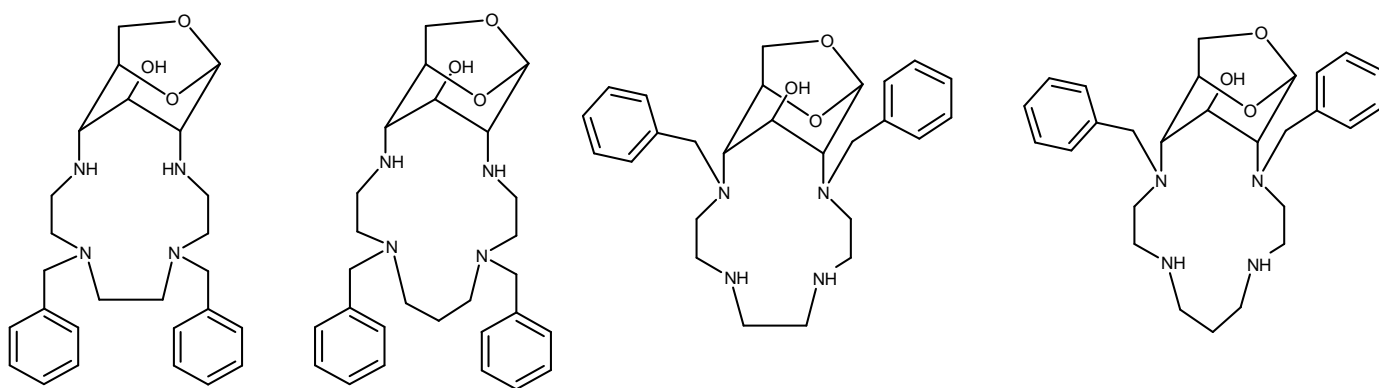
U komplexů obsahující Gd^{III} byly objeveny i negativní účinky na organismus, a to v podobě nefrogenní systémové fibrózy (NSF), což je závažné onemocnění ve výsledku vedoucí ke snížení pohyblivosti kloubů, postižení svalů a vnitřních orgánů (plíce, játra, srdce aj.). Rizika související s NSF v důsledku používání kontrastních látek s obsahem iontů gadolinia jsou sledována už od ledna 2006, kdy byla tato spojitost poprvé popsána v literatuře [2].

S ohledem na riziko vzniku a vývoje NSF byly kontrastní látky s obsahem iontů gadolinia rozděleny do tří skupin podle rizikovosti. Do první nejrizikovější skupiny patří např. Omniscan® a Magnevist®, do druhé středně rizikové skupiny např. Primovist® a Vasovist® a do do třetí nejméně rizikové skupiny patří např. Gadovist® a Dotarem®. [3]

Tato bakalářská práce se bude zabývat návrhem a syntézou modelových ligandů vhodných pro komplexaci s gadoliniem, popř. i s jiným vhodným iontem kovu. Součástí ligandu bude sacharidová složka, která by měla přispět k vyšší rozpustnosti sloučeniny, a zároveň k potenciálnímu navázání dalšího ligandu, další sacharidové jednotky nebo detekující skupiny. Navrhované ligandy vycházejí ze struktury 1,6-anhydro- β -D-glukopyranosy (levoglukosanu).



obr. 1: 1,6-anhydro- β -D-glukopyranosa (levoglukosan)



obr. 2: navrhované struktury ligandů

2. Teoretická část

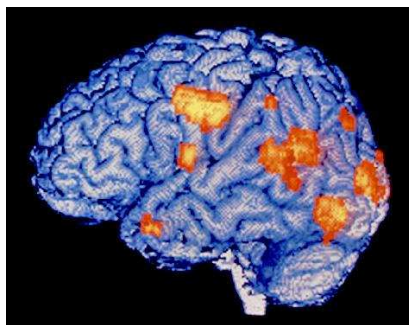
2.1 Zobrazovací metody

2.1.1 Zobrazovací metody obecně

Zobrazovací metody, známé také pod názvem „Molecular imaging“, jsou metody používané hlavně v medicíně a molekulární biologii. Medicínské využití je na vizualizaci určitých částí těla, tedy zejména pro diagnostické účely. Ze zobrazovacích metod jsou nejznámější a nejpoužívanější např. magnetická rezonance (MRI), radiodiagnostické metody (SPECT, PET), optické zobrazovací metody (rentgen, CT) a ultrazvuk. U některých z těchto metod se často používají tzv. kontrastní látky. Důvodem je větší kontrast na získaném snímku, tedy lepší rozlišení určitých objektů.

2.1.2 Pozitronová emisní tomografie (PET)

Pozitronová emisní tomografie, zkráceně označována jako PET, je nukleární metoda používaná od devadesátých let v oborech jako je onkologie, neurologie nebo kardiologie. Principem této metody je zobrazování rozdílných tkání na základě rozdílného metabolismu. Jinak řečeno, při této metodě je zachytáváno záření vycházející z těla pacienta po podání určité dávky radioaktivní látky. Tkáně se poté zobrazí podle množství nakumulované radioaktivní látky. V PETu je touto radioaktivní látkou modifikovaná molekula glukózy, která se liší od normální glukózy obsažené v potravě, obsahuje radioaktivní izotop fluoru ^{18}F . Celý chemický název je tedy 2-fluor-2-deoxy-D-glukosa, který můžeme najít také pod zkratkou FDG. FDG vpravovaná do těla pacienta je v podstatě pozitronový zářič. Což znamená, že po své přeměně na neradioaktivní izotop vyzáří pozitron. Ten má však velmi krátkou existenci a s jeho zánikem vznikají dva fotony, jejichž směr pohybu je přesně opačný. Fotony jsou zachytávány koincidenčním detektorem, vyskytující se na snímacím prstenci, který se nachází okolo pacientova těla. Tento detektor zaznamenává fotony dopadlé ve stejný čas na protilehlých stranách prstence. Z těchto údajů a faktu, že pozitron zaniká přibližně za jeden milimetr své dráhy, se pak dá jednoduše vypočítat poloha místa záření. Z nasbíraných dat je poté možné vytvořit prostorový obraz zobrazované oblasti. [4][5]



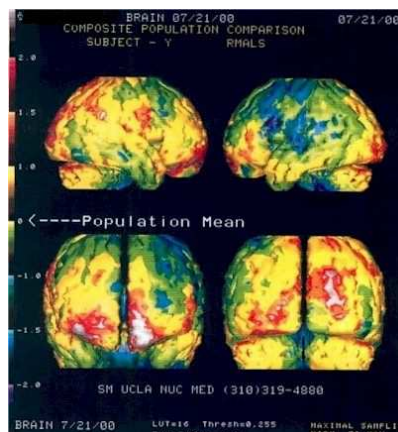
obr. 3: PET snímek

zdroj:

http://www.healthline.com/galeimage?contentId=gend_02_00310&id=gend_02_img0093)

2.1.3 Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPEC)

Tato zobrazovací metoda, známá také pod zkratkou SPEC, což pochází z anglického názvu „Single photon emission computed thomography“. Díky nitrožilně podané radioaktivní látce dokážeme touto metodou zobrazit prostorové rozložení této látky v těle. Jako látka s radioaktivními účinky je podávána taková látka, která je našemu tělu vlastní, jen s tím rozdílem, že je jeden její atom nahrazen atomem radioaktivním. Tato látka zároveň musí v našem těle vykonávat určitou funkci, jako například jód. Rozložením izotopu jódu v těle pak můžeme pozorovat činnost štítné žlázy. Hromadný název pro takto modifikované látky je radiofarmakum. Radiofarmakum je nestabilní látka a s časem se její radioaktivní atom přemění na stálý atom o menší energii a je vyzářeno záření γ . To je poté zachycováno scintilační kamerou, která následně zobrazí oblast s vysokým nebo naopak nízkým obsahem radiofarmaka. Scintilační kamera se okolo zobrazované oblasti pohybuje, vzniknou tedy snímky z mnoha úhlů a z těch se poté díky počítačové technice složí trojrozměrný obraz. Díky této metodě můžeme například zjistit části srdeční svaloviny, které jsou špatně zásobeny kyslíkem, a tudíž špatně pracují. [4][5]



obr. 4: SPEC snímek

zdroj: <http://happydeviant.wordpress.com/2011/03/28/the-antioxidant-network-advantage-improve-and-protect-the-function-of-your-brain-body/>)

2.1.4 Rentgen (RTG)

Rentgen byl objeven na konci 19. století německým vědcem Wilhelmem Conradem Roentgenem, který za tento mimořádný objev dostal v roce 1901 Nobelovu cenu. Byla prokázána existence nového druhu záření, které Roentgen nazval X. Pro účely klasifikace se takto dnes označuje elektromagnetické záření s vlnovými délkami přibližně v rozsahu od 10^{-11} do 10^{-8} m (0,1 až 100Å). Dodnes se používá název X-ray, česky pak rentgenové záření, zkráceně RTG záření. Toto záření má ionizující vlastnosti. Což znamená, že ionizuje neutrální částice, ze kterých poté vznikají ionty. Další jeho pozitivní vlastností je vysoká prostupnost materiály, kterými světlo neprojde. Rentgenové záření se tedy brzy po svém objevení začalo používat k lékařským účelům a dalo základ dalším složitějším metodám jako je počítačová tomografie. Rentgenový snímek dnes patří k základním vyšetřovacím metodám. Nejčastěji slouží ke zjišťování zlomenin, či vykloubenin, ke snímání chrupu, ale také k vyšetřování měkkých tkání, např. prsu. K zobrazování pomocí RTG záření slouží fotografický papír uzavřený v zesilovací fólii nepropouštějící světlo. Tato fólie přeměňuje RTG záření na světelné, čímž vzniká mnohem výraznější snímek než by vzniknul pouhým působením RTG záření. Na RTG snímku pak můžeme pozorovat útvary v různých odstínech šedi. Ty se zobrazují na základě rozdílné hustoty tkáně, proto se nám na snímku budou kosti jevit světlé (nepropustili tolik RTG záření) a např. plíce tmavé (propustily v porovnání s kostmi mnohem více RTG záření). V dnešní době se již setkáváme i s moderními formami rentgenu. Zde se již

v kazetě neobjevuje fotografický papír, ale čidla, která převádí dopadající RTG záření na elektrické impulsy. Pomocí těch se snímek převádí do digitální podoby. Jako zdroj záření se v rentgenu používá tzv. rentgenka, což je skleněná trubice, se dvěma elektrodami, naplněná vakuem. Mezi elektrodami je vysoké napětí (cca 10-100 kV). Jako katoda je často používán wolframový drát, ten se nažhaví a poté z něj začnou směrem k anodě vylétat elektrony. Na anodě se však prudce zabrzdí, čímž se uvolní velké množství energie. Ta se projeví z velké části jako teplo a asi jen z 1% jako rentgenové záření. [4][5]



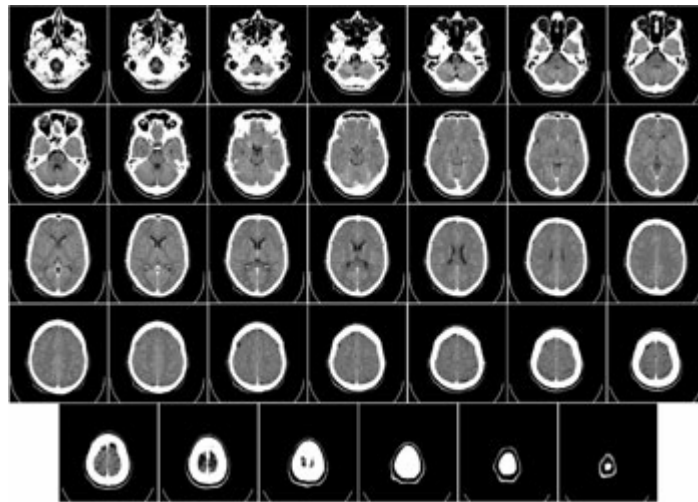
obr. 5: rentgenový snímek

zdroj: <http://www.osetrenizubu.cz/absces/>

2.1.5 Počítačová tomografie (CT)

Tato metoda je také známá pod zkratkou CT, z anglického „computed tomography“ a patří mezi metody založené na rentgenu, jak již bylo zmíněno výše. Avšak na rozdíl od rentgenu zde sehrává velmi důležitou roli výpočetní technika, díky níž můžeme velmi detailně vidět vnitřní stavbu těla. Za objevitele CT je považován Godfried Newbold Hounsfield a Allan McLeod Cormack, kteří za objev obdrželi Nobelovu cenu v roce 1979. Při této vyšetřovací metodě je okolo pacientova těla, ležícího na pohyblivé lavici, prstenec. Na něm je umístěna rentgenka a na opačné straně detektory, snímající RTG záření. Celý prstenec se pohybuje okolo těla pacienta a výsledkem je množství snímků z různých úhlů, které je možno prohlížet si zvlášť nebo jako trojrozměrný obraz nebo dokonce i jako řezy v jiné rovině než byly snímány. U této metody je i možnost použití kontrastní látky, což v tomto případě je roztok

sloučeniny izotopu jódu. Vyšetření se provádí hlavně při podezření na poranění páteře či lebky, při cévní mozkové příhodě nebo při diagnostice nádorových onemocnění. [4][5]



obr. 6: CT snímky

zdroj: <http://www.scientificamerican.com/blog/post.cfm?id=hospital-error-leads-to-ct-scan-rad-2009-10-13>

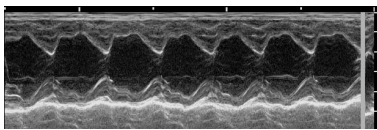
2.1.6 Ultrazvuk

Ultrazvuk je běžná metoda, která slouží pro zobrazení břicha, srdce, štítné žlázy, prostaty, těhotenství atd. Doposud nebyly prokázány žádné negativní účinky, proto je možné ultrazvukem opakovaně vyšetřovat i těhotné ženy a děti.

K vyšetření se využívají zvukové vlny o velmi vysoké frekvenci, které jsou pro lidské ucho neslyšitelné (20kHz-10MHz). Jejich zdrojem je piezoelektrický krystal umístěný v ultrazvukové sondě. Principem této metody je schopnost tkání odrazet ultrazvukové vlny (echogenita). Míra echogenity se u jednotlivých tkání liší, díky jejich rozdílné hustotě. Ultrazvuková vlna procházející tělem naráží na různá tkáňová rozhraní, což je například rozhraní mezi játry a okolním tukem. Na těchto rozhraních část vlnění pokračuje dál a část vlnění se odráží zpět. Čím větší je rozdíl hustot jednotlivých tkání tím je odraz větší. Odražené vlnění je pak zachytáváno ultrazvukovou sondou. Pro vyšší citlivost metody se v některých případech používají kontrastní látky, kterými např. jsou mikrobublinky nějakého neškodného plynu, který se bez problémů v krátké době z těla opět vyloučí. U ultrazvukového vyšetření rozlišujeme několik typů zobrazení:

- A-MODE (amplitude mode) je jednorozměrné zobrazení jehož výsledkem je křivka zobrazující závislost intenzity odraženého signálu na čase uplynulém od vyslání signálu. Tímto způsobem se tedy dají měřit přesné vzdálenosti, což je využíváno zejména v oftalmologii pro přeměřování nitroočních vzdáleností.
- B-MODE (brightness mode) je jednorozměrné zobrazení, při kterém se amplitudy odraženého záření převádějí do stupňů šedi. Výsledkem je tedy úsečka složená z částí o různém jasu.
- M-MODE (movement mode) je jednorozměrné zobrazení, které napomáhá zachytit pohybující se struktury, jako je například srdce.
- 2D zobrazení je dvojrozměrný obraz složený z řady úseček jednorozměrného zobrazení v B-modu. Je to široce využívaná metoda pro vyšetřování vnitřních orgánů, jako např. jater, žlučníku, ledvin atd.
- 3D zobrazení je trojrozměrné zobrazení, tedy trojrozměrný obraz sestavený z mnoha dvojrozměrných snímků. Tohoto zobrazování se nejčastěji využívá v porodnictví.

[4][5]



obr. 7



obr. 8



obr.9

obr. 7 : zobrazení M-mode

obr. 8: zobrazení ve 2D

obr. 9: zobrazení ve 3D

zdroj:

http://www.skarpety.slask.pl/earty/?title=L%C3%A9ka%C5%99sk%C3%A1_ultrasonografie

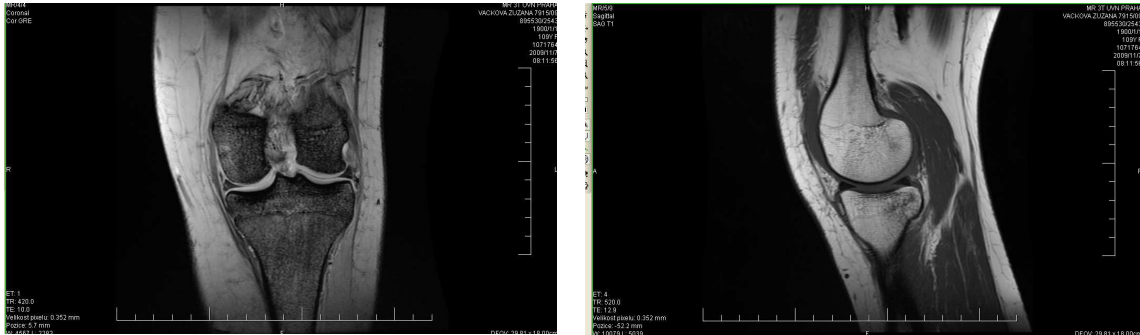
<http://www.babypicturesgallery.com/img-ultrasound-baby-picture-5-27.htm>,

<http://www.naseporodnice.cz/tehotenstvi/fotky-27-tyden-tehotenstvi-foto-38.html>,)

2.1.7 Magnetická rezonance (MRI)

Magnetická rezonance je metoda, kterou nacházíme také pod zkratkami MR nebo MRI z anglického názvu „Magnetic resonance imaging“. Patří mezi moderní zobrazovací metody, kterými se nejčastěji zobrazuje mícha, mozek a další měkké tkáně. Velkou výhodou MRI je fakt, že pacienta nevystavuje rentgenovému záření a ani žádné další negativní účinky nejsou zatím známy. Výjimečnost MRI oproti ostatním zobrazovacím metodám je velké kontrastní rozlišení i u velmi strukturně podobných tkání. Tato schopnost je zapříčiněna i naprosto odlišným principem od všech ostatních zobrazovacích metod. Lidské tělo je ze dvou třetin tvořeno vodou, proto molekula vody, respektive vodík je přítomen prakticky v každé buňce těla. A právě na specifických vlastnostech vodíkových atomů je založeno zobrazování pomocí MRI. Vodíkový atom obsahuje jen jeden proton, který neustále rotuje a tím vytváří magnetický moment, neboli spin, který směřuje stejným směrem jako osa otáčení protonu. Po umístění lidského těla do silného magnetického pole MRI se atomy vodíku zorientují rovnoběžně se siločarami magnetického pole, a to buď paralelně nebo antiparalelně. Poté je do pacientova těla vysláno elektromagnetické vlnění o stejné frekvenci jako má pohyb vodíkového atomu (frekvence je podobná jako u rádiových vln). Po interakci těchto dvou vlnění o stejné frekvenci dochází k rezonanci, která původní pohyb vodíkových atomů o něco vychýlí. Díky elektromagnetickému impulsu začnou atomy vodíku vykonávat svůj pohyb synchronizovaně, jejich spin je tedy v určitý čas vychýlený na stejnou stranu a v tom okamžiku vzniká příčná magnetizace, která je kolmá na magnetické pole MR a my ji můžeme měřit. Poté co elektromagnetický impuls přestane působit, začnou se atomy vodíku vracet do původních pozic a energii co přijaly opět uvolňují. Při této fázi, které se říká fáze relaxace, začíná měření. Měří se čas, za který se přebytečné antiparalelní atomy vrátí do paralelní polohy, což jsou změny v podélné magnetizaci, a dále čas, za který se atomy desynchronizují ve svém pohybu, což jsou změny v příčné magnetizaci. Velikost těchto měřených veličin

závisí na druhu tkáně, na vzájemném působení molekul v ní. Poté jsou naměřené hodnoty převedeny složitou počítačovou cestou na digitální obraz. Výsledkem vyšetření je série snímků, tedy mnoho řezů pozorované oblasti, ze kterých se dá případně sestavit i trojrozměrný obraz. U MRI je možnost zvýraznit určité struktury vhodnou kontrastní látkou. [4][5]



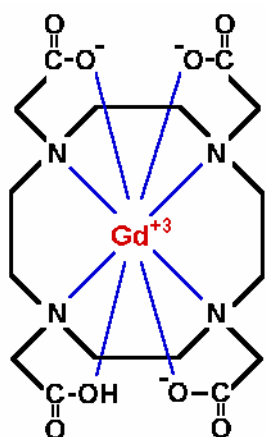
obr. 10: MRI snímky kolene

zdroj: UV nemocnice Střešovice

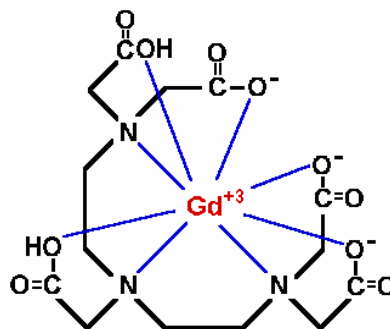
2.1.8 Kontrastní látky v MRI

V dnešní době jsou kontrastní látky pro MRI, běžně používané v praxi, založeny zejména na gadolinitém iontu, vzácně pak na iontech manganu či železa. Díky své poměrně vysoké toxicitě musí být gadolinitý iont vázán v komplexu s ligandem nejčastěji typu polyaminokarboxylátu. Tyto komplexy musí však prokazovat termodynamickou a kinetickou stálost, tzn. měly by být stálé za přítomnosti konkurujících biogenních ligandů a iontů a rozpad komplexu by měl být málo pravděpodobný. [1]

Kontrastní látky můžeme rozdělit na dva typy. Kontrastní látky T_1 , které zvyšují signál, tím pádem vytvářejí pozitivní kontrast. Kontrastní látky T_2 signál snižují a vytvářejí tedy kontrast negativní. Přítomnost kontrastní látky T_1 se projeví zesvětlením MRI snímku, naopak kontrastní látky T_2 ztmavnutím MRI snímku. Příkladem kontrastní látky T_1 jsou komplexy složené z Gd^{III} a jako ligand se používá 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina (DOTA; obr. 11) nebo diethylenetriaminpentaoctová kyselina (DTPA; obr. 12). Komerčně známé jsou potom látky pod názvem Dotarem[®] a Magnevist[®]. Využívají se především na zobrazování nádorů, zánětů a infekcí. [6][7][8]



obr. 11: Gd-DOTA



obr. 12: Gd-DTPA

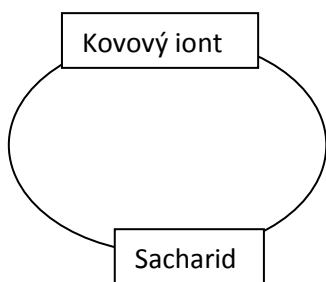
zdroj: <http://boards.straightdope.com/sdmb/showthread.php?t=327929>

Tato práce se bude zabývat kontrastními látkami T_1 , tedy ligandem vhodným pro Gd^{III} , jehož přímou součástí cyklu bude sacharidová jednotka. Součástí práce bude i syntéza této modelové sloučeniny.

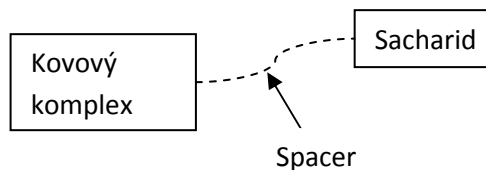
2.2 Kovové komplexy se sacharidovými substituenty

2.2.1 Kovové komplexy se sacharidovými jednotkami a jejich transport přes membrány

Komplexy jejichž součástí je určitý kov mají široké využití buď pro diagnostické účely, jako tzv. diagnostické indikátory, nebo jako léčebné látky. Důležitou roli hraje prostorové uspořádání ligandu. To ovlivňuje celkové vlastnosti celého komplexu, zejména pak afinitu k určité tkáni. Hlavním principem pro převedení kovového komplexu do přirozenější formy, tedy na tělu vlastnější látku, je připojení biomolekuly vyskytující se v organismu. Jednou z možností je na kovový komplex navázat sacharidovou složku, tímto způsobem se propojí vlastnosti kovového komplexu a tělu vlastnímu sacharidu. Existují dva možné způsoby připojení sacharidové jednotky. Buďto je kovový iont přímo napojen na sacharidovém skeletu (obr. 13), nebo je sacharidová jednotka připojena ke kovovému komplexu přes tzv. spacer (obr. 14).



Obr. 13



Obr. 14

obr. 13: kovový iont přímo na sacharidové složce

obr. 14: sacharid připojený přes spacer

Sacharidy a jejich deriváty mají různé schopnosti. Například zatímco základní monosacharid není schopen projít buněčnou membránou složenou z lipofilních podjednotek, derivát, který má na sobě navázán lipofilní substituent membránou projde. Některé nesubstituované monosacharidy však slouží pouze jako energetický zdroj, popřípadě jako stavební jednotka a vyžadují tedy specifický způsob transportu do buňky. Velké komplexy, které na sobě mají jeden či více sacharidových zbytků, se naváží na specifický sacharidový receptor na povrchu buňky, poté prostoupí membránou a dojde tak k zapouzdření komplexu do váčku. V tomto váčku buďto zůstávají nebo dochází k jejich uvolnění a tedy i k možné interakci s enzymy, které se v buňce volně vyskytují. Jsou známy dvě třídy transportních proteinů přenášející monosacharidy přes membrány. První z nich značně ulehčuje přenos glukosy do většiny tkání. Proteinů tohoto typu je 12 a značí se zkratkou GLUT₁₋₁₂. Druhé třídě proteinů se říká „solute carriers“, v překladu rozpuštěné přenašeče. Těchto proteinů je 6 typů a značí se SGLT₁₋₆. [9]

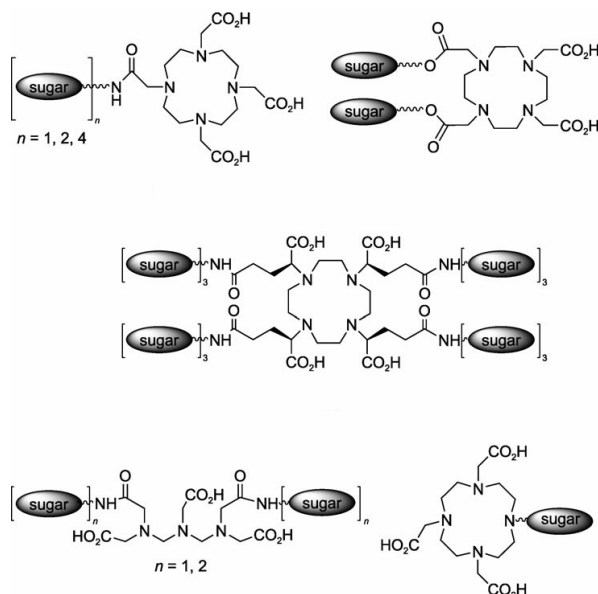
2.2.2 Radioaktivní ligandy obsahující sacharidovou složku

S rozvojem zobrazovacích technik, jako jsou např. SPEC, PET, CT, se pro dobrou vizualizaci určitých tkání a buněk začaly používat radioaktivně značené biomolekuly. Velmi běžným transportním proteinem je GLUT₁, jak již bylo zmíněno výše, přenáší sacharidy do většiny

buněk a tkání. Ve většině případů je do těla vpravena látka 2-¹⁸F-2-deoxy-D-glukóza (FDG), díky níž, a metodě PET/CT, se dá velmi dobře pozorovat energetické zásobování tkání. Přesně tedy vidíme v jakých místech dochází ke zvýšené činnosti mozkových buněk, nebo k jejich rychlému nárůstu. Zobrazíme tak metabolismus nádoru nebo identifikujeme zánětlivou tkáň. U PET/CT se dále jako kov v komplexech používá ⁵⁵Co^{II} a neradioaktivní Ga^{III}. U zobrazovací metody SPECT se jako kovový iont do komplexů používá především ^{99m}Tc a ¹⁸⁶Re.

Stabilitu komplexu určuje schopnost ligandu vyměnit experimentální za přirozeně se vyskytující látku se známou, vysokou afinitou k příslušnému kovovému iontu. Tímto způsobem dosáhne stopový prvek místa určení, aniž by byl zachycen konkurenčními ligandy. Velká stabilita byla zaznamenána u komplexů s Tc^I a Re^I.

Magnetická rezonance, široce používaná a významná diagnostická metoda, používá ionty některých lanthanoidů. Ty se vyznačují svou schopností zvyšovat relaxační rychlost voda-proton a to je vhodný předpoklad pro zobrazování MRI. Mezi velice populární třídu komplexů patří komplexy s Gd^{III}. Pro získání vhodných vlastností komplexu, jako je vysoká stabilita, nebo možnost interakce s molekulami vody, se ve strukturách často objevují hexa-, hepta- nebo oktadentátní ligandy. Jsou často na základě makrocyclických struktur. Výběr několika ligandů vhodných pro MRI je zobrazen níže. [9]



obr. 15: vhodné ligandy pro MRI

zdroj: GOTTSCHALDT, M., SCHUBERT, U., S., (2009), Chem. Eur. J., 15, 1548-1557

2.2.3 Organokovové sloučeniny jako léčebné prostředky

Organokovové sloučeniny vykazují množství užitečných léčebných vlastností. Vývoj účinnějších léčebných látek s navázanými sacharidovými jednotkami je omezen skutečností, že substitucí sacharidových složek, většinou D-glukosy, dochází ke snížení biologické aktivity komplexu. Avšak glykokonjugáty nezaložené na kovových komplexech jsou dnes již velmi dobře prozkoumány a používány jako léčebné prostředky. Jedná se na příklad o látky účinné proti rakovině. [10][11][12]

Ma et al. (2005) syntetizoval řadu komplexů, které obsahovaly jako kovový iont Pt^{II} a navázané peracetylované sacharidové jednotky. Vysoce lipofilní derivát, který přenáší tert-butylové skupiny jako zbytky na terpyridinově připojené peracetyl-glukose přes fenylový můstek, byl identifikován jako neúčinnější látka. Má až stokrát vyšší cytotoxicitu vůči rakovinným buňkám než cisplatina. [13]

Aktivace kovových komplexů sacharidy na jejich okrajích vede k hybridním molekulám jejichž vlastnosti se dají ve velké míře upravovat. Hlavním faktorem pro celkovou prostorovou strukturu molekuly a její využití v biologických systémech je počet a typ připojených sacharidových jednotek a chemická a biologická stabilita jejich připojení. Kovová centra musí mít ty správné vlastnosti a stabilitu pro požadované úlohy v organismu. Použití těchto látek pro monitorování vazebných procesů a zkoumání proteino-sacharidových interakcí in vitro zaznamenala v posledních letech velký pokrok. [9]

3. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce byla příprava modelových ligandů, dobře komplexujících Gd ionty, nebo i jiné ionty kovů, jejichž potencionálním využitím by měla být kontrastní látka v MRI.

Součástí těchto ligandů je monosacharidová část, která byla do cyklu připojena z důvodu možné vyšší rozpustnosti sloučeniny, za což by byla zodpovědná volná hydroxylová skupina na uhlíku číslo 3 monosacharidového skeletu. Dalším faktorem je možnost připojení dalšího ligandu, popřípadě další sacharidové jednotky, či různých detekujících skupin, opět přes volnou hydroxylovou skupinu na uhlíku číslo 3.

Výhodou je možná kombinace zobrazovací metody pomocí MRI, a zároveň zobrazování pomocí detekujících skupin, jako je tomu například v metodách SPEC a PET.

Schématu připravované syntézy:

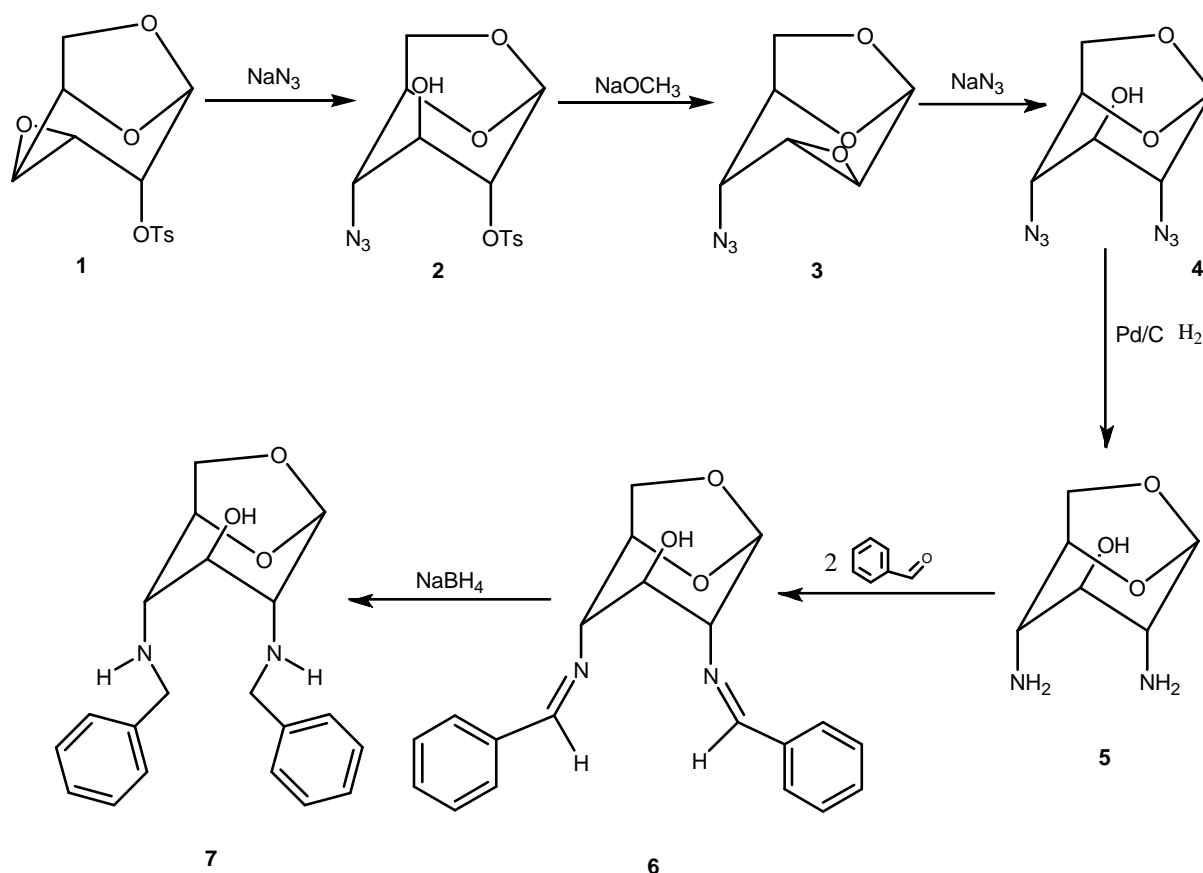


Schéma 1

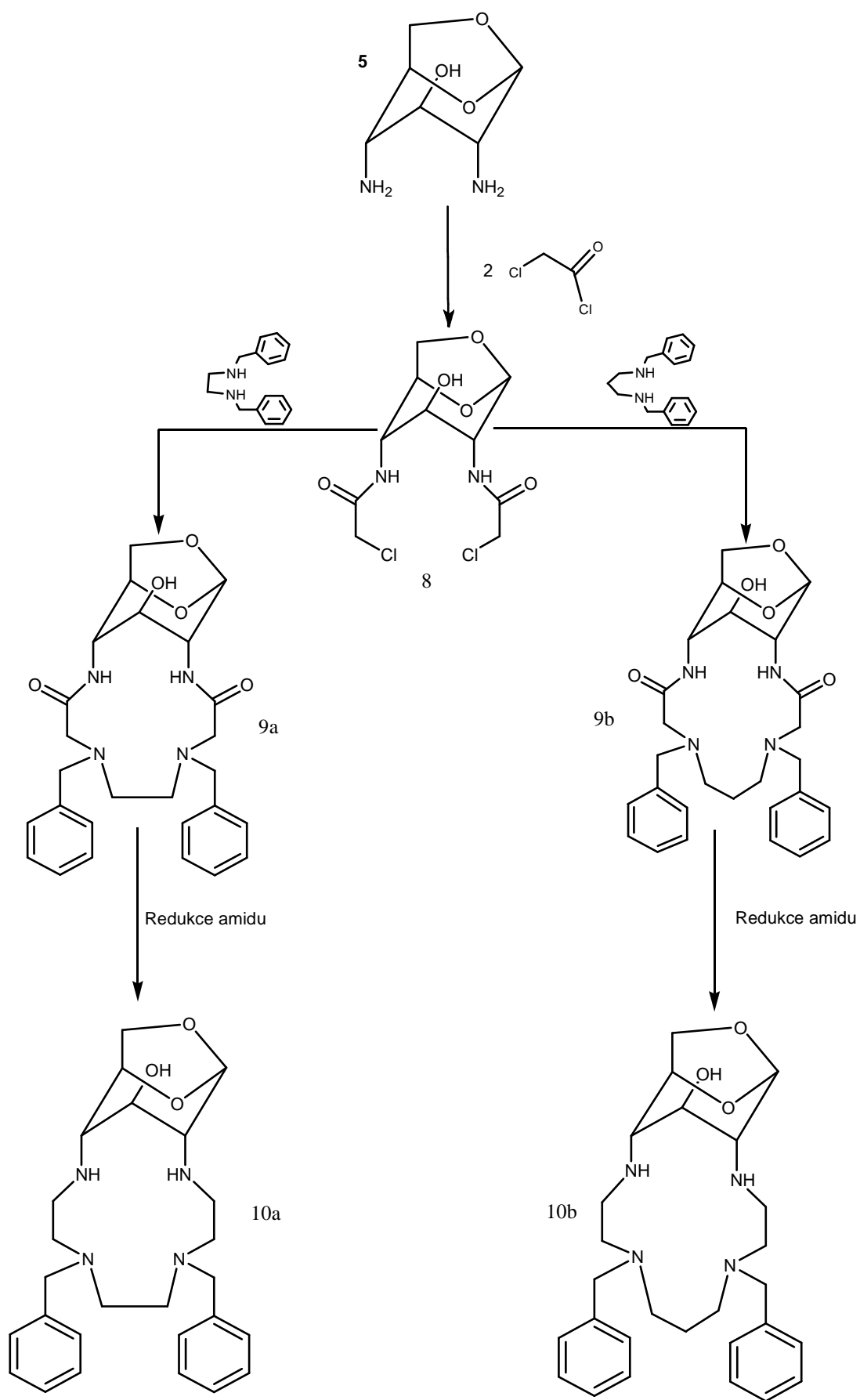


Schéma 2

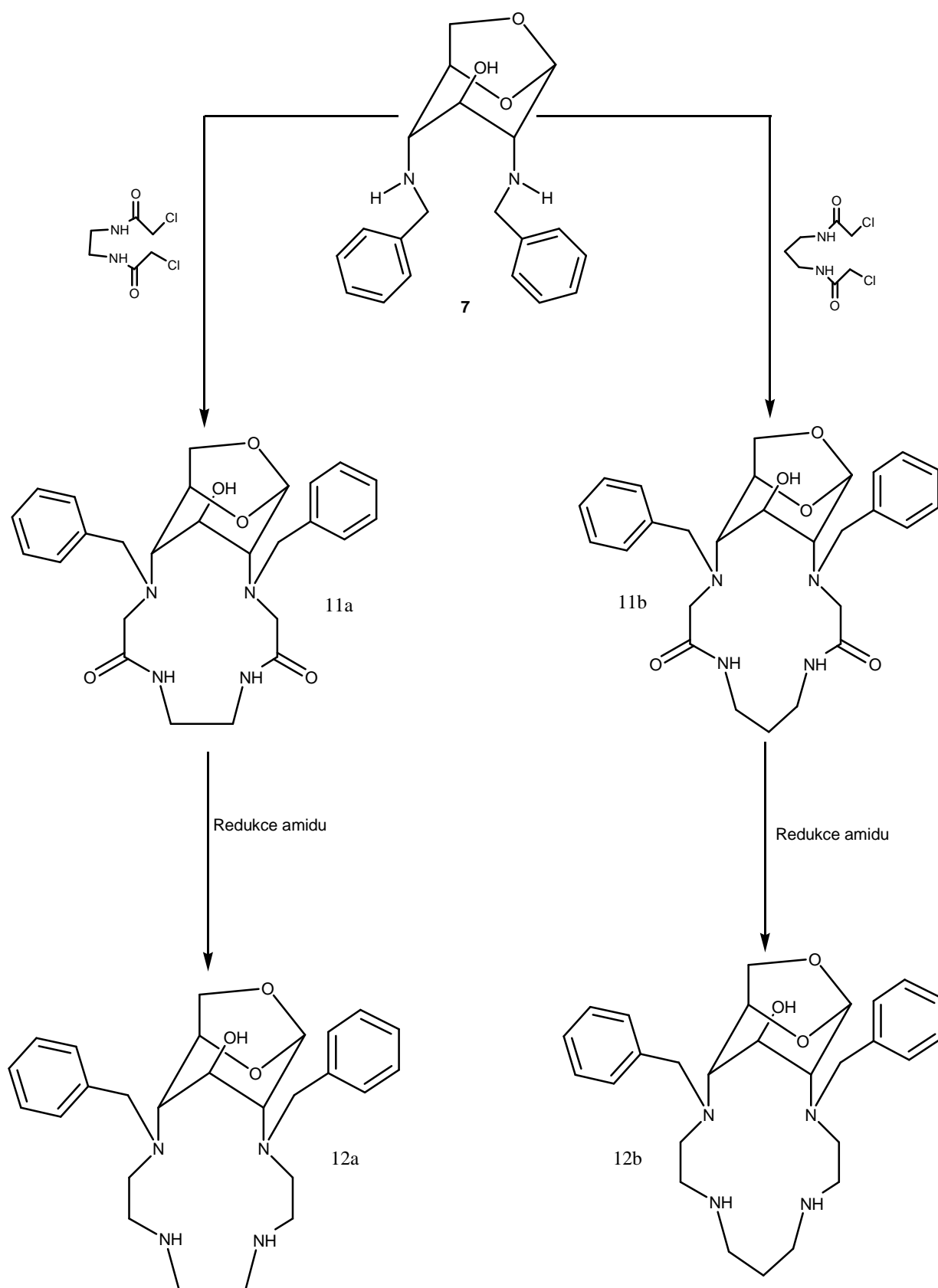
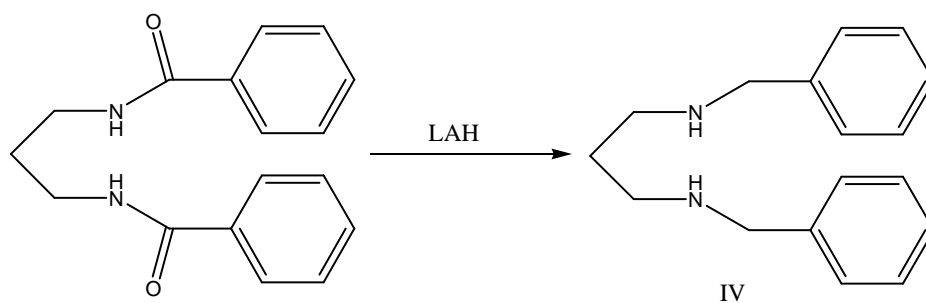
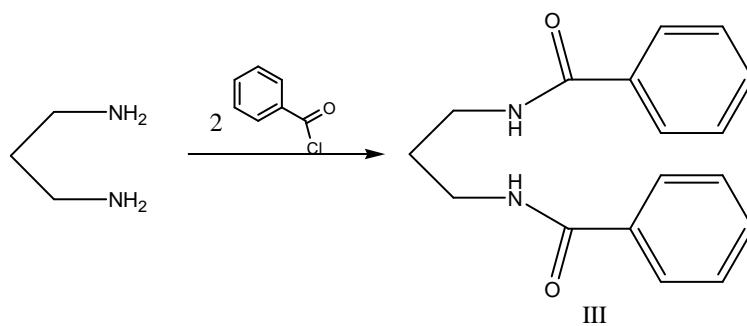
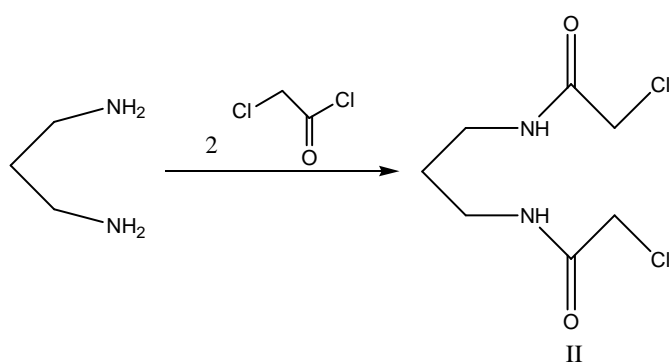
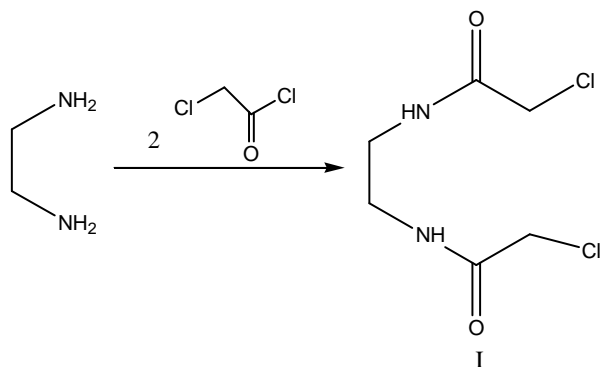


Schéma 3

Schéma přípravy prekurzorů použitých v předchozích schématech:



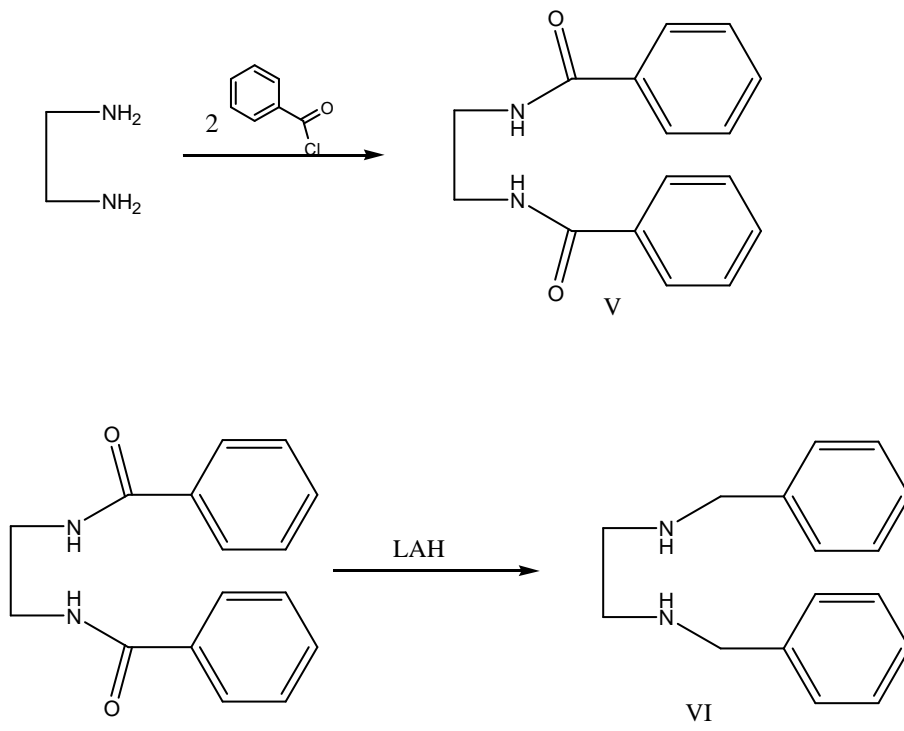


Schéma 4

4. Experimentální část

4.1 Obecná část

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian VNMRS 300. ^1H NMR spektra (300 MHz) byla měřena za teploty 25°C v CDCl_3 nebo CD_3OD . Jako vnitřní standard byl použit tetramethylsilan. ^{13}C NMR spektra (75 MHz) byla měřena za stejných podmínek, s použitím protonového dekaplingu.

LC-MS spektra byla měřena na přístroji SHIMAZDU QP 2010 s EI ionizací. ESI hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním módu, a to na přístroji ESQUIRE 3000 od firmy Bruker.

K TLC byly používány desky KIESELGEL 60 F254 od firmy Merck. Látky byly detekovány jak pod UV zářením (254 nm), tak i detekčními roztoky pro TLC.

Činidla pro detekci na TLC :

Anisaldehydové : 15 ml *p*-anizaldehydu, 4 ml AcOH, 12,5 ml konc. H_2SO_4 , 340 ml EtOAc

Ceřičité : 1 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 150 ml 10%-ní H_2SO_4 ,

Ninhydrinové : 1 % -ní roztok ninhydrinu v ethanolu

Fosfomolybdenové : 10% -ní ethanolický roztok $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ MoO}_3 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$

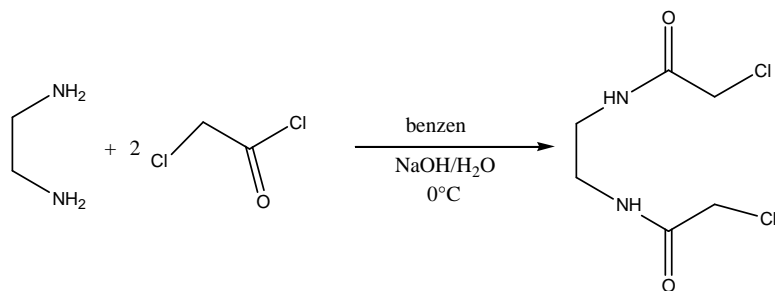
Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu 60-200 μm od firmy Merck.

Teploty tání byly stanovované na Koflerově výhřevném bloku a nejsou korigované.

Všechny použité chemikálie byly od firem Aldrich, Fluka, Merck a Lachema.

4.2 Syntetická část

4.2.1 N,N'-Bis(chloracetyl)ethyldiamin (I)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[14] .

Připravený roztok 2-chloroacetylchloridu (0,28 mol; 22,57 ml) v benzenu (50 ml) byl pomalu přikapán do směsi ethyldiaminu (9,01 ml; 0,135 mol) a hydroxidu sodného (120 ml; 5M). Reakční směs byla intenzivně míchána na magnetické míchačce a chlazena v ledové lázni (led – NaCl). Vznikala bílá sraženina. Po přikapání veškerého roztoku 2-chloroacetylchloridu v benzenu byla vzniklá sraženina odsáta na fritě. Pětkrát byla promyta vodou a nechána prosávat vzduchem do té doby, než hmota dostala podobu sypkých krystalů. Krystaly byly rozpuštěny za tepla v takovém množství ethanolu, aby vznikl přibližně nasycený roztok. Poté byl roztok nechán dva dny krystalovat. Krystaly byly odsáty na fritě a dosušeny na Petriho misce na vzduchu za laboratorní teploty.

Tento postup byl opakován ještě jednou, ale ve dvojnásobném množství.

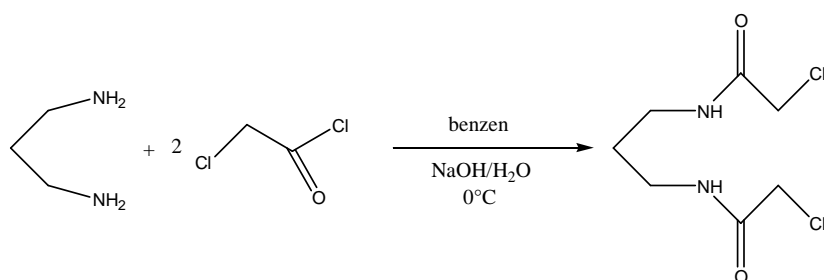
Výtěžek: 16,46 g (19,16 %) Úhrný výtěžek obou várek.

Bod tání: 173-174°C (lit.[14], 175°C)

¹H NMR : (CD₃OD) δ 3.37 s (4H, -CH₂-NH), 4.05 s (4H, -CH₂-Cl), 4.76 s (2H, -N-H)

¹³C NMR : (CD₃OD) δ 40.2 (2C, -CH₂-Cl), 43.1 (2C, -CH₂-NH), 169.8 (2C, -C=O)

4.2.2 N,N'-Bis(chloracetyl)propylendiamin (II)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[15] .

Připravený roztok 2-chloroacetylchloridu (0,28 mol; 22,57 ml) v benzenu (50 ml) byl pomalu přikapáván do směsi propylendiaminu (9,12 ml; 0,108 mol) a hydroxidu sodného (120 ml; 5 M). Reakční směs byla intenzivně míchána na magnetické míchačce a chlazena v ledové lázni (led – NaCl). Poté byla baňka s lázní obalena mikrotenovým sáčkem, pro lepší zachování nízké teploty v soustavě. Vznikala bílá sraženina. Po přikapání veškeré směsi 2-chloroacetylchloridu a benzenu byla vzniklá sraženina odsáta na fritě. Pětkrát byla promyta vodou a nechána prosávat vzduchem do té doby, než hmota dostala podobu sypkých krystalů. Surový produkt byl rozpuštěn v takovém množství ethanolu, aby vznikl přibližně nasycený roztok. Po mírném zahřátí, pro lepší rozpuštění, byl nechán roztok dva dny krystalovat za laboratorní teploty. Vzniklé krystalky byly odsáty na fritě a nechány schnout na Petriho misce na vzduchu za laboratorní teploty.

Tento postup byl proveden ještě dvakrát ve dvojnásobném množství.

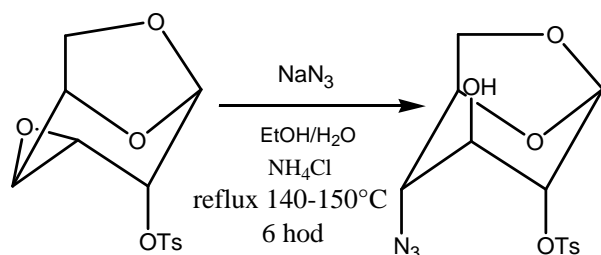
Výtěžek: 34,46 g (28,23 %) ze všech tří várek.

Bod tání: 127°C (lit.[15], 127 – 128°C)

¹H NMR : (CD₃OD) δ 1.73 pentet (2H, C-CH₂-C), 3.28 q (4H, -CH₂-N), 4.05 s (4H, -CH₂-Cl),
4.84 s (2H, N-H)

¹³C NMR : (CD₃OD) δ 29.9 (1C, C-CH₂-C), 38.0 (2C, CH₂-N), 43.1 (2C, -CH₂-Cl), 169.4 (2C, C=O)

4.2.3 1,6-anhydro-4-azido-4-deoxy-2-O-p-tolylsulfonyl- β -D-glukopyranosa (2)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[17] .

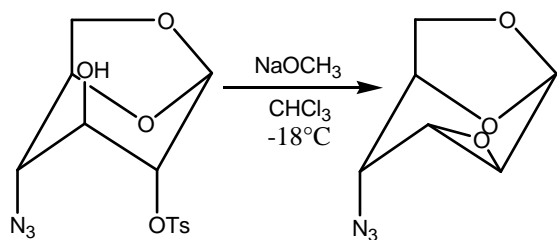
Byla smíchána dodaná látka **1** (6 g; 20,13 mmol) se směsí ethanol/voda (5:1; 50ml). Po alespoň částečném rozpuštění, kterého bylo dosaženo zvýšením teploty na olejové lázni cca na 100°C pod zpětným chladičem, byl do reakční směsi přisypán azid sodný (8 g; 0,123 mol) a chlorid amonný (8 g). Reakční směs pak byla zahřívána 6 hodin na olejové lázni na 140-150°C. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Po vymizení výchozí látky byla reakční směs ochlazena a odpařena na vakuové odparce (VRO) do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a směs byla extrahována vodou. Poté byla oddělená organická fáze nechána sušit přes noc nad MgSO₄. Hnědé zabarvení chloroformového roztoku bylo odstraněno filtrací přes malý sloupeček silikagelu. Zahuštěním na VRO byl získán bezbarvý odparek čistého produktu **2**, který byl vzat bez dalšího čištění do následné reakce.

Tento postup byl opakován ještě dvakrát ve dvojnásobném množství.

Výtěžek olejovitého produktu: 33,1 g (96,4 %) ze všech tří várek.

Surový produkt byl kontrolován pomocí TLC (benzen/acetone 10:1 a hexan/EtOAc 1:1) oproti dodanému autentickému vzorku.

4.2.4 1,6:2,3-Dianhydro-4-azido-deoxy- β -D-mannopyranosa (3)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[17] .

Získaný surový azid **2** (33,1 g) byl rozpuštěn v chloroformu (420 ml) a směs byla ochlazena pomocí lázně (ethanol-suchý led) na -18°C. Poté byl opatrně přikapán methanolát sodný (132,4 ml; 1,3 M), který byl připraven z methanolu (135 ml) a sodíku (4 g). Reakční směs pak byla nechána ohřát na pokojovou teplotu a stát přes noc. Následně byla nalita do 200 ml vody, extrahována chloroformem a vysušena pomocí MgSO₄. Po vysušení byl roztok přefiltrován přes fritu a na VRO odpařen na sirup (15,8 g). Poté byl produkt krystalován ze směsi dietylexer/hexan (3:1).

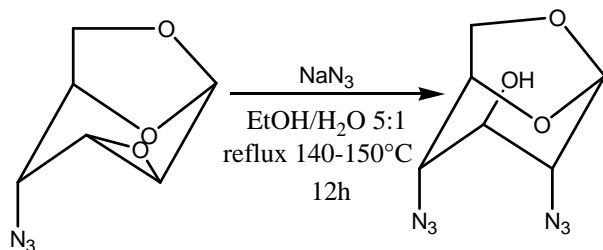
Na TLC (benzen/dietylexer 20:1) bylo patrné znečištění produktu, proto byl rozpuštěn v toluenu a přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází toluen/ethylacetát (9:1). Bylo jímáno 10 frakcí, z toho přítomnost produktu **3** byla zjištěna podle TLC (toluen/EtOAc 9:1) ve třech frakcích. Tyto frakce byly odpařeny na VRO a bylo získáno 13,24 g olejovitého odparku. V 6. frakci byla zjištěna přítomnost produktu **3**, ale i další nežádoucí látky, proto byla směsná frakce opět rozpuštěna v malém množství toluenu a následně provedena sloupcová chromatografie. Přítomnost látky **3** byla zjištěna ve frakcích 7, 8 a 9, ze kterých se odpařením získalo 3,37 g. Celkově jsme po chromatografii získali 16,61 g čistého produktu **3** ve formě hustého sirupu, který nebyl dále krystalován.

Výtěžek: 16,61 g (101,22 %) Výsledný produkt **3** je s nepatrným obsahem rozpouštědel.

¹H NMR : (CDCl₃) δ 3.27 m (1H, C₄H), 3.52 m (2H), 3.78 m (2H), 4.57 m (1H, C₅H), 5.76 d (1H, C₁H)

¹³C NMR : (CDCl₃) δ 47.8 (1C, C₂), 54.0 (1C, C₃), 57.0 (1C, C₄), 66.5 (1C, C₆), 72.2 (1C, C₅), 97.7 (1C, C₁)

4.2.5 1,6-Anhydro-2,4-diazido-2,4-dideoxy- β -D-glukopyranosa (4)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[17] .

Látka **3** (3,37 g) byla při cca 100°C pod zpětným chladičem, rozpuštěna ve směsi ethanol/voda (5:1; 75,8 ml). Po rozpuštění výchozí látky byla teplota zvýšena na 140-150°C a k reakční směsi byl přidán azid sodný (6,3 g; 0,1 mol) a chlorid amonný (5,8 g). Reakce byla zahřívána přibližně 12 hod a její průběh byl sledován pomocí TLC. Po ukončení reakce byla reakční směs odpařena do sucha, rozpuštěna v chloroformu, promyta vodou a sušena nad sušidlem (MgSO_4). Po odfiltrování sušidla byla směs zahuštěna na VRO, odparek rozpuštěn v ethylacetátu a postupně byl do směsi přidáván hexan (tak rychle, aby nevznikala sraženina). Poté byla směs přenesena na kolonu se silikagelem a podrobena sloupcové chromatografii, mobilní fáze EtOAc/hexan (1:1). Z TLC (EtOAc/hexan 1:1) bylo patrné, že frakce 1, 2 a 3 obsahují produkt **4**. Po odpaření jsme získali 3,93 g produktu **4** ve formě hustého sirupu.

Postup byl opakován ještě dvakrát. V druhé várce se vycházelo z výchozího množství 6,62g látky **3** a po odpaření bylo získáno 4,41 g. Ve třetí várce bylo výchozí množství látky **3** 6,62 g a po odpaření odparek vážil 7,45 g. Celkově bylo získáno 15,79 g čistého produktu **4** ve formě hustého sirupu.

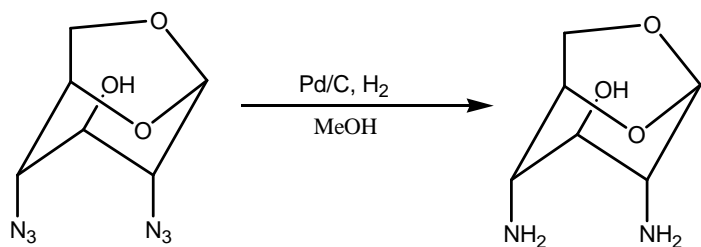
Výtěžek: 15,79 g (75,77 %)

$^1\text{H NMR}$: (CDCl_3) δ 3.01 b (1H, O-H), 3.4 d (1H, C_2H), 3.48 d (1H, C_4H), 3.78-3.86 m (2H, C_6HH , C_3H), 4.12 d (1H, C_6HH), 4.62 d (1H, C_5H), 5.51 s (1H, C_1H)

$^{13}\text{C NMR}$: (CDCl_3) δ 62.6, 62.7 (2C, C_2, C_4), 66.8 (1C, C_6), 70.7 (1C, C_3), 74.5 (1C, C_5), 100.8 (1C, C_1)

NMR spektrum souhlasí s lit. [17].

4.2.6 1,6-Anhydro-2,4-diamino-2,4-dideoxy- β -D-glukopyranosa (5)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[17] .

Diazid **4** (2,2 g) byl rozpuštěn v methanolu (100 ml). Bylo přidáno 10 %-ní paladium na uhlí (0,26 g) a baňka byla uzavřena septem. Poté byla celá baňka probublávána dusíkem, abychom se zbavili přebytečného kyslíku v reakční baňce. Následovalo sycení roztoku vodíkem. Předpokládaná spotřeba vodíku byla 0,44 l. Po dokončení reakce, o kterém jsme se přesvědčili pomocí TLC (EtOAc/MeOH 1:1), byla směs přefiltrována na fritě přes filtrační papír a křemelinu. Poté byla směs odpařena na VRO. Byla získána nažloutlá částečně krystalická látka vážící 1,58 g, která byla rozpuštěna v malém množství ethanolu a nechán a krystalovat při 10°C v lednici. Vzniklé krystaly byly odsáty a nechány vysušit na vzduchu za laboratorní teploty. Suché krystaly produktu **5** měly hmotnost 0,446 g.

Postup byl opakován ještě dvakrát, s výchozím množstvím 6,14 g a 7,45 g diazidu. Odparek z druhé várky vážil 3,66 g a ze třetí 4,49 g.

Druhá a třetí várka diaminu **5** nekrystalovaly, proto bylo přidáno ke spojeným várkám aktivní uhlí, roztok byl mírně zahřán a přefiltrován přes filtrační papír a malé množství silikagelu. Při jímání filtrátu do litrové baňky došlo k nasátí neznámého množství vody z vodní vývěvy. Filtrát byl sušen nad MgSO₄ a byl nechán stát v lednici. Přefiltrováním přes křemelinu byl roztok zbaven sraženiny (pravděpodobně se jednalo o sraženinu soli), která byla poté spolu s MgSO₄ promyta methanolem. Mateční louh byl odpařen na VRO (odparek obsahující sole vážil 30 g) a rozpuštěn v ethanolu. Diamin byl v ethanolu rozpustný, sůl vypadla v podobě pevné látky, proto byl roztok přefiltrován přes křemelinu, následně odpařen na VRO (6,8 g) a nechán krystalovat z ethanolu. Podle TLC (EtOAc/MeOH 1:2) byla zjištěna přítomnost diaminu jak v matečním louhu tak i ve sraženině, z které se špatně extrahoval. Odpařený diamin ani po přečištění nekrystalizoval, pravděpodobně byla v produktu ještě v nepatrném množství přítomna voda.

Výtěžek (z první várky): 0,446 g (26,8 %)

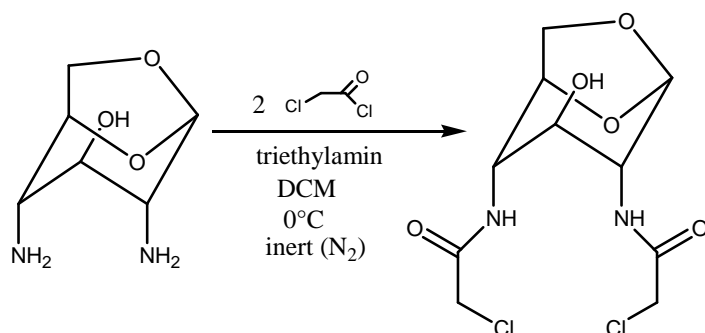
Bod tání: 151-154°C (lit.[17], 152 – 155°C)

$^1\text{H NMR}$: (CD_3OD) δ 2.67 s (1H, C_2H), 2.74 s (1H, C_4H), 3.48 m (1H, C_6HH), 3.68 t (1H, C_3H),
4.14 d (1H, C_6HH), 4.38 d (1H, C_5H), 4.83 bs (5H, N-H, O-H), 5.28 s (1H, C_1H)

$^{13}\text{C NMR}$: (CD_3OD) δ 56.2 , 56.5 (2C, C_2 , C_4), 67.4 (1C, C_6), 76.3 (1C, C_3), 78.1 (1C, C_5), 104.6
(1C, C_1)

m/z : [pro $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$, $\text{M} = 160,2$] ; 161.2 [$\text{M}+\text{H}^+$]⁺

4.2.7 1,6-Anhydro-2,4-dideoxy-2,4-dichloroacetamido- β -D-glukopyranosa (8)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[19] .

Mateční louh po krystalech první várky diaminu **5** byl odpařen na VRO. Získaný odparek surové látky **5** 0,93 g (0,0058 mol) byl rozpuštěn v dichlormethanu (50 ml) a pak přidán diisopropylethylamin (5,2 ml; 0,03 mol). Směs byla ochlazená v ledové lázni (led-voda). Poté byl pomalu, po dobu 10 minut, přikapáván roztok 2-chloroacetylchloridu (1,02 ml; 0,0128 mol) v 5 ml dichlormethanu za intenzivního míchání. Reakční směs, z počátku bezbarvá, po přidání větší části 2-chloroacetylchloridu postupně zčernala. Po dokončení reakce, což bylo v krátkém časovém intervalu po dokapání, průběh reakce byl kontrolován na TLC (EtOAc/MeOH 1:2), byla reakční směs odpařena na VRO. Odparek byl rozpuštěn ve směsi EtOAc/EtOH (1:1) a následně byla provedena sloupcová chromatografie na silikagelu, kde jako mobilní fáze sloužila právě směs EtOAc/EtOH (1:1). Odpařena byla frakce 3, která byla

následně opět podrobena sloupcové chromatografii a z ní pak byly získány frakce 1-4, které pravděpodobně obsahovaly dichloramid, podle TLC (EtOAc/EtOH 2:1).

Druhý pokus byl proveden obdobně, jen s tím rozdílem, že byl místo diisopropylethylaminu použit triethylamin, 2-chloracetylchlorid byl přikapáván velmi pomalu, po dokapání byla směs míchána 3 dny a celá reakce probíhala pod inertní atmosférou (N₂). Výchozí množství diaminu bylo v druhém pokusu 0,16 g. Jako v první várce, následovala sloupcová chromatografie na silikagelu s mobilní fází EtOAc/EtOH (2:1). Odpařeny byly frakce 2 a 3, které podle TLC (EtOAc/EtOH 2:1) pravděpodobně obsahovaly dichloramid.

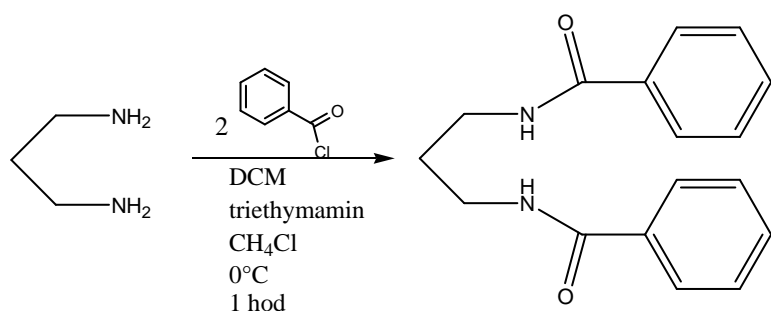
Třetí pokus proběhl z nezkrystalované druhé a třetí várky diaminu. Do směsi diamin (6,8 g), dichlormethan (400 ml) a triethylamin (22,1 g; 31 ml) byl po dobu 10 min přikapáván roztok 2-chloracetylchloridu (10,625 g, 7,5 ml) ve 40 ml dichlormetanu. Reakce probíhala pod inertní atmosférou (N₂) a za snížené teploty. Směs byla nechána míchat 3 dny, poté do ní byl přidán vodný roztok chloridu amonného (250 ml), pro rozpuštění vzniklých solí, a byla několikrát extrahována dichlormethanem (100 ml), dokud ve vodné fázi nebyly stopy produktu, což bylo sledováno pomocí TLC (EtOAc/EtOH 2:1). Poté byla organická fáze protřepána nasyceným roztokem chloridu sodného a nechána sušit nad K₂CO₃. Po přefiltrování a zahuštění na VRO byl odparek 5,08 g podroben sloupcové chromatografii na silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit čistý ethylacetát. Odpařeny byly frakce 16-22 (3,75 g), 24-26 (0,65 g) a směsné frakce 14, 15 a 23. Kontrola frakcí probíhala pomocí TLC (EtOAc/EtOH 2:1).

Získané frakce z chromatografií pokusů 1 – 3 byly analyzovány. Podle naměřených ¹H NMR spekter lze usuzovat, že všechny analyzované chromatografické frakce obsahují více látek a ve všech byly nalezeny signály potvrzující přítomnost sacharidového skeletu. Vybrané vzorky chromatografických frakcí pak byly nechány analyzovat pomocí LC-MS, ale ani v jednom případě nebyla potvrzena přítomnost hledané látky **8**.

Čtvrtý pokus byl proveden z čistého krystalického diaminu. Do směsi diamin (0,141 g), dichlormethan (8 ml) a triethylamin (0,46 g; 0,634 ml) byl po dobu 10 min přikapáván chlorid kyseliny chloroctové (0,22 g; 0,156 ml). Reakce probíhala pod inertní atmosférou (N₂) a za snížené teploty, obdobně jako v předešlých případech. Proběhnutí reakce bylo zřejmé z TLC (EtOAc/EtOH 2:1). Po vysušení K₂CO₃ a odpaření, činil odparek 0,0994 g.

TLC vypadala obdobně jako v předešlých případech. Je tedy jasné, že reakce neběžela tak jak by měla, ani když se vycházelo z čistého krystalického diaminu. Produkt nebyl potvrzen pomocí NMR ani pomocí LC-MS.

4.2.8 N,N'-Dibenzoyl-1,3-propandiamin (III)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[20] .

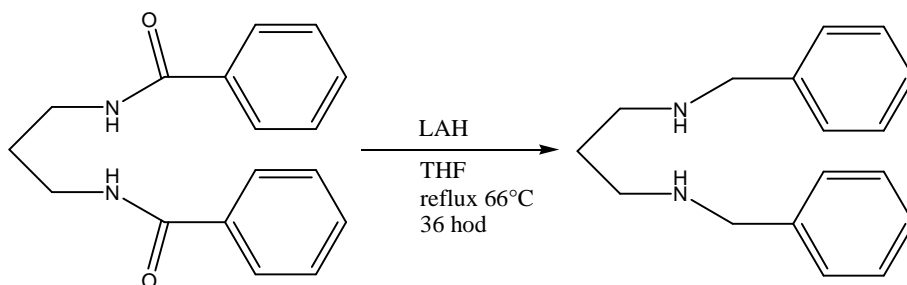
Do reakční směsi obsahující 1,3-diaminopropan (5 ml; 59,9 mol), dichlormethan (160 ml) a triethylamin (20,8 ml; 149,7 ml) byl za míchání po dobu 10 minut přikapáván benzoylchlorid (13,9 ml; 119,8 mmol) rozpuštěný v dichlormetanu (50 ml). Reakce probíhala za snížené teploty (led-NaCl). Po přikapání benzoylchloridu byla směs nechána ohřát na laboratorní teplotu a dále se míchala 1 hodinu. Po ukončení reakce, sledováno pomocí TLC (EtOAc/EtOH 4:1), byl přidán chlorid amonný (60 ml). Vznikla bílá sraženina, která byla odsáta přes křemelinu a vodná fáze filtrátu byla třikrát extrahována dichlormethanem (50 ml). Spojené oddělené organické vrstvy byly promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (30 ml) a organická fáze sušena nad $MgSO_4$. Po odfiltrování sušidla byl filtrát odpařen na VRO. Po odpaření v roztoku vznikla sraženina, která byla odsáta na fritě. Tato situace vzniku a odsátí sraženiny se opakovala ještě dvakrát. Pomocí TLC (DCM/EtOAc 9:1) bylo zjištěno, že první sraženina (2,59 g) obsahuje ještě zbytky benzoylchloridu, druhá (0,32 g) a třetí (0,24 g) sraženina jsou čisté. Výsledek z NMR prokázal, že se jedná o žádaný produkt III. [20]

Výtěžek: 3,156 g (18,67 %)

1H NMR : (CD_3OD) δ 1.90 kvintet (2H, C- CH_2 -C), 3.48 t (4H, - CH_2 -N), 4.85 s (2H, N-H), 7.42-7.54 m (6H, Ph-H), 7.84 d (4H, Ph-H)

^{13}C NMR : (CD_3OD) δ 30.4 (1C, C- CH_2 -C), 38.3 (2C, CH_2 -N), 128.2 (4C, Arom.), 129.5 (4C, Arom.), 132.6 (2C, Arom.), 135.6 (2C, Arom.), 170.3 (2C, C=O)

4.2.9 N,N'-Dibenzyl-1,3-propandiamin (IV)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[20] .

Surový produkt dibenzoyldiamidu (III) 1,78 g byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (THF) (100 ml) a po uvedení do varu (66°C) byl za míchání postupně přidán lithiualuminiumhydrid (LAH) (1,4 g). Celá reakce byla nechána zahřívát 36 hodin pod zpětným chladičem a její průběh byl kontrolován pomocí TLC (EtOAc/EtOH 4:1).

Pozn.: LAH byl poměrně starý a reakce tudíž neprobíhala příliš bouřlivě. V průběhu reakce byl LAH přidáván. Během reakce, díky špatně fungujícímu přívodu vody, došlo k odpaření veškerého THF, který byl poté doplněn.

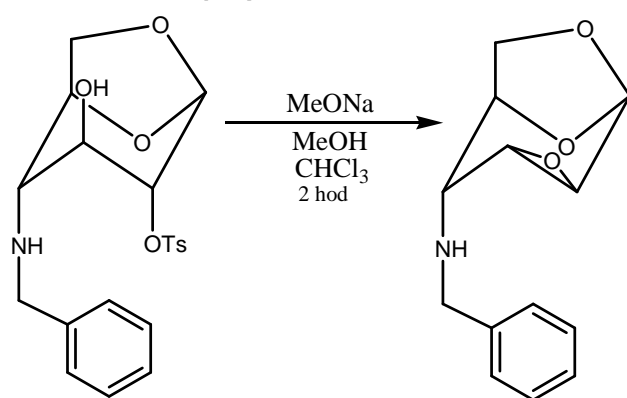
Po zchladnutí reakční směsi na laboratorní teplotu byla za míchání do ní přidána po kapkách voda (10 ml), vodný roztok hydroxidu sodného (6 ml; 15 % roztok) a opět voda (15 ml), to vše za chlazení (led-voda). Směs byla míchána 2 hodiny a poté přefiltrována přes křemelinu. Zachycená sraženina byla ještě třikrát promyta etherem (75 ml). Spojené etherické vrstvy byly sušeny nad MgSO_4 . Po odfiltrování sušidla byl filtrát zahuštěn na VRO. Odparek činil 1,19 g. Pomocí TLC (EtOAc/EtOH 4:1) byla identifikována směs několika látek. Následovala sloupcová chromatografie na silikagelu s mobilní fází EtOAc. Odpařeny byly frakce 3 a 4, které obsahovaly čistý produkt (III). Odparek 0,50 g.

Výtěžek: 0,50 g (31,22 %)

$^1\text{H NMR}$: (CDCl_3) δ 1.68 m (2H, C- CH_2 -C), 2.53 t (4H, - CH_2 -N), 3.21 s (2H, CH_2 -Ph), 3.54 s (2H, CH_2 -Ph), 7.19-7.35 m (10H, Ph-H)

$^{13}\text{C NMR}$: (CDCl_3) δ 22.8 (1C, C- CH_2 -C), 52.0 (2C, CH_2 -N), 59.3 (2C, CH_2 -Ph), 126.9 (2C, Arom.), 128.1 (4C, Arom.), 128.5 (4C, Arom.), 138.1 (2C, Arom.)

4.2.10 1,6:2,3-Dianhydro-4-benzylamino-4-deoxy- β -D-mannopyranosa (15)

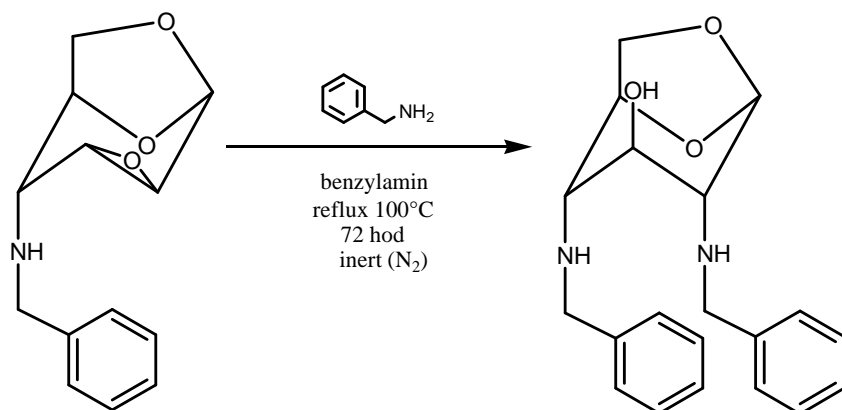


Reakce byla provedena podle postupu v lit.[21] .

Do 250 ml baňky byl vložena dodaná látka **14** (3 g; 7,4 mol), chloroform (25 ml), methanol (50 ml) a methanolát sodný (50 ml MeOH; 0,57 g Na; 21,7 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty a přibližně za 2 hod byly jednotlivé složky rozpuštěny. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (toluen/aceton 2:1; benzen/aceton 10:1). Po dokončení reakce byla reakční směs odpařena na VRO a odparek extrahován mezi vodný roztok NH_4Cl (20 ml) a CH_2Cl_2 (30 ml). Oddělená organická fáze byla vysušena nad MgSO_4 . Po odfiltrování sušidla byl filtrát zahuštěn na VRO . Bylo získáno 2,26 g surového produktu **15** ve formě hustého oleje, který byl okamžitě použit do další reakce.

Výtěžek: 2,26 g (130,92 %)

4.2.11 1,6-Anhydro-2,4-dibenzylamino-2,4-dideoxy- β -D-glukopyranosa (16)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[21] .

K odparku surového produktu **15** (2,26 g) byl přidán benzylamin (3 ml). Tato směs byla refluxována na olejové lázni při 100°C 3 dny, pod inertní atmosférou (N₂). Vznikla světle hnědá kašovitá hmota, která byla naředěna EtOH (10 ml), pro lepší rozpuštění. Nerozpustilo se vše. Dvojnásobnou filtrací směsi postupně vznikly dvě sraženiny, žlutá a bílá. Pomocí TLC (toluen/aceton 1:1) bylo ověřeno, že v případě ani jedné sraženiny se nejedná o nežádoucí produkt zavření epiminu. Mateční louh byl pomocí stejné TLC identifikován jako směs několika látek a po jeho odpaření na VRO byl kašovitý odparek promyt EtOAc, kvůli rozpuštění nezreagovaného benzylaminu. Vnikla bílá sraženina byla poté přefiltrována a sušena na Petriho misce. Mateční louh byl opět zahuštěn na VRO a byla provedena extrakce mezi DCM a vodný roztok KHSO₄. Roztokem KHSO₄ byla organická fáze ještě několikrát protřepána. Spojené vodné fáze byly zalkalizovány ekvivalentním množstvím Na₂CO₃ a několikrát extrahovány 20 ml DCM. Přítomnost produktu **16** ve vodné fázi byla kontrolována pomocí TLC (toluen/aceton 1:1). Vodná fáze byla po té zahuštěna na VRO a odparek znovu naředěn EtOH. Vznikla sraženina, ta byla odsáta na fritě, rozpuštěna ve vodě s přídavkem NaOH a protřepána CH₂Cl₂. Vodná a DCM fáze byly porovnány pomocí TLC (toluen/aceton 1:1). DCM vrstva byla odsáta na fritě, odpařena na VRO. Získaný odparek (0,193 g) byl přečištěn přes malý sloupec silikagelu, mobilní fáze DCM/MeOH (10:1). Zahuštěním jímaného eluátu na VRO bylo získáno 0,185 g hustého olejovitého odparku čistého produktu **16**.

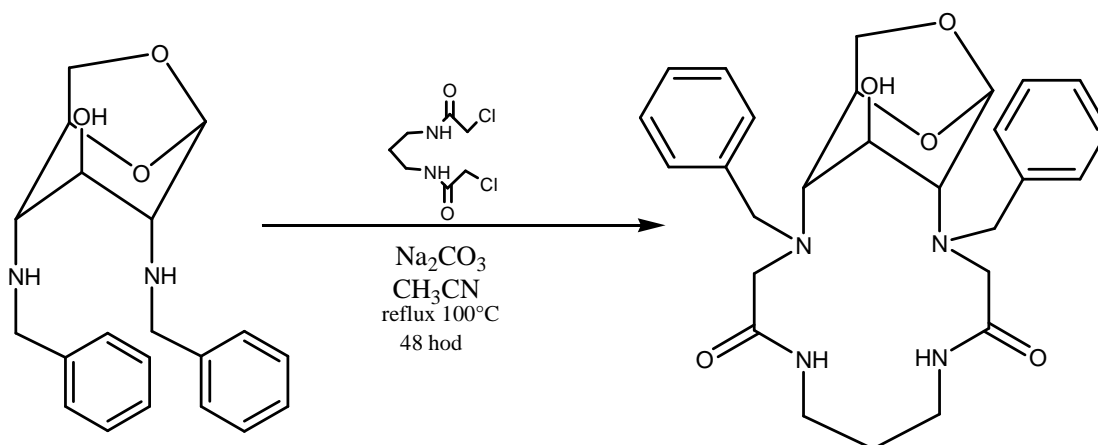
Výtěžek: 0,185 g (5,61 %)

$^1\text{H NMR}$: (CDCl_3) δ 2.50 bs (3H, N-H a O-H), 2.67 s (1H, C_2H), 2.75 s (1H, C_4H), 3.71 dd (1H, C_6HH), 3.80-3.90 m (5H, C_3H a 2 Ph- CH_2), 4.11 d (1H, C_6HH), 4.52 d (1H, C_5H), 5.49 s (1H, C_1H), 7.26-7.32 m (10H, Ph-H)

$^{13}\text{C NMR}$: (CDCl_3) δ 51.4 (1C, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 51.6 (1C, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 60.4 (1C, neurčeno), 60.8 (1C, neurčeno), 66.7 (1C, neurčeno), 68.8 (1C, neurčeno), 75.2 (1C, C_5), 102.5 (1C, C_1), 127.1 (1C, Arom.), 127.2 (1C, Arom.), 128.1 (4C, Arom.), 128.4 (2C, Arom.), 128.5 (2C, Arom.), 139.4 (1C, Arom.), 139.6 (1C, Arom.)

m/z : [pro $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$, $\text{M} = 340,2$] ; 341.3 [$\text{M}+\text{H}^+$]⁺

4.2.12 3,13-Dibenzyl-19-hydroxy-3,6,10,13tetraaza-17,18-dioxatricyklo[13.2.1.1^{2,4}]nonadekan-5,11-dion (11b)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.[22] .

Reakční směs složená ze sloučeniny **16** (92,5 mg; 0,27 mmol), dichlordiamidu (**II**) (0,055 g), acetonitrilu (6,76 ml) a bezvodého Na_2CO_3 (0,56 g) byla zahřívána pod zpětným chladičem při 100°C po dobu 2 dnů. Poté byla provedena kontrola pomocí TLC (DCM/MeOH 10:1). Bylo zjištěno množství nezreagované výchozí látky **16**, proto byl přidán bezvodý Na_2CO_3 (200 mg) a dichlordiamid (**II**) (30 mg). Přibližně půl hodiny po přidavku byla směs opět kontrolována pomocí TLC a reakce byla ukončena pro nepřítomnost výchozí látky **16** . Díky špatnému přívodu H_2O do chladiče se z reakční směsi odpařilo rozpouštědlo, a proto bylo přidáno další množství acetonitrilu (3 ml). Výsledkem reakce byla podle TLC (DCM/MeOH 15:1) směs

několika látek. Ochlazená reakční směs byla filtrována přes fritu č.4 a sraženina na fritě byla několikrát promyta MeOH. Spojené methanolvé filtráty byly zahuštěny a odparek byl podroben sloupcové chromatografii. Mobilní fází byla směs DCM/MeOH (15:1). Jímáno bylo 7 frakcí s tím, že po poslední frakci byla použita mobilní fáze DCM/MeOH (10:1). Frakce 4 byla převedena do malé apolky a odpařena (3,9 mg). Měření vzorku na LC-MS potvrdilo přítomnost pěti látek, z nichž jedna byla identifikována jako námi hledaná sloučenina **11b** . Výsledné spektrum potvrzující identifikaci produktu je uvedeno v příloze.

m/z : [pro $C_{27}H_{34}N_4O_3$, $M = 494,3$] ; 495.3 [$M+H^+$]⁺

5. Výsledky a diskuse

První tři kroky syntézy, jedná se tedy o látky **2**, **3** a **4**, byly dobře proveditelné, výtěžky byly celkem vysoké, ale jsou vztaženy jen na zahuštěné produkty, takže váha produktu je zatížena chybou zůstatků rozpouštědel. Vedlejší látka izolovaná při chromatografickém čištění látky **3** nebyla identifikována, ale podle ^1H NMR spektra bylo usouzeno na látku se sacharidovým skeletem. Mohlo by se jednat o 4-chloro-produkt, který může vznikat při přípravě azidoderivátu **2** [23]. Naměřená ^1H a ^{13}C NMR spektra látek **3**, **4** a **5** jsou odpovídající údajům v citované literatuře [17,18].

Při přípravě látky **5** došlo při čistící operaci ke kontaminaci produktu vodou. A pravděpodobně nedostatečné odstranění vody mohlo být jednou z příčin neúspěchu při následné přípravě látky **8**. Jako další chybou by se mohlo jevit použití triethylaminu či diisopropyletylaminu jako báze pro odstranění vznikajícího chlorovodíku, kdy není jasná bazicita aminových dusíku na sacharidovém skeletu. Vhodnější by bývalo bylo použít silnější bázi, jako např. pyridin nebo uhličitan sodný či draselný, nebo zvážit použití anhydritu kyseliny 2-chloroctové jako alkylační činidlo [24]. Tato reakce byla prováděna jak z matečního louhu první várky diaminu, tak z nezkrystalizované druhé a třetí várky, tak i z čistého krystalického diaminu. Ani v jednom případě reakce neproběhla. Naměřená ^1H a ^{13}C NMR spektra některých vybraných chromatografických frakcí ukazovala na přítomnost sacharidového skeletu, ale ne úplně odpovídala simulovanému spektru námi hledané látky. Analýza LC-MS pak jen potvrdila nepřítomnost naší látky **8**, jiné hodnoty hmot molekulových ionů, ale též nepřítomností atomů chloru, charakteristický poměr význačných izotopů 3:1 v signálech molekulových ionů.

Schéma popsaných kroků:

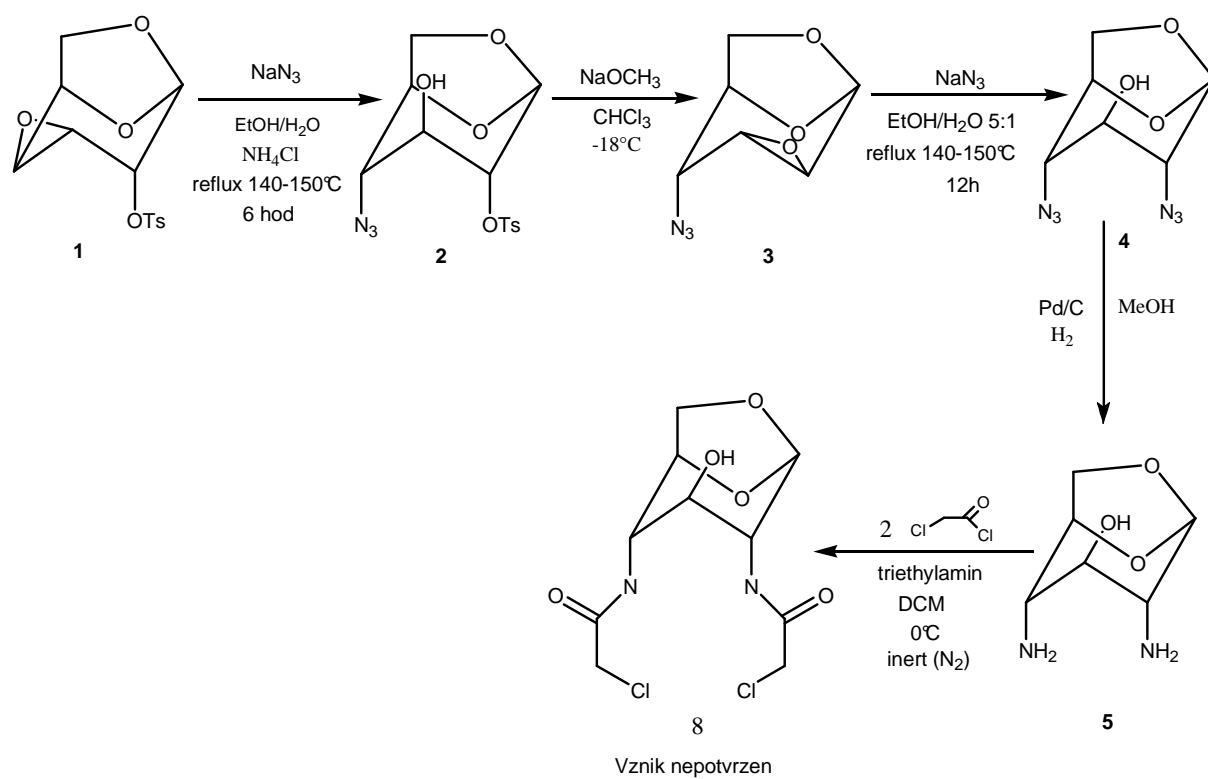


Schéma 5

Po neúspěšné reakci vedoucí ke sloučenině **8** byla navržena jiná reakční cesta, zobrazena na schématu 6.

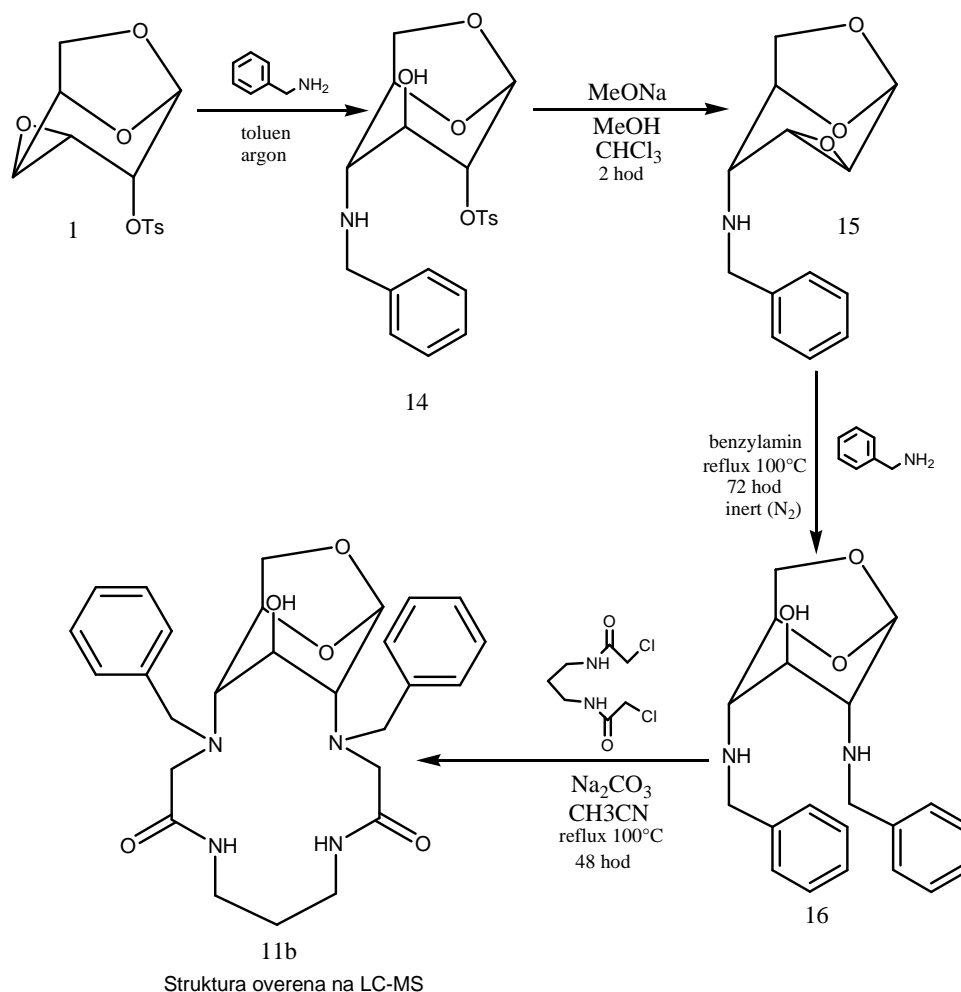


Schéma 6

Jako výchozí látka byla v našem případě použita látka **14**. Z ní následná reakce na látku **15** byla provedena bez větších problémů a zároveň i s výtěžkem přes 100% (130,9%) v důsledku nedostatečného odstranění rozpouštědel z produktu. Reakce vedoucí k látce **16** byla však problematická. Výtěžek byl pouhých 5,6%. Domníváme se, že nízký výtěžek reakce je způsoben vznikem vedlejšího produktu, kdy by přednostně mohlo dojít k přesmyku oxiranového kruhu na aziridinový nebo ztráty způsobené při odstraňování benzylaminu při zpracování reakce. Při výsledku reakce přípravy látky **11b** musíme zvážit, že Crab-like cyklizační reakce obecně dávají nízké výtěžky, když použitý dichlordiamid je připraven z primárního diaminu. Nahrazení alkylem jednoho vodíku na jedné ze dvou amidických skupin vede již k velmi rapidnímu zvýšení výtěžku. V našem případě tedy nemůžeme

očekávat vysoký výtěžek, i když tato reakce pro přípravu makrocyklů nepotřebuje techniku vysoce naředěných roztoků, aby dosáhla výtěžků 40-50% [25,26,27]. Měření chromatografické frakce 4 na LC-MS potvrdilo přítomnost pěti látek, z nichž jedna byla identifikována jako námi hledaná sloučenina **11b**. Výsledné spektrum potvrzující identifikaci produktu je uvedeno v příloze.

Příprava látek **I**, **II**, **III** a **IV** proběhla s mnohem menším výtěžkem než je popisováno v literatuře[19]. Připravená množství látek však byla dostačující, a tak nebylo nutno provádět optimalizaci reakcí či provést přípravu látek jinou syntetickou cestou.

Schéma těchto reakcí je znázorněno ve schématu 7.

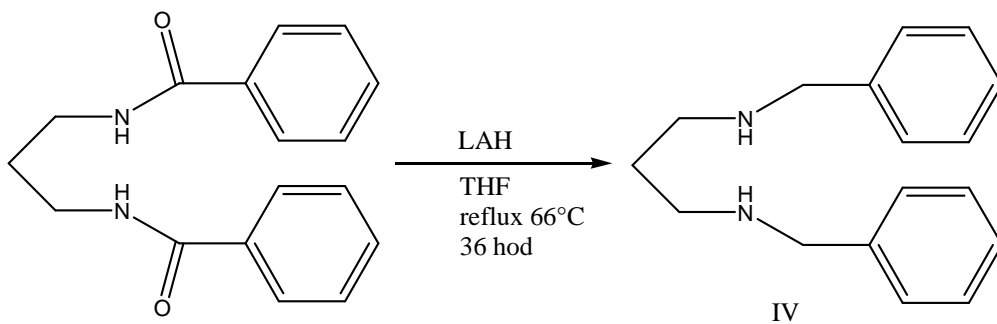
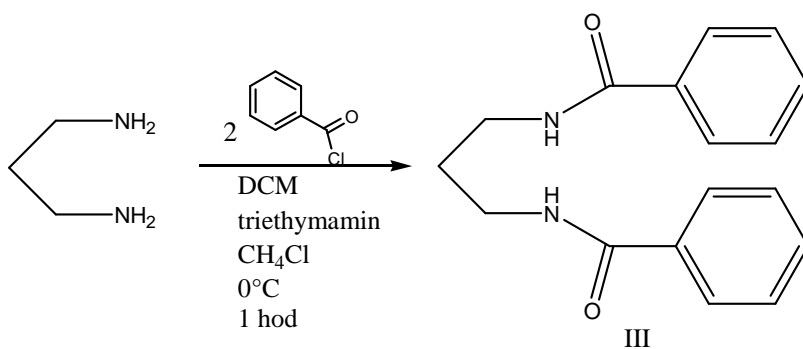
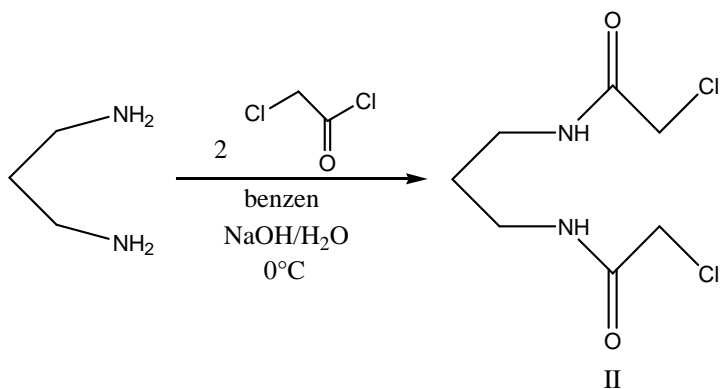
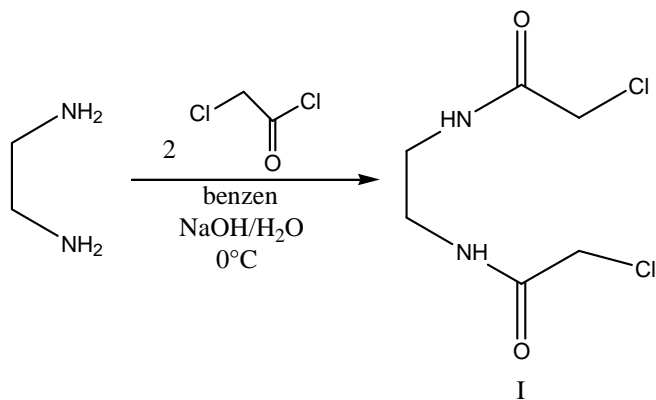
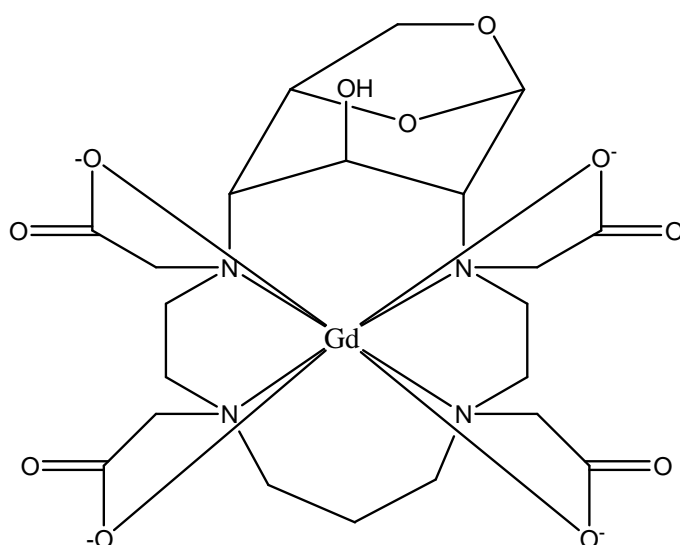


Schéma 7

6. Závěr

Po neúspěchu připravit sloučeninu **8** byla nutná změna celé reakční cesty. Z těchto a časových důvodů nedošlo k přípravě látek **10a**, **10b**, **12a** a **12b**. Po změně reakčního schématu na schéma 6 byla připravena látka **11b**, jejíž existence byla ověřena na LC-MS.

Navrhované další zpracování sloučeniny **11b** je redukce kyslíků na dusíkatém cyklu, odredukování benzylů a následné navázání zbytků kyseliny chloroctové na všechny čtyři dusíky. Cílem by mělo být zvýšení stability gadolinitého komplexu.



obr. 15: návrh struktury ligandu pro další zpracování sloučeniny **11b**

7. Literatura

- [1] <http://www.natur.cuni.cz/anorchem/19/Vyzkum.htm>
- [2] Grobner T.; *Nephrol Dial Transplant.*, **2006**,21(4),1104-8. Erratum **2006** Jun; 21(6),1745.
- [3] <http://www.sukl.cz/>
- [4] BARTUŠEK, D.; *Diagnostické zobrazovací metody pro bakalářské studium fyzioterapie a léčebné rehabilitace*, **2004**, 1 ed.
- [5] PFEIFFER, J.; *Neurologie v rehabilitaci*, **2007**
- [6] MERBACH, A., E.; TÓTH, É.; *The chemistry of Contrasts Agents in Medical Magnetic Resonance imaging*, John Wiley & Sons, Chichester, **2001**
- [7] VLAARDINGERBROEK, M., T.; BOER J., A.; *Magnetic Resonance Imaging, Theory and Practice* ,Springer, Verlag, **1996**
- [8] HERMANN, P.; KOTEK, J.; KUBÍČEK, J.; LUKEŠ, I.; *Dalton Trans.*, **2008**, 3027-3047
- [9] GOTTSCHALDT, M.; SCHUBERT, U., S.; *Chem. Eur. J.*, **2009**,15, 1548-1557
- [10] SCHATZSCHNEIDER, U.; METZLER-NOLTE, N.; *Angew. Chem.*, **2006**, 118, 1534-1537; *Angew. Chem. Int. Ed.*,**2006**, 45, 1504-1507
- [11] STORR, T.; THOMPSON, K.; H., ORVIG, C.; *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 534-544
- [12] CIPOLLA, L.; PERI, F.; AIROLDI, C.; *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*,**2008**, 8, 92-121
- [13] MA, D.-L.; SHUM, T.; Y.-T.; ZHANG, F.; CHE, C.-M.; YANG, M.; *Chem. Commun.*, **2005** ,4675-4677
- [14] GOTO, M.; OKUBO, A.; SAWAI, T.; YOSHIKAWA, S.; *Inorg. Chem.*,**1970**, 9, 1489
- [15] BRADSHAW, J.S.; KRAKOWIAK, K.E.; IZATT, R.M.; *J. Heterocycl. Chem.*, **1989** , 26, 1431
- [16] RODOPOULOS, T.; ISHIHARA, K.; RODOPOULOS, M.; ZAWOROTKO, M. J.; MAEDER, M.; MCAULEY, A.; *Can. J. Chem.*, **2005**, 83, 894 – 902

- HENG, S.; STIEGLITZ, K. A.; ELDO, J.; XIA, J.; CARDIA, J. P.; KANTROWITZ, E. R.;
Biochemistry, **2006**, 45, 10062 - 10071
- [17] PAULSEN, H.; KOEBERNICK, H.; *Chem. Ber.*, **1976**, 109, 104-111
- [18] BAILLIEZ, V.; OLESKER, A.; CLEOPHAX, J.; *Tetrahedron*, **2004**, 60(5), 1079 - 1085
- [19] ALEXAKIS, A.; CHAUVIN, A.-S.; STOUVENEL, R.; VRANCKEN, S.M.; MANGENEY, P.;
Tetrahedron Asymmetry, **2001**, 12, 1171-1178
- [20] BURNS, B.; KING, N.P.; TYE, H.; STUDLEY, J.R.; GAMBLE, M.; *J. Chem. Soc., Perkin.
Trans 1*, **1998**, 1027-1038
- [21] LORENC, M. : Osobní sdělení
- [22] MOTEKAITIS, R.J.; SUN, Y.; MARTELL, A. E.; WELCH, M.J.; *Can. J. Chem.*, **1999**, 77, 614-
623
- [23] KARBAN, J.; SÝKORA, J.; KROUTIL, J.; CÍSAŘOVÁ, I.; PADĚLKOVÁ, Z.; BUDĚŠÍNSKÝ, M.;
J. Org. Chem., 2010, 75,3443-3446
- [24] HENG, S.; STIEGLITZ, K. A.; ELDO, J.; XIA, J.; CARDIA, J. P.; KANTROWITZ, E. R.;
Biochemistry, **2006**, 45, 10062 - 10071
- [25] KRAKOWIAK, K.E.; BRADSHAW, J.S.; IZATT, R.M.; *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 3364-3368
- [26] KRAKOWIAK, K.E.; BRADSHAW, J.S.; IZATT, R.M.; *J. Heterocyclic Chem.*, **1990**, 27,
1585-1589
- [27] KRAKOWIAK, K.E.; BRADSHAW, J.S.; IZATT, R.M.; *J. Heterocyclic Chem.*, **1990**, 27,
2113-2116

8. Seznam použitých zkratek

AcOH	kyselina octová
CT	počítačová tomografie (computed tomography)
DCM	dichlormethan
DOTA	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
DTPA	kyselina diethylentriaminpentaoctvá
EtOAc	ethyl-acetát
EtOH	ethanol
FDG	2-fluor-2-deoxy-D-glukóza
LAH	tetrahydridohlinitan lithný
LC-MS	kapalinová chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií
MeOH	methanol
MR	magnetická rezonance
MRI	magnetická rezonance
NSF	nefrogenní systémová fibróza
PET	pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography)
RTG	rentgen, rentgenový
SPEC	jednofotonová emisní výpočetní tomografie (single photon emission computed thomography)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
VRO	vakuová rotační odparka
X-ray	rentgenové záření

9. Přílohy

Display Report

Analysis Name ZV_4_000005.D
Sample Name f4
Comment Mag 1 150x4.6 mm 7um
ACN:MeOH:voda 40:50:10
ESI

Acquisition Date 9.6.2011 13:48:30
Method LORENC_1.M

