

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA ANORGANICKEJ CHÉMIE**

Chemie v přírodních vědách



**Nové ligandy pre nukleárnu magnetickú tomografiu –  
pH rezponzívne kontrastné látky**

New ligands for magnetic resonance imaging – pH-responsive  
contrast agents

BAKALÁRSKA PRÁCA



Táto bakalárska práca vznikla v rámci riešenia grantu P207–11–1437.

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracoval samostatne pod vedením školiteľa doc. RNDr. Jana Kotka, Ph.D., a že som všetky použité citácie riadne označil a uviedol ich zdroje.

Som si vedomý toho, že prípadné využitie výsledkov získaných v tejto práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné iba po písomnom súhlase tejto univerzity.

V Prahe, dňa:

---

Podpis



## Abstrakt

Rýchle rozšírenie techniky MRI prinieslo nové požiadavky na MRI kontrastné látky. Sú požadované netoxické, kineticky inertné, termodynamicky stále, biologicky neaktívne komplexy Gd(III) s čo najvyššou relaxivitou (schopnosť magnetickej zlúčeniny zvýšiť relaxačnú rýchlosť okolitých spinov protónov vody), schopné sa z tela vylúčiť v nezmenenej podobe. Táto práca zhŕňa teoretické základy kontrastných látok, syntézu nového ligandu a jeho Gd(III) komplexu koordinujúceho jednu molekulu vody a umožňujúceho nekovalentnú interakciu benzylových skupín so sérovým albumínom sprevádzanou následným zvýšením relaxivity. Namerané boli luminiscencie odpovedajúcich Eu(III) a Tb(III) komplexov a relaxivita Gd(III) komplexu bez a v prítomnosti hovädzieho sérového albumínu *in vitro*. Kontrastná látka bola testovaná *in vivo* na type potkana.

## Kľúčové slová

MR, gadolínium, makrocyclické ligandy, makrocyclické komplexy

## Abstract

Fast spread of MRI technique has brought new demands for MRI contrast agents. They are required to be nontoxic, kinetically inert, thermodynamically stable, biologically inactive complexes Gd(III) with high relaxivity (the ability of magnetic compounds to increase the relaxation rates of the surrounding water proton spins), removable from body in unchanged form. This bachelor thesis resumes basic theory for contrast agents, synthesis of new ligand and its Gd(III) complex coordinating one molecule of water and with ability of the non-covalent interaction of benzylic group with serum albumine resulting in increase in relaxivity. Luminiscence were measured for Eu(III) and Tb(III) complexes and relaxivity of Gd(III) complex in and without the presence of bovine serum albumine *in vitro*. The novel contrast agent was tested *in vivo* on rat model.

## Keywords

MRI, gadolinium, macrocyclic ligands, macrocyclic complexes

# Obsah

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	8
ZOZNAM OBRÁZKOV, TABULIEK A GRAFOV .....	10
1. TEORETICKÝ ÚVOD .....	12
1.1 Spin.....	12
1.2 Nukleárna magnetická rezonancia (NMR) .....	12
1.2.1 Technika NMR .....	12
1.2.2 Využitie NMR.....	15
1.2.3 Magnetické rezonančné zobrazovanie (MRI).....	16
1.3 MRI kontrastná látka .....	17
1.3.1 Centrálny atóm.....	18
1.3.2 Ligand a termodynamická stabilita .....	19
1.3.3 Stabilita $T_1$ kontrastnej látky <i>in vivo</i> .....	23
1.3.4 Diastereoizoméry makrocyclických kontrastných látok .....	24
1.3.5 Základné parametre relaxivity .....	26
1.3.6 Nekovalentná interakcia so sérovým albumínom.....	29
CIEĽ PRÁCE .....	32
2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	34
2.1 Metódy charakterizácie.....	34
2.2 Reakčné schémy .....	36
2.3 Kódové označenie molekúl .....	38
3. SYNTETICKÁ ČASŤ .....	39
3.1 Základné reaktanty.....	40
3.1.1 1,4,7-tris(terc-butoxykarbonylmethyl)cyklen hydrobromid – $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$	40
3.1.2 1,4,7-tris(karboxymethyl)cyklen – DO3A .....	41
3.1.3 ( <i>N,N</i> -Dibenzylamino)methylfosfínová kyselina – DBAMPIN .....	42
3.1.4 Ethylester ( <i>N,N</i> -dibenzylamino)methylfosfínovej kyseliny – DBAMPIN <sup>(OEt)</sup> ...	43
3.2 Trifluóroacetát pyridínia – TFAPy.....	44
3.3 Reakcie Mannichového typu .....	45
3.3.1 Vodná cesta – typ Moedritzer-Irani .....	45
3.3.2 Nevodná cesta – typ Kabachnik-Fields – rozpúšťadlo DMF .....	46
3.3.3 Nevodná cesta – typ Kabachnik-Fields – rozpúšťadlo MeCN.....	47
3.4 Hydrolýza esterov.....	48
3.4.1 Postupná hydrolýza .....	48
3.4.2 Celková hydrolýza.....	51
3.5 Príprava komplexov.....	52
4. CHARAKTERIZÁCIE VÝSLEDNÝCH PRODUKTOV .....	54

4.1	NMR titrácie .....	54
4.2	Luminiscencie .....	54
4.3	Relaxačné časy $T_1$ Gd(III)-DO3AP <sup>DBAM</sup> .....	55
5.	KOMENTÁR.....	56
5.1	Reakcia Mannichového typu – vodná cesta.....	56
5.2	Reakcie Mannichového typu – nevodná cesta.....	56
5.3	Odstraňovanie derivátov DBAMPIN .....	57
5.4	Kvantitatívny priebeh nevodnej reakcie Mannichového typu.....	57
5.5	Katalýza reakcie Mannichového typu .....	58
5.6	Príprava mezylátu.....	59
5.7	Hydrolyza esterov $t\text{Bu}_3\text{DO3A}^{(\text{OEt})\text{DBAM}}$ .....	59
5.8	Purifikácia a kryštalizácia DO3AP <sup>DBAM</sup> .....	60
5.9	Komplexácie DO3AP <sup>DBAM</sup> .....	61
5.10	Meranie luminiscencií .....	61
6.	VÝSLEDKY.....	62
6.1	Optimalizácia nevodného typu Mannichovej reakcie.....	62
6.2	NMR titrácie .....	64
6.2.1	DO3AP <sup>DBAM</sup> .....	64
6.2.2	Komplexy.....	67
6.3	Luminisecné merania.....	69
6.4	Relaxivita Gd(III)-DO3AP <sup>DBAM</sup> .....	70
6.4.1	Koncentračná závislosť relaxivity [GdL] s prítomným albumínom .....	70
6.4.2	pH závislosť relaxivity [GdL] bez prítomného albumínu .....	71
6.4.3	pH závislosť relaxivity [GdL] s prítomným albumínom .....	72
7.	ZÁVER .....	73
	POĎAKOVANIE .....	76
	POUŽITÁ LITERATÚRA .....	77
8.	PRÍLOHA .....	80
8.1	<sup>1</sup> H-NMR spektrá Ln(III) komplexov DO3AP <sup>DBAM</sup> .....	80
8.2	NMR titrácie .....	82
8.2.1	DO3AP <sup>DBAM</sup> .....	82
8.2.2	<sup>31</sup> P-NMR titrácie komplexov Ln(III)-DO3AP <sup>DBAM</sup> .....	85
8.3	Meranie časov $T_1$ Gd(III)-DO3AP <sup>DBAM</sup> .....	86
8.4	Rôzne protonizované molekuly DO3AP <sup>DBAM</sup> .....	89
8.5	RTG štruktúra DO3A <sup>PDBAM</sup> .....	90
8.6	Luminiscenčné merania .....	91
8.7	Rovnica pre výpočet koncentrácie z BMS .....	91
8.8	Snímky z MRI experimentu .....	91

## Zoznam použitých skratiek

<sup>13</sup> C-NMR	uhlíková nukleárna magnetická rezonancia
<sup>19</sup> F-NMR	fluórová nukleárna magnetická rezonancia
<sup>1</sup> H-NMR	vodíková nukleárna magnetická rezonancia
2D	dvojrozmerný
<sup>31</sup> P-NMR	fosforová nukleárna magnetická rezonancia
3D	trojrozmerný
AAZTA	6-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepintetraoctová kyselina
AV ČR	Akadémia vied Českej republiky
abs.	absolútny
BMS	bulk magnetic susceptibility
BSA	hovädzí sérový albumín
CT	computed tomography (počítačová tomografia)
cyklen	1,4,7,10-tetraazacyklododekán
DBAMPIN	( <i>N,N</i> -dibenzylamino)methylfosfínová kyselina
DBAMPIN <sup>HM</sup>	( <i>N,N</i> -dibenzylaminomethyl)(hydroxymethyl)fosfínová kyselina
DBAMPIN <sup>OEt</sup>	ethylester ( <i>N,N</i> -dibenzylaminomethyl)(hydroxymethyl)fosfínovej kyseliny
DBAMPIN <sup>(OEt)HM</sup>	ethylester ( <i>N,N</i> -dibenzylaminomethyl)(hydroxymethyl)fosfínovej kyseliny
DBAMPON	( <i>N,N</i> -dibenzylamino)methylfosfónová kyselina
DBAMPON <sup>OEt</sup>	ethylester ( <i>N,N</i> -dibenzylamino)methylfosfónovej kyseliny
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DCU	dicyklohexylmočovina
denat.	denaturovaný
DIPEA	diisopropyl(ethyl)amín
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamid
DMAP	4-( <i>N,N</i> -dimethylamino)pyridín
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMP	<i>N,N</i> -dimethylpiperazín
DO3A	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7-trioctová kyselina
DO3AP <sup>DBAM</sup>	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7-trioctová-10-methylén [( <i>N,N</i> -dibenzylaminomethyl)fosfínová] kyselina
DO3AP <sup>(OEt)DBAM</sup>	Ethylester 1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7-trioctovej-10-methylén [( <i>N,N</i> -dibenzylaminomethyl)fosfínovej] kyseliny
DO3AP <sup>R</sup>	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7-trioctová-10-methylén(alkyl/aryl) fosfínová kyselina
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DOTP	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetrakis(methylfosfónová) kyselina



DTPA	diethylétriámín- <i>N,N,N,N',N'</i> -pentaoctová kyselina
DTPA-BMA	bis(methylamid) kyseliny diethylétriámín- <i>N,N,N,N',N'</i> -pentaoctovej
DTPA-BMEA	bis(methoxyethylamid) kyseliny diethylétriámín- <i>N,N,N,N',N'</i> -penta- octovej
DTTA	diethylétriámín- <i>N,N,N,N'</i> -tetraoctová kyselina
EDTA	ethyléndiámín- <i>N,N,N,N'</i> -tetraoctová kyselina
EOB-DTPA	(4-ethoxybenzyl)diethylétriámín-pentaoctová kyselina
ekv.	ekvivalent
FID	free induction decay
fMRI	functional magnetic resonance imaging
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HOPO	hydroxypyridinonát
HSA	ľudský sérový albumín
IKEM	Inštitút klinickej a experimentálnej medicíny v Prahe
iPrOH	propán-2-ol, isopropanol
konc.	koncentrovaný
kys.	kyselina
LD <sub>50</sub>	letálna dávka pre 50 % populácie
MRI	magnetic resonance imaging
MS	mass spectrometry (hmotová spektrometria)
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
NSF	nefrogenická systematická fibróza
OECD	organisation for economics co-operaion and development
PARACEST	paramagnetic chemical exchange saturation transfer
PET	positron emission tomography
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
ref.	referencia
RF	rádiofrekvenčný
RT	room temperature (laboratórna teplota)
RTG	röntgen
SA	square antiprism (štvorcová antiprizma)
SBM	Solomon-Bloembergen-Morgan
SPECT	single-photon emission computed tomography
STD NMR	saturation transfer difference nuclear magnetic resonance
<i>t</i> Bu <sub>3</sub> DO3A	tris( <i>tert</i> -butoxykarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekán
<i>t</i> Bu <sub>3</sub> DO3AP <sup>(OEt)DBAM</sup>	Ethylester tris( <i>tert</i> -butoxykarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklo- dodekán-10-methylén[ <i>(N,N</i> -dibenzylaminomethyl)fosfínovej] kyseliny
teor.	teoretický
TFA	trifluórooctová kyselina
TFAPy	trifluórooctan pyridínia

THF	tetrahydrofurán
THIPAC	zmes tetrahydrofuránu, propán-2-olu a acetónu
ThFFF NMR	thermal field flow fractionation nuclear magnetic resonance
TLC	thin layer chromatography (tenkovrstvová chromatografia)
TMS	tetramethylsilán
TOCSY	total correlation spectroscopy
TOL	toluén
TSA	twisted square antiprism (skrížená štvorcová antiprizma)
TsOH	tozylová kyselina ( <i>p</i> -toluénsulfónová kyselina)

## Zoznam obrázkov, tabuliek a grafov

### Obrázky:

- 1 – Rozštiepenie energických hladín atómových jadier s nenulovým jadrovým spinom v homogénnom magnetickom poli (s. 13)
- 2 – Relaxácia vektoru  $M$  po  $90^\circ$  RF pulze (s. 14)
- 3 – MRI hlavy pacienta po mozgovej príhode (narušenie hemato-encefalickej bariéry), vľavo pred podaním kontrastnej látky a vpravo s prítomnosťou kontrastnej látky v krvi (s. 17)
- 4 – Ligandy gadolínových komplexov používaných v klinickej praxi (okrem EDTA) (s. 21)
- 5 – Motívy MRI  $T_1$  kontrastných látok vo výskume (s. 22)
- 6 – Diastereoizoméry komplexu  $[\text{Gd}(\text{dota})]^-$  (s. 25)
- 7 – Fosforové analógy ligandu DOTA (s. 26)
- 8 – Relaxivita kontrastnej látky zo SBM teórie podľa sily magnetického poľa (s. 28)
- 9 – MRI snímky kontrastnej látky Vasovist<sup>®</sup> *in vivo* (s. 92)
- 10 – MRI snímky kontrastnej látky  $\text{Gd}(\text{III})\text{-DO3AP}^{\text{DBAM}}$  *in vivo* (s. 93)

### Tabuľky:

- 1 – Spin jadier niektorých nuklidov (s. 12)
- 2 – Laureáti Nobelových cien za NMR a príbuzné techniky (s. 15)
- 3 – Počet MRI vyšetrených pacientov na 1000 obyvateľov (s. 16)
- 4 – Paramagnetické vlastnosti kovov používaných v MRI (s. 18)
- 5 – Parametre MRI komplexov s  $\text{Gd}(\text{III})$  (s. 20)
- 6 – Termodynamická a kinetická stabilita komplexov (s. 23)
- 7 – Rozpad komplexov v  $\text{pH} = 1$  a „clearance“ (s. 24)
- 8 – Kontrastné látky ( $[\text{GdL}]$ ) s nekovalentnou interakciou s HSA (s. 30)
- 9 – Štandardizácie NMR spektier (s. 34)
- 10 – Vytvorenie  $\text{Ln}(\text{III})$  komplexov  $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$  (s. 52)
- 11 – Prvá séria prípravy vzoriek (meranie  $T_1$ ) (s. 55)
- 12 – Pomer reaktantov 1:3:5 – teplotná optimalizácia (s. 62)
- 13 – Pomer reaktantov 1:1:X – pomerová optimalizácia (s. 62)
- 14 – Katalýza – 1. sada (pomer reaktantov 1:3:5) (s. 62)

- 15 – Katalýza – 2. sada (pomer reaktantov 1:1:15) (s. 63)
- 16 – Katalýza – 3. sada (pomer reaktantov 1:1:15) (s. 63)
- 17 – Hodnoty  $pK_a$  DO3AP<sup>DBAM</sup> (s. 64)
- 18 – Zastúpenie izomérov v komplexoch [EuL] a [YbL] (s. 68)
- 19 – Luminiscenčné merania komplexov Eu(III) a Tb(III) s DO3AP<sup>DBAM</sup> (s. 69)
- 20 – Priemerná relaxivita Gd(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> – 37 °C; 0,5 T (s. 74)
- 21 – Priemerná relaxivita Gd(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> – 37 °C; 1,0 T (s. 74)
- 22 – <sup>1</sup>H-NMR titrácia DO3AP<sup>DBAM</sup> – prvá (s. 82)
- 23 – <sup>1</sup>H-NMR titrácia DO3AP<sup>DBAM</sup> – druhá (s. 83)
- 24 – <sup>31</sup>P-NMR titrácia DO3AP<sup>DBAM</sup> – prvá (s. 84)
- 25 – <sup>31</sup>P-NMR titrácia DO3AP<sup>DBAM</sup> – druhá (s. 84)
- 26 – <sup>31</sup>P-NMR titrácia Eu(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> (s. 85)
- 27 – <sup>31</sup>P-NMR titrácia Yb(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> (s. 85)
- 28 – Koncentračná závislosť  $r_1$  – 37 °C; 0,5 T (s. 86)
- 29 – Koncentračná závislosť  $r_1$  – 37 °C; 1,0 T (s. 86)
- 30 – pH závislosť  $r_1$  bez BSA – 37 °C; 0,5 T (s. 87)
- 31 – pH závislosť  $r_1$  bez BSA – 37 °C; 1,0 T (s. 87)
- 32 – pH závislosť  $r_1$  s BSA – 37 °C; 0,5 T (s. 88)
- 33 – pH závislosť  $r_1$  s BSA – 37 °C; 1,0 T (s. 88)
- 34 – RTG údaje pre DO3AP<sup>DBAM</sup> (s. 90)

### Grafy:

- 1 – <sup>1</sup>H-NMR titrácia DO3AP<sup>DBAM</sup> (s. 65)
- 2 – <sup>31</sup>P-NMR titrácia DO3AP<sup>DBAM</sup> (s. 66)
- 3 – <sup>31</sup>P-NMR titrácia Eu(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> (s. 67)
- 4 – <sup>31</sup>P-NMR titrácia Yb(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> (s. 68)
- 5 – Koncentračná závislosť  $r_1$  (s. 70)
- 6 – pH závislosť  $r_1$  bez BSA (s. 71)
- 7 – pH závislosť  $r_1$  s BSA (s. 72)

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Spin

Už relativistická kvantová teória predpovedala spin častice a pokus nemeckých fyzikov Otta Sterna a Walthera Sterna roku 1920 ho potvrdil a dokázal diskretnosť hodnôt, ktoré nadobúda (1). Šiesty postulát kvantovej mechaniky definuje spin ako vlastnosť každej častice. Mikročastice atómu (elektrón, protón, neutrón) viazaných v molekulách sú fermióny – majú polčíselný spin a platí pre ne Fermi-Diracova štatistika a Pauliho princíp neurčitosti.

Vlastnosti spinu a z neho vyplývajúci a pozorovateľný spinový moment hybnosti nám v makrosvete približuje rotujúci gyroskop. Veľkosť spinového momentu dokáže prekonať gravitačnú silu a teleso sa môže dostať do zdanlivo nerovnovážneho stavu, v ktorom zotrúva. Pohľad na elektrón či protón ako rotujúcu guľôčku je nesprávny, ale vlastnosti „gyroskopu“ sú aplikované a nepriamo merateľné. Rovnako ako rotácia v smere alebo protismeru hodinových ručičiek, magnetické spinové kvantové číslo ( $m_s$ ) fermiónov je kladné alebo záporné a definuje smer spinového momentu hybnosti častice.

Poznatok spinu mikročastice je kľúčový pre modernú chémiu a spektroskopiu. Chemická väzba je dôsledok interakcie dvoch elektrónov z rôznych atómov s opačným spinovým kvantovým číslom. Spin nukleónov (protónov a neutrónov) má za následok spinový moment jadra. Interakciu jadrového spinu s magnetickým a rádiovýfrekvenčným poľom využíva nukleárna magnetická rezonancia.

## 1.2 Nukleárna magnetická rezonancia (NMR)

### 1.2.1 Technika NMR

Atómové jadro s párnym počtom protónov a párnym počtom neutrónov má celkový spin rovný nule a nie je merateľné technikou NMR. Prítomnosť jednej nespárenej mikročastice v jadre zvýši celkový spin na nenulovú hodnotu. *Tabuľka 1* znázorňuje príklady niektorých izotopov prvkov:

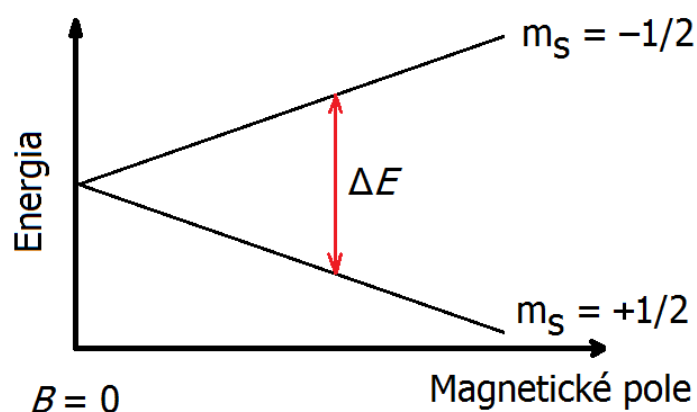
Tabuľka 1:

Spin jadier niektorých nuklidov	
Izotop	Spin
$^{12}\text{C}, ^{16}\text{O}$	0
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^{19}\text{F}, ^{31}\text{P}$	1/2
$^2\text{H}, ^{14}\text{N}$	1
$^{11}\text{B}$	3/2

Nuklidy  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  a  $^{31}\text{P}$  predstavujú najčastejšie merané atómy. Vodíkové a uhlíkové NMR sú súčasťou každej charakterizácie organických látok, nepriamo určujú elektrónovú hustotu a tým chemické vlastnosti a pomáhajú pri riešení trojrozmerných štruktúr biomolekúl (tu sa významne uplatňujú náročnejšie viacrozmerné NMR experimenty ako HMBC, NOESY, TOCSY a pod.).

Po vložení atómu s nenulovým jadrovým spinom do homogénneho magnetického poľa nastáva rozštiepenie hladín v závislosti od sily poľa (*Obr. 1*). Vektor magnetickej indukcie magnetu  $B$  zorientuje magnetické momenty  $\mu$ , ktoré sú tvorené pohybmi vektorov spinu. Výsledný vektor magnetizácie  $M$ , získaný vektorovým súčtom magnetických momentov, je paralelný s vektorom magnetickej indukcie  $B$ . Samotné magnetické momenty  $\mu$  vykonávajú Larmorovu precesiu po kruhovej trajektórii kolmej k vektoru magnetickej indukcie  $B$ .

*Obr. 1* – Rozštiepenie energických hladín atómových jadier s nenulovým jadrovým spinom v homogénnom magnetickom poli



Z *Obr. 1* je vidieť závislosť veľkosti štiepenia na sile použitého magnetu. Priamu úmeru energetického rozštepú na sile magnetického poľa vyjadruje rovnica [1]. Prechod medzi energetickými hladinami je spôsobený elektromagnetickým žiarením, ktorého energiu vyjadruje Planckov zákon (pravá strana rovnice [1]).

$$\Delta E = -\gamma_N \frac{h}{2\pi} B = -g_N \frac{q_N}{2m_N} \frac{h}{2\pi} B = -g_N \beta_N B = h\nu \quad [1]$$

$\Delta E$  je rozdiel energií medzi hladinami,  $\gamma_N$  je gyromagnetický pomer jadra,  $h$  je Planckova konštanta,  $B$  je veľkosť magnetickej indukcie,  $g_N$  je nukleárny g-faktor,  $q_N$  je náboj jadra,  $m_N$  je hmotnosť jadra,  $\beta_N$  je nukleárny magnetón, a  $\nu$  je frekvencia elektromagnetického pulzu.

Používané NMR zariadenia obsahujú supravodivé magnety, chladené tekutým héliom, o veľkosti magnetickej indukcie rádovo v jednotkách až desiatkach tesla (maximálne možné dosiahnuteľné magnetické pole v zatiaľ používaných  $\text{Nb}_3\text{Sn}$

magnetoch je 45 T (2), čo predstavuje použitie rádiofrekvenčného zdroja o cca 2000 MHz pre  $^1\text{H-NMR}$ ). Pre porovnanie, sila magnetického poľa zeme je  $45 \pm 6 \mu\text{T}$  v horizontálnom smere a  $108 \pm 6 \mu\text{T}$  vo vertikálnom smere (3).

Kvantitatívne zastúpenie populácie rozštiepených hladín z *Obr. 1* popisuje Boltzmannove rozdelenie (rovnica [2]). Energický rozštep (rovnica [1]) zapríčiní nerovnosť populácií energických hladín. Tento jav nastáva vždy pri vystavení jadra atómu s nenulovým spinom magnetickému poľu.

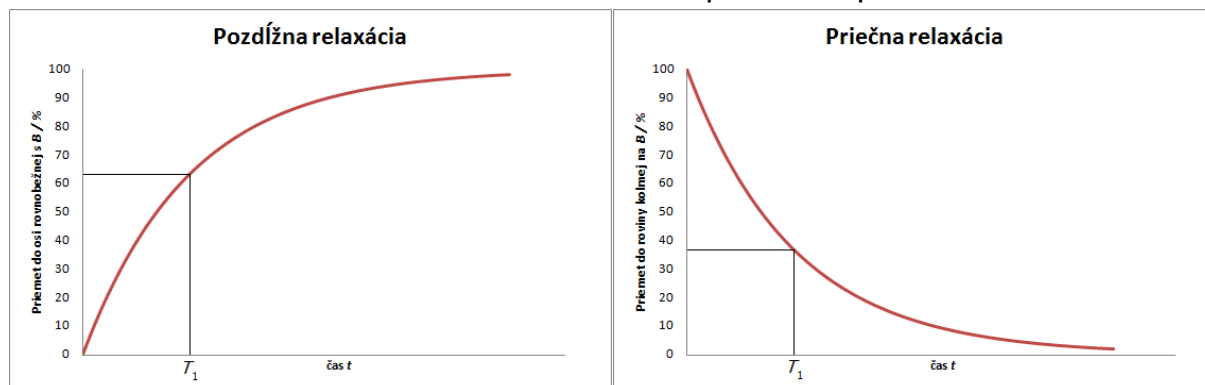
$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad [2]$$

Pomer hodnôt  $N_{2,1}$  je pomerom populácií vyššej ( $N_2$ ) a nižšej ( $N_1$ ) energetickej hladiny,  $\Delta E$  je energia rozštiepenia hladín spôsobená magnetickým poľom,  $k_B$  je Boltzmannova konštanta a  $T$  je termodynamická teplota.

Pri laboratórnej teplote je pomer z rovnice [2] blízky jednej zdola – malý nadbytok jadier na nižšej energetickej hladine nie je kompenzovaný a je detekovateľný. Pohyb vektoru magnetizácie  $M$ , ktorý tvoria magnetické momenty jadier, sa dá detegovať a analyzovať informácia v ňom obsiahnutá. Manipulácia s orientáciou vektoru magnetizácie je vykonávaná rádiofrekvenčným (RF) poľom, ktoré jadrám dodáva energiu cez RF pulzy. Energia potrebná pre sklopenie vektoru  $M$  je rovná rozdielu energií hladín. Pri aplikovaní RF pulzu o vhodnej frekvencii (splnenie rezonančnej podmienky) nastáva vychýlenie vektoru magnetizácie z rovnovážnej polohy, tzv. „excitácia“. Po vypnutí zdroja RF vln sa vektor  $M$  postupne relaxuje po špirálovitej dráhe do počiatočného stavu rovnobežného s vektorom  $B$ . Záznam pohybu vektoru  $M$  premietnutého do osi kolmej na vektor  $B$  sa označuje ako FID (free induction decay). Získaná informácia vo forme FID-u sa „dekóduje“ Fourierovou transformáciou pre získanie spektra.

Čas, za ktorý sa vektor  $M$  vráti zo 63 % do rovnovážnej polohy z pohľadu na osu rovnobežnú s vektorom  $B$ , sa označuje ako  $T_1$  (*Obr. 2*) – pozdĺžny relaxačný čas. Čas  $T_2$  označuje priečnu relaxáciu – čas, za ktorý sa veľkosť signálu vektoru magnetizácie zníži na 37 % z pohľadu na rovinu kolmú na vektor  $B$  (*Obr. 2*).

*Obr. 2* – Relaxácia vektoru  $M$  po  $90^\circ$  RF pulze



### 1.2.2 Využitie NMR

Nukleárna magnetická rezonancia je v súčasnosti jedna z najdôležitejších metód chémie (charakterizácie organických látok, určenie čistoty), medicíny (magnetická rezonancia – MRI, z angl. „magnetic resonance imaging“), fyziky (štúdium materiálov), potravinárstva (kontrola pôvodu a kvality) a iných odvetví. Najväčšou výhodou NMR spektroskopie je použitie nízkoenergetického (oblasť rádiových frekvencií), neionizujúceho žiarenia, potreba malého množstva látky na zmeranie spektra a možnosti merania dynamických zmien. Ďalším plusom je nezničenie a nezmenenie meranej látky, takže je ju možné použiť v ďalších postupoch charakterizácie.

Za posledné storočie bolo udelených šesť Nobelových cien za výskum v oblasti NMR (*Tabuľka 2*) (4). Súčasný trend rozvoja NMR smeruje od princípov k aplikáciám. Neustále rozširovanie nových možností použitia je dokumentované aj na príkladoch ako: MRI tekutiny vnútorného ucha (5), ThFFF NMR kopolymérov (6), STD NMR pôsobenia liečiv na mikroorganizmy (7) alebo štúdium fyzikálno-chemických charakteristík ovocia (MRI banánov, (8)).

*Tabuľka 2:*

<b>Laureráti Nobelových cien za NMR a za príbuzné techniky</b>			
<b>Meno</b>	<b>Rok</b>	<b>Oblasť</b>	<b>Práca</b>
Otto Stern	1943	fyzika	magnetický moment protónu
Isidor I. Rabi	1944	fyzika	rezonancia protónu
Felix Bloch, Edward M. Purcell	1952	fyzika	meranie precesie magnetizácie
Richard R. Ernst	1991	chémia	NMR s vysokým rozlíšením
Kurt Wurtrich	2002	chémia	3D NMR biomolekúl
Paul C. Lauterbur, Peter Mansfield	2003	medicína	MRI

Najrozšírenejším typom NMR je  $^1\text{H}$ -NMR. Vodíkové atómy viazané v organických molekulách zväčša nie sú chemicky ekvivalentné. Vďaka rozdielnej elektronegativite naviazaných substituentov, presunom elektrónovej hustoty po  $\pi$ -konjugovanom systéme, blízkej prítomnosti silno polarizovateľného / polarizujúceho atómu a iných efektov v molekule sú elektróny rôzne translokované vzhľadom k jadrám viazaných vodíkov. Tým sa elektróny, mikrozdroj magnetického poľa, premiestňujú a energia potrebná na manipuláciu vektoru magnetizácie  $M$  skupín ekvivalentných vodíkov je zmenená. Posuny k nižším alebo vyšším hodnotám frekvencie sú minimálne, rádovo v Hz, ale merateľné. Posuny signálov rôznych protónov vzhľadom k štandardnej látke sú využívané u charakterizácii najmä organických molekúl.

Princípy techniky  $^1\text{H}$ -NMR využíva medicína ako MRI tela pacienta (človek alebo zviera), kde zobrazuje molekuly vody. Relaxačný čas  $T_1$  vody sa pohybuje na úrovni

2–3 sekúnd pri normálnych podmienkach (9). Interakcia molekúl s elektrolytmi, dipólovými momentmi, rozpustenými látkami v tele vodíkovou väzbou alebo koordinačne s kontrastnou látkou, či už i premenlivosť telesnej teploty a pH mení relaxačný čas vody. Skrátenie až na jednotky milisekúnd je možné pri použití vhodnej kontrastnej látky a táto zmena môže byť zachytená na diagnostickom snímku.

### 1.2.3 Magnetické rezonančné zobrazovanie (MRI)

Táto neinvazívna diagnostická metóda za použitia neionizujúceho elektromagnetického žiarenia, schopná vytvoriť snímok vnútra ľudského tela, je vo svete veľmi rozšírená a používaná. V roku 2010 vyšetrených priemerne 46,3 pacientov na 1000 obyvateľov krajín OECD (97,7 na 1000 pre USA) a trend má stúpajúcu tendenciu (*Tabuľka 3*) (10), celkovo dodnes podstúpilo vyšetrenie asi 400 miliónov pacientov (11). Od zavedenia MRI v roku 1967 v Nottinghamskej univerzitnej nemocnici vo Veľkej Británii (12) boli MR skenery rozšírené do mnohých krajín a dnes funguje v nemocniciach celkovo cca 25 tisíc skenerov, takmer polovica z nich v USA (13).

*Tabuľka 3:*

<b>Počet MRI vyšetrených pacientov na 1000 obyvateľov</b>							
<b>Rok</b>	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
<b>Česká republika</b>	16,5	18,8	21,8	24,5	27,4	32,2	33,5
<b>Slovenská republika</b>	7,9	9,8	13,2	20,7	24,1	29,8	33,2
<b>USA</b>	84,4	85,6	89,1	91,2	93,4	95,9	97,7

Najzastúpenejšou látkou v ľudskom organizme je voda. Tvorí až 60 % váhy jedinca a 83 % krvi priemerného zdravého dospelého jedinca (14). Molekula vody obsahuje dva atómy vodíku a je NMR aktívna. Pri vystavení ľudského tela silnému magnetickému poľu a pulzu nízkoenergetického žiarenia o vhodnej frekvencii dôjde k vychýleniu vektoru magnetizácie protónov vodíku vody. Na rozdiel od NMR, MRI využíva širokofrekvenčný pulz elektromagnetického žiarenia, ktorý excituje molekuly vody, a gradient magnetického poľa. Po spracovaní zaznamenaných FID-ov pomocou Fourierovej transformácie sa analyzuje informácia o priestorovom rozložení signálov protónov molekúl vody. Získané NMR spektrum vody v tele pacienta sa automaticky prevádza na MRI sken. Ten zobrazí intenzitu signálu vody príslušnou farbou na anatomickej projekcii tela (2D alebo 3D).

Záznam, resp. vyšetrenie, získané popísaným spôsobom, síce už má vysoké rozlíšenie, ale pre zreteľnú viditeľnosť malých abnormalít (napr. lézií v tele) je treba zvýšiť kontrast záznamu, teda zvýrazniť určité miesta na vytvorenom snímku. Toho sa dosiahne orálnym alebo intravenóznym podaním kontrastnej látky pacientovi pred vyšetrením. Relaxačné parametre protónov vody, ktorá je prítomná pri molekule kontrastnej látky, počas merania sa výrazne menia.



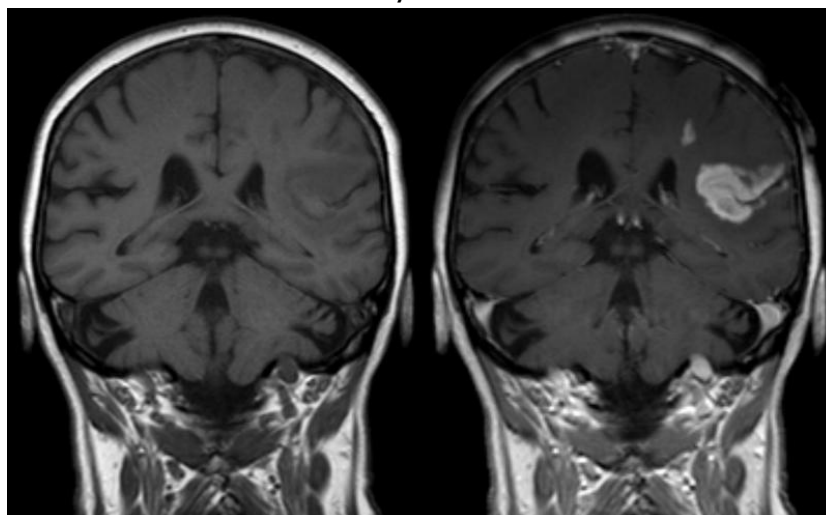
### 1.3 MRI kontrastná látka

Kontrastná látka dodáva snímku kontrast – zvýrazňuje určité časti a iné ponecháva „tmavé“. Podľa druhu diagnostického vyšetrenia môžu byť kontrastné látky rozdelené do skupín ako látky pre SPECT, PET, MRI, CT a i. Ďalšie odstavce sa budú zaoberať MRI kontrastnými látkami.

Hlavnou požiadavkou medicíny pre MRI vyšetrenie je jednorazová intravenózna (pre rýchlu distribúciu) alebo orálna expozícia pacienta takej látke, aby zvýšila kontrast určitej oblasti tela pri snímaní, bola netoxická a vylučovala sa z tela v nezmenenej podobe v relatívne krátkom čase. Až 40 % MRI vyšetrení (15) je zaznamenaných s kontrastnou látkou a pri intravenóznom podaní cca 0,1 mmol aktívnej látky na kg pacienta sú spomenuté vlastnosti kontrastnej látky nevyhnutné.

Rozlišovacia schopnosť MRI bez kontrastnej látky je relatívne nízka. Pohybuje sa rádovo na úrovni  $\text{mm}^3$ . Avšak podobnosť signálov vody v patologickom aj zdravom tkanive môže byť príčinou ľahkého prehliadnutia (*Obr. 3*, (16)). Malé tumory, jemné cievy alebo potreby neurochirurgie vyžadujú podrobnejšie a zreteľnejšie zobrazenie, teda oveľa vyšší kontrast. Aplikáciou kontrastnej látky do krvi tela pred diagnostickým vyšetrením sa snímok niektorých oblastí tela lepšie prekreslí.

*Obr. 3* – MRI hlavy pacienta po mozgovej príhode (narušenie hemato-encefalickej bariéry), vľavo pred podaním kontrastnej látky a vpravo s prítomnosťou kontrastnej látky v krvi



Cieleným návrhom molekuly kontrastnej látky môže byť ovplyvnená jej biodistribúcia v tele. V klinickej praxi sa bežne používajú angiografické, extracelulárne alebo orgánovo špecifické kontrastné látky. Modifikáciou postranných skupín molekuly, vnesením špecifických funkčných skupín alebo naviazaním na nanočastice určitej veľkosti sa docieli zvýšená absorpcia vo zvolenom orgáne. Ako príklad možno uviesť 4-ethoxybenzylóvu skupinu liečiva Primovist® alebo kontrastné látky naviazané na lipozómy s priemerom 100 nm pre MRI pečene (17).

Špeciálne použitie kontrastných látok využíva funkčné MRI (fMRI). Základnou vlastnosťou používaných gadolinitých komplexov je nepriechodnosť cez hematoencefalickú bariéru. Pri zapojení určitej časti mozgu sa cievy v nej rozširujú (viac sa prekrví) a časovo závislým snímaním MRI skenov sa mapuje encefalická aktivita. Pri postihnutiach neurologického typu niektoré oblasti nepracujú správne (nadmerne alebo vôbec). Toho sa využíva pri určovaní diagnózy a pri následnom možnom neurochirurgickom zákroku alebo aj komerčne ako detektor lži (18).

Kontrastnou látkou býva komplex ( $T_1$  kontrastné látky), koordinačná zlúčenina paramagnetického centrálného atómu s polydentátnym chelátom polyaminokarboxylátového typu, alebo nanočastice na báze oxidov železa ( $T_2$  kontrastné látky). Klinicky sú z 95 % používané komplexy, pretože poskytujú pozitívny kontrast (t. j. zvýšenie signálu) a lepšie sa vyhodnocuje oproti negatívnemu kontrastu, ktorý je spôsobený použitím  $T_2$  kontrastných látok.

### 1.3.1 Centrálny atóm

Princípom kontrastnej látky na báze komplexu paramagnetika je znižovať relaxačný čas vody, najmä  $T_1$ , a tým navýšiť intenzitu signálov vody na diagnostickom snímku. Najlepšie túto vlastnosť vedia ovplyvniť častice s maximálnym spinom, t. j. s najväčším počtom nespárených elektrónov, ktoré interagujú s jadrovým spinom protónov vody. Tejto definícii vyhovujú a sú používané kovy v rôznych oxidačných číslach – prechodné kovy Mn(II) a Fe(III) s 5 nepárovými elektrónmi a lanthanoid Gd(III) so 7 nepárovými elektrónmi.

Drvivá väčšina  $T_1$  kontrastných látok obsahuje trojmocné gadolínium. Základný elektrónový stav Gd(III) prislúcha  $4f^7$  (najvyšší možný počet nespárených elektrónov v periodickej tabuľke) a magnetický moment  $\mu_B$  častice dosahuje 7,94 Bohrových magnetónov. Ďalšou výhodou je symetrický stav  $^8S_{7/2}$ , ktorý má pomalú elektrónovú relaxáciu (rádovo  $10^{-8}$  s, (19), čo tvorí dominantný príspevok relaxácie kontrastnej látky – vid' oddiel 1.3.5, rovnica [7]). Tieto výhodné paramagnetické vlastnosti vytvoria silné fluktuujúce magnetické pole a tým zvyšujú šancu na relaxáciu (t. j. urýchľujú) protónov vody. Pre porovnanie vlastností sú niektoré klinicky používané kovy kontrastných látok uvedené v *Tabuľke 4* (20).

Tabuľka 4:

<b>Paramagnetické vlastnosti kovov používaných v MRI</b>			
<b>Kov</b>	<b>Počet nepárových <math>e^-</math></b>	<b><math>\mu_B</math> / Bohrove magnetóny</b>	<b>Základný stav (term)</b>
Mn(II)	5	5,6–6,1 (vysokospin)	$^6S_{5/2}$
Fe(III)	5	5,6–6,1 (vysokospin)	$^6S_{5/2}$
Gd(III)	7	7,9–8,0	$^8S_{7/2}$

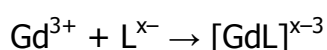
Tieto takmer ideálne parametre gadolinových kationov pre kontrastnú látku narúša ich značná toxicita. Svojím iónovým polomerom (108 pm) sa podobajú na dvojmocný vápnik (114 pm) alebo dvojmocný zinok (110 pm) (21). Preto sa voľný Gd(III) ukladá do kostí ako ťažký kov, spôsobuje kŕče, ataxiu, hypokalcémiu a zinkúriu. LD<sub>50</sub> voľného Gd(III) je 0,35 mmol/kg (myš, intravenózne, (22)), preto je použitie voľného iónu medicínsky neprípustné (na jedno vyšetrenie pre priemerného dospelého človeka sa spotrebuje cca 0,12 mmol/kg nešpecifickej kontrastnej látky, t. j. 1,2 g Gd(III), (23)). Po vytvorení komplexu Gd(III) s vhodným ligandom toxicita výrazne klesne – pre komplex [Gd(dota)]<sup>-</sup> je LD<sub>50</sub> 10,6 mmol/kg (myš, intravenózne, (22)), čo predstavuje približne stonásobok používanej dávky pri MRI vyšetrení.

Koordinačné číslo lanthanoidov je 8–9. Vďaka lanthanoidovej kontrakcii sa polomer atómov/iónov v perióde znižuje a tým i koordinačné číslo klesne. Gd(III) sa nachádza na rozhraní – vytvára komplex s ôsmimi alebo deviatimi donorovými atómami. Aby bol vytvorený komplex termodynamicky stabilný a tým málo toxický, ligand by mal byť oktadentátny (využitie entropického efektu chelátov). Trojmocné lanthanoidy sú pomerne tvrdé Lewisove kyseliny (pri malom iónovom polomere a náboji 3+ majú vysokú hustotu náboja), preto preferujú kyslíkové donorové atómy, ale majú značnú afinitu i k dusíkovým.

### 1.3.2 Ligand a termodynamická stabilita

Hlavnými parametrami pre MRI ligand je vytvorenie termodynamicky stáleho a kineticky inertného komplexu s Gd(III) s možnosťou koordinácie molekuly vody. Vzniknutý komplex nesmie byť toxický (jeho LD<sub>50</sub> musí byť rádovo vyššie ako pri množstve potrebnom pri MRI vyšetrení), molekula musí odolávať<sup>1</sup> enzymatickej aktivite *in vivo*, nízkemu pH (4,5 v glomerulách) a vylúčiť sa z tela v relatívne krátkom čase. Tieto podmienky spĺňajú polyaminokarboxylátové cheláty – ligandy odvodené od DTPA a DOTA. Parametre kontrastných látok prvých syntetizovaných (prielomových) alebo dodnes používaných v klinickej praxi sú v *Tabuľke 5* (21, 24–31).

Prvým skúmaným ligandom pre Gd(III) bolo chelatačné činidlo EDTA. Komplex koordinuje 2–3 molekuly vody, ale jeho relaxivita dosahuje pomerne nízkych hodnôt pre bidentátnu koordináciu citrátu, fosfátu alebo karbonátu namiesto molekúl vody (*in vitro* experimenty). Termodynamická stálosť komplexu, vyjadrená rovnicou [3], je relatívne nízka, preto nikdy nedošlo ku klinickému použitiu komplexu ako kontrastná látka.



$$K = \frac{[[\text{GdL}]^{x-3}]}{[\text{Gd}^{3+}] [\text{L}^{x-}]} \quad [3]$$

<sup>1</sup> Existujú kontrastné látky, ktoré sa vplyvom enzymatickej aktivity *in vivo* aktivujú (54) alebo časom degradujú (45) pre urýchlenie vylučovania.

### Parametre MRI komplexov s Gd(III)

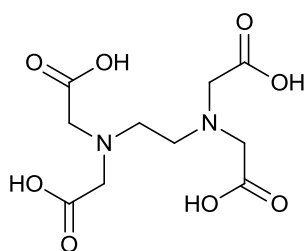
Ligand L	logK([GdL])	logK'([GdL])	Dávka / mm <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>	Náboj	r <sub>1</sub> <sup>a</sup> / s <sup>-1</sup> mm <sup>-1</sup>	Medikament
EDTA	17,3	–	–	1–	5,1–5,4 <sup>b</sup>	–
DTPA	22,1	17,7	0,1	2–	3,3	Magnevist <sup>®</sup>
DTPA-BMA	16,9	14,9	0,1	0	3,3	Omniscan <sup>®</sup>
DTPA-BMEA	16,6	15,0	0,1	0	3,6	OptiMARK <sup>®</sup>
DOTA	25,6	19,3	0,1	1–	3,0	Dotarem <sup>®</sup>
HP-DO3A	23,8	17,1	0,1	0	2,9	ProHance <sup>®</sup>
BOPTA	22,6	18,4	0,1 <sup>c</sup>	2–	3,8	MultiHance <sup>®</sup>
EOB-DTPA	23,46	18,7	0,025	2–	4,6	Primovist <sup>®</sup> , Eovist <sup>®</sup>
MS-325	22,1	18,9	0,03	3–	5,0	Ablavar <sup>®</sup> , Vasovist <sup>®</sup>

<sup>a</sup> 37 °C; 1,5 T; voda

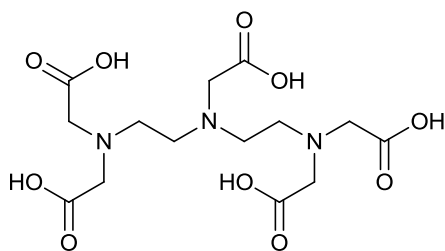
<sup>b</sup> 40 °C; 20 MHz; voda

<sup>c</sup> 0,05 mmol/kg pre hepatálne MRI

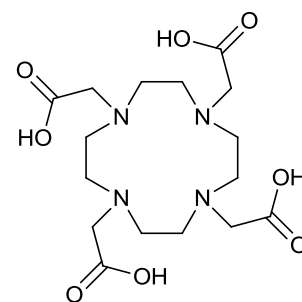
Obr. 4 – Ligandy gadolinových komplexů používaných v klinické praxi (okrem EDTA)



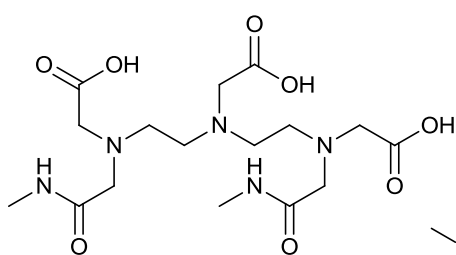
EDTA



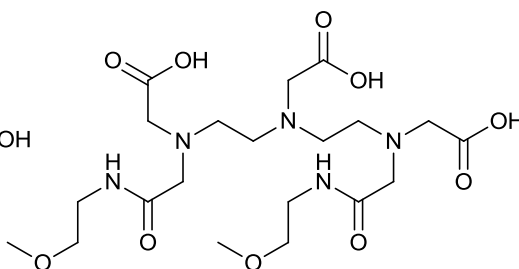
DTPA



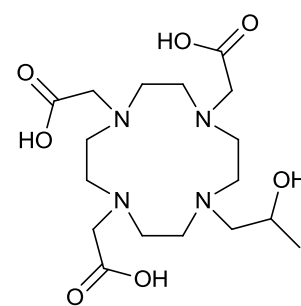
DOTA



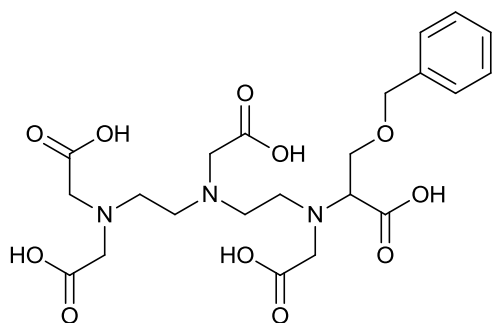
DTPA-BMA



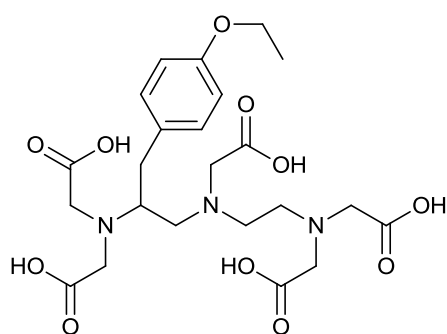
DTPA-DMEA



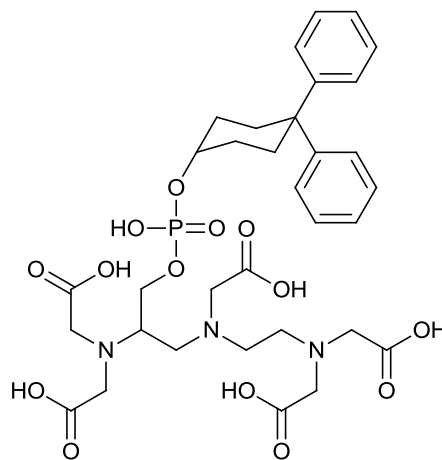
HP-DOTA



BOPTA



EOB-DTPA



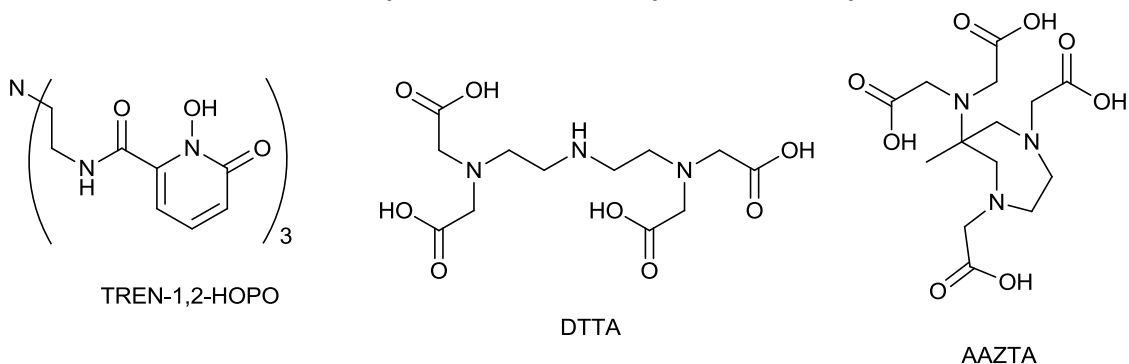
MS-325

V roku 1983 bol publikovaný prvý termodynamicky dostatočne stabilný gadolinitý komplex koordinujúci vodu (32). Zámenou jeden acetátovej skupiny ligandu EDTA za ethylamíndiacetát vznikne DTPA, ktorý sa dodnes používa v medicíne Magnevist®. Výhodou je pomerne lacná produkcia a prevaha kyslíkových donorových atómov nad dusíkovými (5 ku 3). Oktadentátnosť ligandu zvyšuje termodynamickú stabilitu komplexu (oproti šiestim donorovým atómom EDTA) a je vhodná pre koordinačné číslo centrálného atómu Gd(III). Celkový náboj komplexu je 2-, čo má za následok značnú iónovú silu a s tým spojenú bolestivosť pri intravenóznom podaní. Ďalší vývoj derivátov ligandu DTPA spočítku sledoval elimináciu náboja pri zachovaní termodynamickej stálosti a relaxivity medikamentu (komplex s DTPA-BMA, DTPA-BMEA a i.). Neskorší výskum bol zameraný na ciele orgánovú selektivitu a zvýšenie relaxivity kontrastnej látky moduláciou pendantných skupín (viď oddiel 1.3.5 a 1.3.6).

Významný nárast termodynamickej stability bol učený efektom makrocyclu nového ligandu založeného na skelete cyklénu – DOTA. Komerčne je medikament [Gd(dota)]<sup>-</sup> označovaný ako Dotarem®. Oktadentátnosť a veľkosť dutiny je výhodná pre Gd(III). Logaritmus konštanty termodynamickej stálosti presiahol hodnotu 25. Po získaní stáleho komplexu s gadolinitým kationom boli skúmané možnosti zvýšenia relaxivity modifikáciou jednej alebo viacerých acetylových skupín ligandu. Optimalizáciou parametrov relaxivity pomocou derivatizácie (oddiel 1.3.5) je teoreticky možné dosiahnuť až 20-násobné zvýšenie hodnôt  $r_1$  oproti  $r_1$ ([Gd(dota)]<sup>-</sup>) pri koordinácii jednej molekuly vody.

Existujú a sú skúmané ďalšie motívy ligandov s *N,O*-donorovými atómami (Obr. 5), ktoré koordinujú 2 molekuly vody ako sú napr.: HOPO (hexadentátnosť, nízka rozpustnosť, (33)), DTTA (viazanie na iné molekuly cez NH skupinu, (34)) a AAZTA (heptadentátnosť, bifunkcionalizácia, (35)). Ich termodynamické konštanty stability komplexov s Gd(III) nedosahujú veľkosti hodnôt ako pre komplexy odvodené od DOTA, ale relaxivity  $r_1$  sú priemerne dvojnásobné.

Obr. 5 – Motívy MRI  $T_1$  kontrastných látok vo výskume



### 1.3.3 Stabilita $T_1$ kontrastnej látky *in vivo*

Po aplikácii gadolinitého komplexu do tela pacienta je látka vystavená prítomnosti kompetitívnych centrálnych atómov a ligandov. Z hľadiska stability komplexu môžu *in vivo* nastať tri nežiaduce javy – transmetalácia, transchelatácia alebo kyslá dekomplexácia (disociácia komplexu).

Pri fyziologickom pH = 7,4 sa definuje podmienená konštanta stability  $K'$  (rovnica [4]) pre možnú prítomnosť komplexu a ligandu v rôzne protonizovaných stavoch. Z rovnice [4] je zrejmé, že hodnota  $K'$  je vždy menšia ako hodnota  $K$ .

$$K' = \frac{[[\text{GdL}]^{x-3}]}{\text{Gd}^{3+} (\text{L}^{x-} + \text{HL}^{(x-1)-} + \text{H}_2\text{L}^{(x-2)-} + \dots)} \quad [4]$$

Transmetaláciou sa rozumie zámena centrálného atómu komplexu za iný. Najčastejšie býva Gd(III) *in vivo* zamenené so Zn(II), Ca(II) alebo Cu(II) a tým sa uvoľní toxické trojmocné gadolínium. Termodynamické konštanty stability  $K$  MRI komplexov s rôznymi centrálnymi atómami prítomnými v tele znázorňuje *Tabuľka 6*, (27). Výmena Gd(III) za Zn(II), Ca(II) alebo Cu(II) bola markantná pri komplexoch odvodených od DTPA (pri amidických derivátoch DTPA bola najvyššia), u komplexov odvodených od DOTA bola zanedbateľná (*Tabuľka 6*, (36), (37)). Kardiodepresívny efekt (zníženie tlaku pre zakomplexovanie voľného Ca(II)) bol u myši pozorovaný po intravenóznom podaní gadolinitého komplexu lineárneho ligandu, ale u komplexov makrocyclických ligandov pozorovaný *in vivo* nebol (21). Lineárne komplexy ligandov odvodených od DTPA vykazovali transmetaláciu i s Fe(II) (38).

*Tabuľka 6:*

Termodynamická a kinetická stabilita komplexov						
Ligand L	logK([GdL])	logK([CaL])	logK([CuL])	logK([ZnL])	Podiel transmetalácie vo fosfátovom roztoku kovů <sup>a</sup>	
					Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
DTPA	22,1	10,7	21,4	18,3	25 %	21 %
DTPA-BMA	16,9	7,2	13,0	12,0	35 %	25 %
DOTA	25,8	17,2	22,6	21,0	< 1 %	< 1 %
HP-DO3A	23,8	14,8	22,8	19,4	< 1 %	< 1 %

<sup>a</sup> [GdL] a 0,25 mM M<sup>2+</sup> vo fosfátovom médiu, analyzované po 15 min.

Transchelatácia v tele je možná s ligandmi akými sú fosfáty, karboxyláty alebo hydroxyly látok prítomných *in vivo*, ale pravdepodobnosť výmeny polydentátneho chelátu za nešpecifický pre Gd(III) je veľmi nízka. *In vitro* štúdie v koncentrovanejších roztokoch oproti tým prítomným *in vivo* zaznamenali vysokú transchelatačnú inertnosť makrocyclických komplexov a značnú labilitu pre lineárne komplexy (21).

Pri nízkom pH (najmä v glomerulách) môžu voľné protóny atakovať elektrónové páry donorových atómov a tým iniciovať dekomplexáciu. Polčasy rozpadu komplexov pri meraní *in vitro* v prostredí pH = 1 boli dlhé pre komplexy makrocyclických ligandov ako DOTA. Stabilita bola znížená u komplexov Gd(III) s ligandmi DO3A a DTPA (Tabuľka 7, (21)). Klinicky sa tento jav prejavil ochorením NSF (nefrogenická systematická fibróza) a v rokoch 1997–2006 bolo zaznamenaných cca 200 prípadov – tí, ktorí prežili, zväčša ostali ťažko postihnutí po celý život (39). Príčina ochorenia v danom období je priradovaná k podaniu kontrastnej látky ligandu DTPA-BMA pacientom s renálnym ochorením (predĺžená cirkulácia v tele).

Pravdepodobnosť na transmetaláciu či disociáciu komplexu, t. j. uvoľnenie Gd(III), je vyššia pri dlhšej cirkulácii kontrastnej látky *in vivo*. Preto zotrvanie komplexu v tele by malo byť rádovo v rozmedzí hodín. Počas renálnej eliminácie pre nešpecifické MRI kontrastné látky sa pohybuje okolo 1,5 hodiny, avšak pri poškodení vylučovacej schopnosti sa tento polčas môže predĺžiť až na 30 hodín. Najdlhšie v tele zotrvávajú (neberúc do úvahy špecifické kontrastné látky ako Ablavar®) nešpecifické neiónové kontrastné látky odvodené od ligandu DTPA nasledované iónovými ligandmi odvodenými od DTPA (Tabuľka 7, (21)).

Tabuľka 7:

<b>Rozpad komplexov v pH = 1 a „clearance“</b>		
Ligand L	$T_{1/2}$	Nevylúčená dávka [GdL] po 14 dňoch od podania
DTPA	10 min.	0,095%
DTPA-BMA	35 s	0,300%
DOTA	> 1 mesiac	0,055%

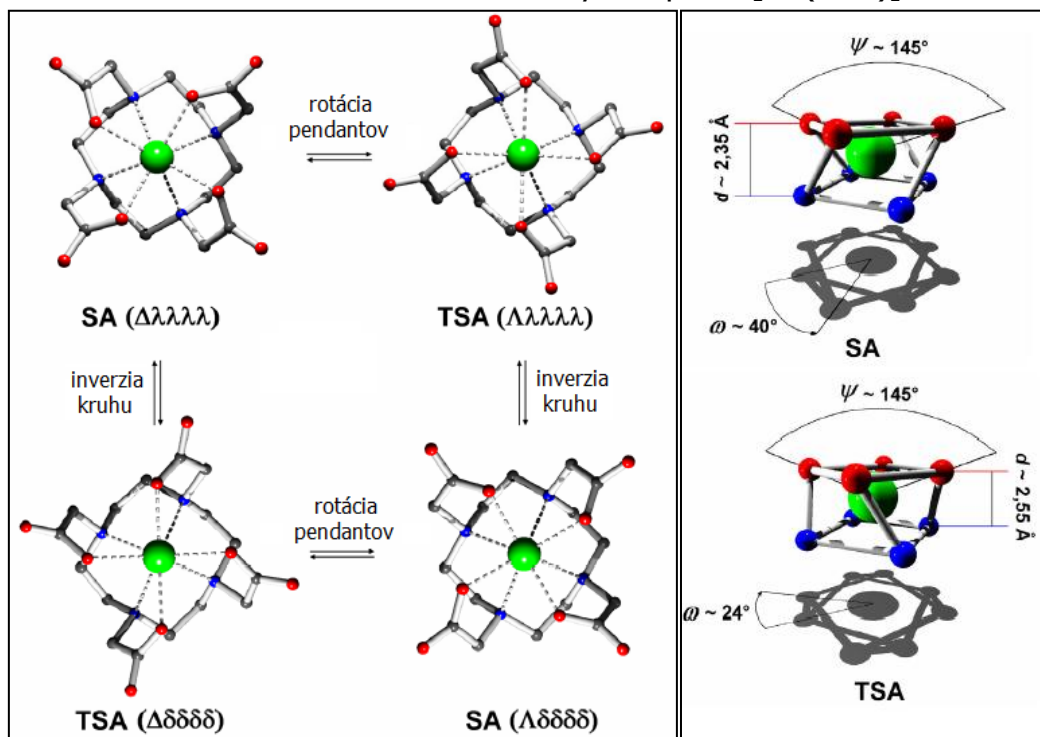
#### 1.3.4 Diastereoizoméry makrocyclických kontrastných látok

Ligandy založené na motíve DOTA môžu vytvárať 4 stereoizoméne formy, enantioméru dvojicu dvoch diastereoizomérov (*Obr. 6*), ktorých relaxivita je výrazne odlišná. Päťčlenné kruhy tvorené centrálnym atómom a ethyléndiamínovým fragmentom makrocyclického kruhu môžu byť v dvoch konformáciách –  $\delta$  alebo  $\lambda$ . Pre minimalizáciu vnútorného pnutia sú komplexy prítomné len vo formách  $\delta\delta\delta\delta$  alebo  $\lambda\lambda\lambda\lambda$  (všetky štyri päťčlenné kruhy vytvoria rovnakú konformáciu). Koordinácia kyslíkových atómov acetylových pendatných skupín vytvárajú ďalšie izoméne miesto. Rovina dusíkových donorových atómov makrocyclického kruhu a rovina kyslíkových atómov pendantových skupín sú paralelné. Stočenie indukované konformačným postavením päťčlenného cyklu tvoreného z atómov centrálny atóm–N<sub>makrocyclický</sub>–C<sub>sp3</sub>–C<sub>sp2</sub>–O môže byť prítomné vo forme  $\Delta$  alebo  $\Lambda$ . Kombináciou spomenutých konformácií vznikajú 4 stereoizoméry (*Obr. 6*). Diastereoizoméry  $\Delta\lambda\lambda\lambda$  a  $\Lambda\delta\delta\delta$  vytvárajú štvorcovú antiprizmu (SA, z angl.



„square antiprism“) a diastereoizoméry  $\Delta\delta\delta\delta$  a  $\Lambda\lambda\lambda\lambda$  skríženú štvorcovú antiprizmu (TSA, z angl. „twisted square antiprism“). Geometrické zobrazenie pre dvojce diastereoizoméry komplexov ligandu DOTA sú na Obr. 6 (40).

Obr. 6 – Diastereoizoméry komplexu  $[\text{Gd}(\text{dota})]^-$



Geometriu izomérov komplexu  $[\text{Gd}(\text{dota})]^-$  charakterizujú 3 veličiny: uhol  $\omega$  a  $\psi$  a veľkosť dutiny  $d$ . Uhol stočenia paralelných rovín donorových atómov  $\omega$  má priamy vplyv na veľkosť dutiny. Kým u izoméru SA dosahuje hodnôt  $40^\circ$  (ideálne  $45^\circ$ ), u TSA len  $24^\circ$  (ideálne  $22,5^\circ$ ) – spojnica dusíkového a kyslíkového atómu cez acetylovú skupinu  $\text{C}_{\text{sp}3}\text{--}\text{C}_{\text{sp}2}$  je konštantná pre oba diastereoizoméry a teda uhol stočenia rovín rozhoduje o ich vzdialenosti. Čím menší uhol  $\omega$ , tým väčšia hodnota  $d$ .

Uhol  $\psi$  („opening angle“) zvieraný centrálnym atómom a dvoma donorovými kyslíkovými atómami protiľahlých acetylových skupín je dôležitý pre koordináciu vody. Bolo zistené, že pri zmenšení uhla pod  $135^\circ$  (u komplexov derivátov DOTA) nie je komplex schopný priamo koordinovať vodu (40). Relaxivita kontrastnej látky je tým zväčša zanedbateľná a pre MRI nepoužiteľná.

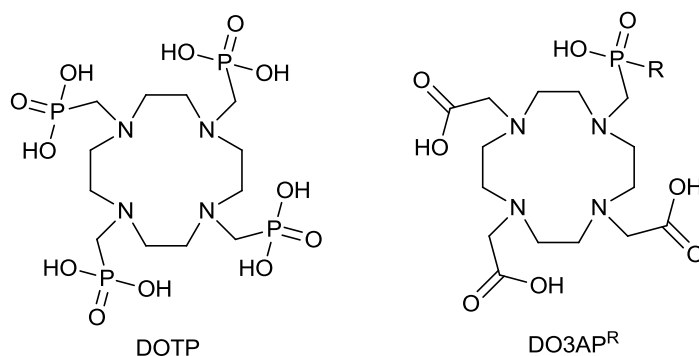
Veľkosť dutiny izomérov (miesto koordinácie centrálného atómu) vyplývajúca z geometrie komplexov je rôzna. U TSA je vzdialenosť  $d$  (výška dutiny) o  $0,20 \text{ \AA}$  dlhšia, preto je táto konformácia výhodnejšia pre veľké lanthanoidy ako Ce(III), Pr(III) a má u týchto lanthanoidov majoritné postavenie oproti SA izoméru (40). Takmer výlučne bol izomér SA nájdený u komplexov DOTA s lanthanoidmi podliehajúcimi zmenšeniu objemu vďaka lanthanoidovej kontrakcii ako Yb(III). Prítomnosť väčšej dutiny u TSA izoméru má za následok flexibilitu koordinačného okolia centrálného atómu a jeho lokálnym pohybom je schopný rýchlejšie vypudzovať

koordinovanú vodu (10- až 100-krát oproti SA izoméru), čo výrazne zvyšuje relaxivitu kontrastnej látky.

Zvýšený pomer TSA ku SA izoméru je žiadaný. Náhradou jednej acetylovej skupiny ligandu DOTA za fosfinovú alebo fosfónovú pendatnú skupinu vzniká ligand DO3AP<sup>R</sup>, ktorého komplex s Gd(III) si preferenčne vytvára vyššie zastúpenie diastereoizoméru TSA. Relaxivita kontrastnej látky výrazne rastie so zvyšujúcim sa pomerom TSA ku SA. Hlavnou príčinou majoritného zastúpenia TSA izoméru u gadolinitých komplexov ligandu DO3AP<sup>R</sup> je objemnosť fosforového atómu, ktorá predlžuje parameter *d*.

Po zámene všetkých acetylových skupín ligandu DOTA za fosfonáty (*Obr. 7*), vzniknutý komplex [Gd(dotp)]<sup>5-</sup> sa vyskytuje len vo forme  $\Lambda\Lambda\Lambda\Lambda$  a  $\Delta\delta\delta\delta$ , ale nie je schopný priamo koordinovať molekulu vody (vyskytuje sa vo forme TSA' – apostrof značí neschopnosť koordinovať vodu). Z pohľadu stability a relaxačných parametrov kontrastnej látky je výhodné syntetizovať a testovať ligandy typu DO3AP<sup>R</sup> (*Obr. 7*).

*Obr. 7* – Fosforové analógy ligandu DOTA



### 1.3.5 Základné parametre relaxivity

Princípom MRI  $T_1$  kontrastných látok je indukované znižovať relaxačný čas vody. Paramagnetický centrálny atóm kontrastných látok interaguje so spinom protónov molekúl vody a urýchľuje ich relaxáciu. Po „zrelaxovaní“ molekuly je požadovaná jej rýchla výmena za inú s „excitovanými“ protónmi vody. Účinnosť kontrastnej látky je charakterizovaná relaxivitou  $r_1$  – značí prevrátenú hodnotu relaxačného času  $T_1$  v 1 mM roztoku kontrastnej látky. Súčasne klinicky používané nešpecifické nízkomolekulárne MRI  $T_1$  kontrastné látky dosahujú relaxivity veľkosti jednotiek s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>, skúmané  $T_1$  kontrastné látky dosahujú niekoľkonásobok tejto hodnoty (41).

Numerická aproximácia a molekulový návrh nových ligandov pre komplexy s Gd(III) vychádzajú z tzv. všeobecnej SBM (Solomon-Bloembergen-Morgan) teórie, ktorá bola neskôr prispôbená základnému spinovému stavu Gd(III) <sup>8</sup>S<sub>7/2</sub> (42). Pozorovaný relaxačný čas  $T_1$  má 2 príspevky – diamagnetický a paramagnetický (rovnica [5]). Kým diamagnetický príspevok sa nedá priamo ovplyvniť, relaxivita

paramagnetického príspevku, t. j. Gd(III) komplexu, je závislá na modulovateľných veličinách ako  $q$ ,  $\tau_M$ ,  $\tau_R$  a  $i$ . (rovnice [6]–[8], (33)), ktoré budú rozobrané v ďalších odstavcoch. Relaxivita kontrastnej látky je závislá na sile magnetického poľa, a preto hodnoty  $r_1$  sú rôzne pre rôzne magnetické polia. Závislosť relaxivity na korelačných časoch, na magnetickej indukcii poľa a z nej vyplývajúcej Larmorovej frekvencie precesie protónu vody je znázornená na Obr. 8 (40).

$$\frac{1}{T_{1,2 \text{ obs}}} = \frac{1}{T_{1,2 \text{ d}}} + \frac{1}{T_{1,2 \text{ p}}} \quad [5]$$

$T_1$  je pozdĺžny relaxačný čas vody,  $T_2$  je priečny relaxačný čas vody, index „obs“ označuje pozorovanú relaxáciu, „d“ diamagnetický príspevok a „p“ paramagnetický príspevok.

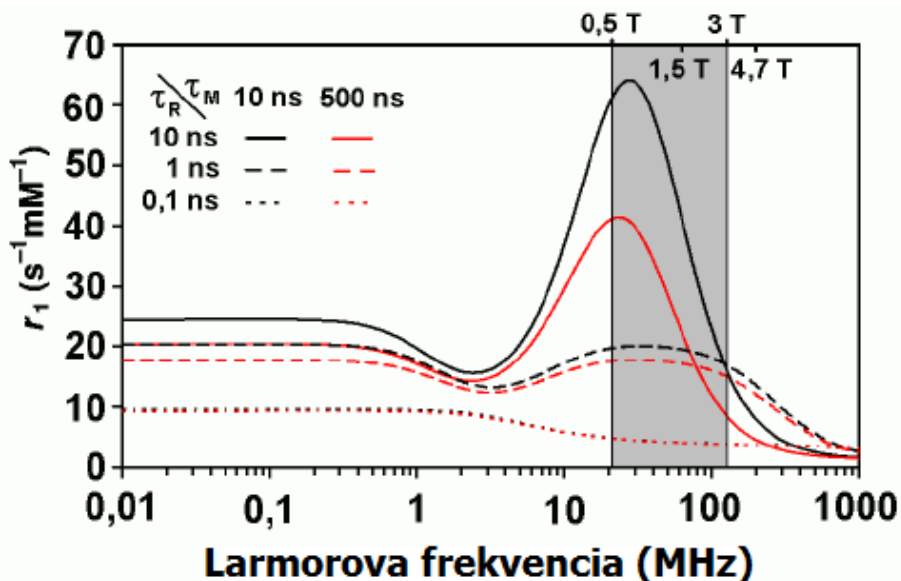
$$\frac{1}{T_{1 \text{ p}}} = qP_m \frac{1}{T_{1m} + \tau_m} \quad [6]$$

$$\frac{1}{T_{1m}^{\text{DD}}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma^2 g^2 S(S+1) \mu_B^2}{r_{\text{Gd-H}}^6} \frac{3\tau_{C1}}{1 + \omega_H^2 \tau_{C1}^2} + \frac{7\tau_{C2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{C2}^2} \quad [7]$$

$$\frac{1}{\tau_{C1,2}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{T_{1,2e}} + \frac{1}{\tau_M} \quad [8]$$

$q$  je počet viazaných molekúl vody,  $P_m$  je molárny zlomok vody koordinovanej k centrálnemu atómu,  $T_{1m}$  je relaxačný čas koordinovanej vody,  $\tau_m$  je rezidentný čas molekuly vody,  $T_{1m}^{\text{DD}}$  je relaxačný čas dipól-dipólovej relaxácie,  $\gamma$  je nukleárny gyromagnetický pomer,  $g$  je elektrónový g-faktor,  $S$  je spinové kvantové číslo,  $\mu_B$  je Bohrov magnetón,  $r_{\text{Gd-H}}$  je vzdialenosť spinu elektrónu gadolína od spinu protónu koordinovanej vody,  $\tau_{C1}$  a  $\tau_{C2}$  sú korelačné časy,  $\omega_H$  je nukleárna Larmorova frekvencia,  $\omega_S$  je elektrónová Larmorova frekvencia,  $\tau_R$  je rotačný čas komplexu a  $T_{1,2e}$  je čas elektrónovej relaxácie paramagnetika (viď oddiel 1.3.1).

Obr. 8 – Relaxivita kontrastnej látky zo SBM teórie podľa sily magnetického poľa



Počet priamo koordinovaných vôd, označený veličinou  $q$ , väčšinou lineárne zvyšuje (rovnica [5]) relaxivitu kontrastnej látky – súčasná relaxácia dvoch molekúl dvojnásobne skracuje  $T_1$  relaxačný čas vody. Avšak možnosť koordinácie viacerých molekúl k centrálnemu atómu vyžaduje určitý priestor. Toho sa dosiahne znížením dentátnosti ligandu (napr. heptadentátny DO3A s  $q = 2$ ), čím sa ale rapídne zníži termodynamická stabilita a kinetická inertnosť komplexov, dokonca pod úroveň kontrastných látok odvodených od ligandov DTPA. Zároveň pri susednej koordinácii molekúl vody sa väčšinou vytvára koordinačné miesto dostatočne veľké na bidentátne naviazanie inej molekuly, ako je napríklad uhličitan alebo citrát, a tým relaxivita látky výrazne klesne. Výnimku tvoria gadolinité komplexy na báze ligandu HOPO, ktoré vytvárajú dve nesusedné koordinačné miesta molekúl vody. Termodynamická stabilita komplexov je zrovnateľná s  $[\text{Gd}(\text{dtpa})]^{2-}$  hlavne pre koordináciu len kyslíkových donorových atómov ligandu, ale ich kinetická inertnosť je nízka (33).

Molekuly vody v sekundárnej a vonkajšej hydratačnej sfére komplexu prispievajú k celkovej relaxivite kontrastnej látky nemalým podielom okolo 20 %. Proces relaxácie vôd sekundárnej sféry býva vysvetľovaný prenosom magnetizácie cez vodíkové väzby, ktoré ligand s protónmi vody môže vytvárať. Preto gadolinitý komplex ligandu DOTP, nekoordinujúci vodu k centrálnemu atómu, má relaxivitu podobnú s  $q = 1$  u komplexu  $[\text{Gd}(\text{dota})]^-$  (43).

Rezidentný čas koordinovanej vody, označený konštantou  $\tau_M$ , býva najčastejšie ovplyvňovaný nábojom alebo zastúpením izomérov komplexu. Coulombické interakcie nabitého komplexu so značne polárnou molekulou vody pomáhajú rýchlejšie vypudzovať koordinovanú vodu od centrálného atómu. Čím nabitejší komplex, tým nižšia hodnota  $\tau_M$  (platí len pre rovnaký typ ligandu ako DTPA alebo DOTA). Avšak pre bolestivosť pri intravenózne aplikácii kontrastnej látky pacientovi sa dáva prednosť cieľným návrhom molekuly, aby vytvárala zvýšenú populáciu TSA izoméru. Flexibilita centrálného atómu v dutine TSA izoméru (oddiel 1.3.4) dekoordinuje

„relaxovanú“ molekulu vody 10- až 100-krát rýchlejšie ako SA izomér (40). Optimalizácia parametru je tým závislá na vytvorení ligandu na báze ako napríklad DO3AP<sup>R</sup>, v ktorých prípadoch sa Gd(III) komplex vyskytuje vo zvýšenej miere ako TSA izomér. Zo SBM teórie vyplýva, že za použitia magnetu o sile 1,5 T (najpoužívanejší typ MRI skeneru) by veľkosť  $\tau_M$  mala ideálne ležať v intervale 10–30 ns pre dosiahnutie maximálnej relaxivity moduláciou  $\tau_M$  (40). Pre klinicky používané MRI kontrastné látky je rezidentný čas až na úrovni stoviek ns, čo je zapríčinené najmä majoritným (80–90 %) zastúpením SA izomérov makrocyclických komplexov.

Rotačný čas komplexu charakterizuje veličina  $\tau_R$ . Tento parameter býva najčastejšie v záujme MRI chemikov, pretože spomalenie pohybu molekuly komplexu v roztoku sa dá ovplyvniť. Zvýšením molekulovej hmotnosti komplexu sa molekulárny pohyb spomalí. Najčastejšie sa komplexy konjugujú s veľkými molekulami akými sú dendriméry, proteíny, lipozómy, nanočastice alebo cyklodextríny (15). Ďalším možným navýšením molekulovej hmotnosti je modifikácia pendantných skupín ako napríklad u medikamentu Vistarem<sup>®</sup> ( $r_1 \sim 40 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  pri 20–40 MHz a 310 K, (44)). Nevýhodou týchto látok je až príliš dlhá cirkulácia *in vivo*. Preto boli vyvinuté biodegradovateľné makromolekulárne kontrastné látky (napr. s prítomnosťou disulfidových mostíkov (45)). Alternatívou k navyšovaniu molekulovej hmotnosti je využitie nekovalentných interakcií, najmä s ľudským sérovým albumínom (HSA – z angl. „human serum albumin“), pretože je najzastúpenejšou bielkovinou v krvi (4% roztok; 0,6 mM, (46)). Albumíny obsahujú dve hydrofóbne dutiny, do ktorých sa môžu nekovalentne naviazať nepolárne skupiny, napríklad na báze fenylu, bisfenylu, benzylu a pod. Tento princíp využívajú látky Ablavar<sup>®</sup> (Vasovist<sup>®</sup>),  $[\text{Gd}(\text{bopta})]^{2-}$ ,  $[\text{Gd}(\text{eob-dtpa})]^{2-}$  (ligandy komplexov sú uvedené na Obr. 4), o ktorých bude podrobnejšie písané v oddieli 1.3.6, a iné. Súčasný výskum smeruje k inkorporácii skupín do molekúl kontrastných látok selektívne viažucich sa k biomarkerom špecifických buniek (tzv. targeting), napríklad tumorov (15). Kombináciou efektov uvedených v tomto odstavci sa moduluje  $\tau_R$ , aby dosahovalo niekoľko jednotiek ns (optimum podľa SBM teórie pre používané MRI skenery).

Elektrónová relaxácia  $T_{1,2e}$  nie je cielene modulovateľná, ale jej veľkosť pre gadolinitý ión ( $\sim 10^{-8} \text{ s}$ , (19)) je značný a tvorí dominantný príspevok pre celkovú relaxivitu  $T_1$  kontrastnej látky. Čím vyššiu symetriu dosahuje komplex, tým je čas  $T_{1,2e}$  dlhší.

### 1.3.6 Nekovalentná interakcia so sérovým albumínom

Hlavným cieľom nekovalentnej interakcie *in vivo* je zníženie rotačného času  $\tau_R$  (zvýšenie relaxivity) a spomalenie rýchlej renálnej exkrécie (najrýchlejšia u najviac nabitých molekúl) kontrastnej látky. Zastúpenie sérového albumínu v krvi ľudského tela je 4% a tento proteín je teda vhodným kandidátom na interakciu s kontrastnou látkou („targeting“). V molekule, pripomínajúcej srdce, sú dve významné hydrofóbne dutiny, do ktorých sa môžu nekovalentne a rezerzibilne naviazať celkovo dve lipofílné

látky. Tým sa vylučovanie kontrastnej látky z krvi (a z tela) spomalí a môže byť využitá dlhšie pre MRI skenovanie. Dávka potrebná na vyšetrenie sa navyše zníži vďaka vyššej relaxivite komplexu po naviazaní na HSA. Tohto princípu využívajú niektoré klinicky využívané kontrastné látky.

Tabuľka 8:

<b>Kontrastné látky ([GdL]) s nekovalentnou interakciou s HSA</b>		
Ligand L	$r_1^a / s^{-1} \text{ mM}^{-1}$	
	Vo vode (bez HSA)	V krvi (s HSA)
DTPA	3,3 <sup>b</sup>	4,3 <sup>b</sup>
DOTA	3,0	–
BOPTA	5,4	6,9
EOB-DTPA	7,1	8,5
MS-325	5,2 <sup>b</sup>	19,0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> 1,5 T; 293 K; (47)

<sup>b</sup> 1,5 T; 310 K

Medzi prvými syntetizovanými kontrastnými látkami viažucimi sa na albumín boli gadolinité komplexy od ligandov EOB-DTPA a BOPTA (*Obr. 4*). Benzyloxometylová skupina u ligandu BOPTA a 4-ethoxybenzylová skupina u EOB-DTPA nekovalentne interagovali s hydrofóbnymi dutinami sérového albumínu, ich relaxivita sa mierne zvýšila (*Tabuľka 8*). Avšak nárast relaxivity *in vivo* nebol očakávané enormný, pretože tieto kontrastné látky sa zdržiavajú a sú vychytávané hepatocytmi. Cez aniónové transportéry (komplexy sú záporne nabité) sú prenášané do buniek pečene a pomaly vylučované do žlči pacienta. Hepatobiliárna exkrécia u človeka je rýchlejšia u komplexu ligandu EOB-DTPA (50%) oproti BOPTA (2–4%), ktorý sa vylučoval skôr renálne (48). Obe tieto kontrastné látky sú klinicky používané na hepatálne MRI. Lepší kontrast pečene dáva gadolinitý komplex od ligandu EOB-DTPA, ktorého dávka pred vyšetrením dosahuje 0,025 mmol kg<sup>-1</sup> (štvornásobné zníženie oproti nešpecifickým kontrastným látkam) so zachovaním kontrastu pri MRI skenovaní (48).

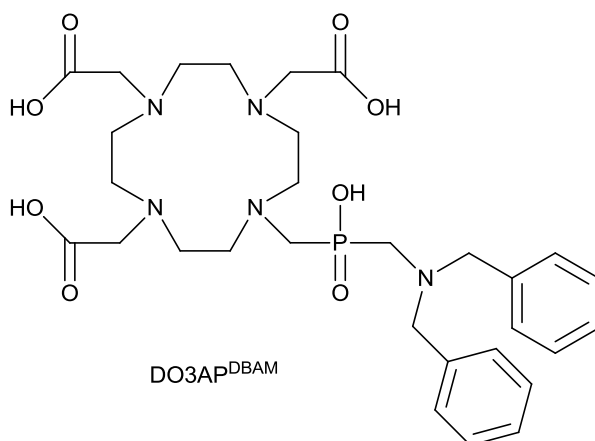
Čisto angiografickou kontrastnou látkou bol až kedysi v USA hojne používaný medikament Ablavar<sup>®</sup> (staro Vasovist<sup>®</sup>, Gd(III) komplex ligandu MS-325, *Obr. 4*). (4,4-difenyl)cyklohexylovová skupina ochotne interaguje s albumínom a vytvára pomerne silnú nekovalentnú väzbu. Relaxivita sa po naviazaní zvýši takmer štyrikrát (u človeka) a kontrastná látka ostáva v krvi – nedifunduje do iných tkanív. Dávka potrebná a používaná pre MRI skenovanie je významne znížená na 0,03 mmol kg<sup>-1</sup>. Avšak interakcia s albumínom je natoľko pevná, že komplex *in vivo* zotrúva príliš dlhý čas. Konštanta stability je relatívne nízka, čo odpovedá necyklickému ligandu na báze DTPA, i napriek trojnásobne zápornému náboju komplexu. Pri prechode krvi cez

glomeruly môže nastať dekomplexácia a do tela sa vyplaví toxický gadolínový ión. Pre zvýšenie výskytu ochorení (NSF, oddiel 1.3.3) súvisiacich s týmto javom nebol Ablavar<sup>®</sup> (Vasovist<sup>®</sup>) v Európe povolený pre klinické použitie (49).

Pre relatívne pevnú nekovalentnú interakciu s HSA je potrebné mať lipofílnu terminálnu skupinu atómov a blízku záporne nabitú skupinu, ktorá stabilizuje interakciu s HSA (celkom blízko hydrofóbnej dutiny je centrum s kladným nábojom). U medikamentu Ablavar<sup>®</sup> je difenylcyklohexylová skupina prepojená so záporne nabitým fosfátom, u MultiHance<sup>®</sup> (od ligandu BOPTA) je benzylová skupina naviazaná cez polárny oxomethylén priamo na záporne nabitú skupinu DTPA.

## Cieľ práce

Ako bolo popísané v predchádzajúcich oddieloch, kontrastná látka by mala mať čo najvyššiu relaxivitu (optimalizácia relaxačných parametrov), mala by byť *in vivo* termodynamicky a kineticky stála a musí koordinovať aspoň jednu vodu pri vhodnom (ideálne fyziologickom) pH. Pre splnenie týchto požiadaviek bola navrhnutý ligand typu DO3AP<sup>R</sup>, DO3AP<sup>DBAM</sup>, a z neho vyplývajúci gadolinový komplex nasledujúcej štruktúry<sup>2</sup>:



Z MRI hľadiska má Gd(III) komplex od uvedeného ligandu tieto výhody:

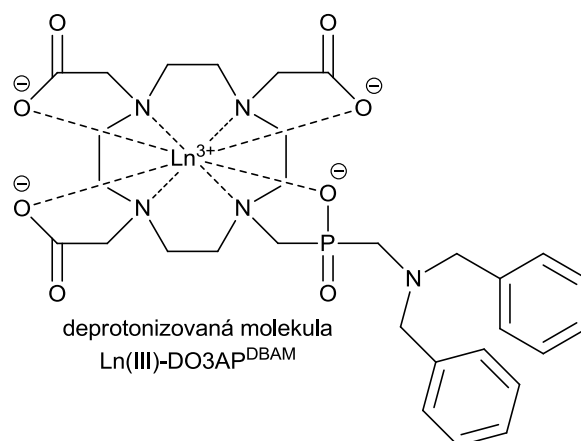
- prítomnosť makrocyclu zvyšuje termodynamickú a kinetickú stabilitu
- fosfínová pendantná skupina si vynucuje vyššie zastúpenie TSA izoméru (oproti Gd(III) komplexu ligandu DOTA)
- dibenzylová skupina sa môže nekovalentne viazať na sérový albumín a tým sa zníži  $\tau_R$  a rýchla renálna exkrécia *in vivo*
- kladný náboj na možnom protonizovanom amíne pendantnej skupiny môže oslabiť nekovalentné viazanie sa na sérový albumín a tým meniť relaxačné vlastnosti v závislosti na zmene pH

Návrh syntézy ligandu (DO3AP<sup>DBAM</sup>) spočíval v reakcii typu Moedritzer-Irani, t. j. spojenie už syntetizovaných a publikovaných východiskových reaktantov cez metylén pochádzajúci z formaldehydu vo vodnom prostredí (*Schéma 2*). Pre nešpecifickosť reakcie a možnosť množstva konkurenčných reakcií bol vytvorený návrh na prípravu DO3AP<sup>DBAM</sup> cez nevodnú cestu – reakcie typu Kabachnik-Fields (*Schéma 3*). Alternatívny postup zahŕňal prípravu reaktívneho mezylátu po esterifikácii fosfínovej kyseliny a naviazanie na makrocyclus alkyláciou v bázičkom prostredí. *Schéma 1* znázorňuje prípravu a derivatizáciu použitej fosfínovej kyseliny (DBAMPIN).

<sup>2</sup> [(*N,N*-dibenzylaminometyl)fosfínová] pendantná skupina už bola použitá u analogického ligandu s DTPA (51), ale ich komplexy s Ln(III) boli kineticky veľmi labilné. Pri použití makrocyclickeho ligandu by mala byť kinetická inertnosť komplexov vyššia.



Po získaní DO3AP<sup>DBAM</sup> budú vytvorené komplexy s relevantnými lanthanoidmi a pomocou luminiscenčných meraní zistené, či dokážu koordinovať vodu v závislosti na pH. Nasledovne bude vytvorený komplex s trojmocným gadolíniom, ktorý bude testovaný *in vitro* na zmenu relaxivity bez a s prítomnosťou BSA a *in vivo* budú zaznamenané časovo odstupňované snímky po MRI skenovaní potkana (intravenózne podanie kontrastnej látky).



## 2. Experimentálna časť

### 2.1 Metódy charakterizácie

#### NMR

NMR spektrá molekúl boli merané na spektrometre Varian VNMRS 300 a Bruker Avance (III) 600, oba sú dostupné na PŘ UK. Chemické posuny skupín sú uvedené v jednotkách ppm vztiahnuté na použité štandardy (Tabuľka 9). Pri jednotlivých charakterizáciach látok v experimentálnej časti je zaznamenaný použitý štandard. Interakčné konštanty  $J$  sú v jednotkách Hz (vždy na 3 platné cifry). Chemické posuny sú zaokrúhlené na dve desatinné miesta pre  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  a  $^{31}\text{P}$  a jedno desatinné miesto pre  $^{13}\text{C}$ .

Tabuľka 9:

Štandardizácie NMR spektier		
Spektrum	Látka	Posun $\delta$ / ppm
$^1\text{H}$ -NMR	Voda <sup>a</sup> ( $\text{H}_2\text{O}$ )	4,80
$^1\text{H}$ -NMR	Tetramethylsilán (TMS)	0,00
$^1\text{H}$ -NMR	2-methylpropan-2-ol ( $t\text{BuOH}$ )	1,25
$^{13}\text{C}$ -NMR	2-methylpropan-2-ol ( $t\text{BuOH}$ )	30,29
$^{13}\text{C}$ -NMR	Chloroform- $d^b$ ( $\text{CDCl}_3$ )	77,20
$^{19}\text{F}$ -NMR	Trifluórooctová kyselina (TFA)	-76,55
$^{31}\text{P}$ -NMR	Kyselina fosforečná <sup>c</sup> ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )	0,00

<sup>a</sup> Pri neprítomnosti  $t\text{BuOH}$  alebo TMS bolo  $^1\text{H}$ -NMR spektrum referencované na vodu

<sup>b</sup> Pri neprítomnosti  $t\text{BuOH}$  alebo TMS bolo  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum referencované na  $\text{CDCl}_3$

<sup>c</sup> Prítomná vždy v externej inertovej kyvete ako 85% vodný roztok

Spektrá boli namerané Mgr. Terezou Krchovou, Bc. Janom Blahutom, Mgr. Ondrejom Zemkom, Mgr. Tomášom Davidom a mnou.

#### MS

Hmotnostné spektrá boli namerané na prístroji Bruker ESQUIRE 3000 s metódou ESI („Electron Spray Ionization“) a IT („Ion Trap“) detektorom. Boli získané spektrá kladné (+) a záporné (-) podľa spôsobu polarizácie. Relevantné signály sú uvedené a vysvetlené pri jednotlivých charakterizáciach látok.

Spektra boli namerané Bc. Janom Blahutom a Mgr. Ondrejom Zemkom.

## TLC

Tenkvrstvová chromatografia bola uskutočnená na doštičkách TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) so sorbentom SiO<sub>2</sub> nanesenom na hliníkovej fólii a doskách TLC Aluminium Oxide 60 F<sub>254</sub> Neutral (Merck) so sorbentom Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanesenom na hliníkovej fólii. Mobilné fázy sú uvedené pri charakterizácii príslušnej látky v experimentálnej časti.

Detekcia bola uskutočnená pre SiO<sub>2</sub> doštičky UV lampou MINERALIGHT® LAMP nastavenou na vlnovú dĺžku 254 nm, následným ponorením do 10% roztoku modrej skalice (CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O) a zahriatím teplovzdušnou pištoľou, pre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> doštičky „vyvolaním“ v parách I<sub>2</sub> (cca 10 min.) a zahriatím teplovzdušnou pištoľou.

## Elementárna analýza

Elementárna analýza bola uskutočnená na Ústave makromolekulárnej chémie AV ČR v Prahe na analyzátore Perkin Elmer 2400. Hmotnostné percentá sú uvádzané na dve desatinné miesta.

## RTG

Difrakčné dáta boli získané a vyriešené RNDr. Ivanou Císařovou, CSc., na prístroji Enraf-Nominus KappaCCD dostupným na PŘF UK. Štruktúru spresnil školiteľ doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

## Luminiscencie

Luminiscenčné merania uskutočnil školiteľ doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D., a ja na prístroji AMINCO Bowman® Series 2 dostupnom na PŘF UK. Výsledky meraní vysvetlil školiteľ.

## Relaxácie (meranie $T_1$ )

Relaxačné časy  $T_1$  boli merané Bc. Matyášom Krijtom a mnou na relaxometroch Bruker The MINISPEC mq20 (pole 0,5 T) a Bruker The MINISPEC mq40 (pole 1,0 T) na pracovisku IKEM. Vzorky boli temperované pred meraním v termostate na 37 °C počas minimálne 15 minút a pri meraní strojom na 37 °C.

## 2.2 Reakčné schémy

Schéma 1:

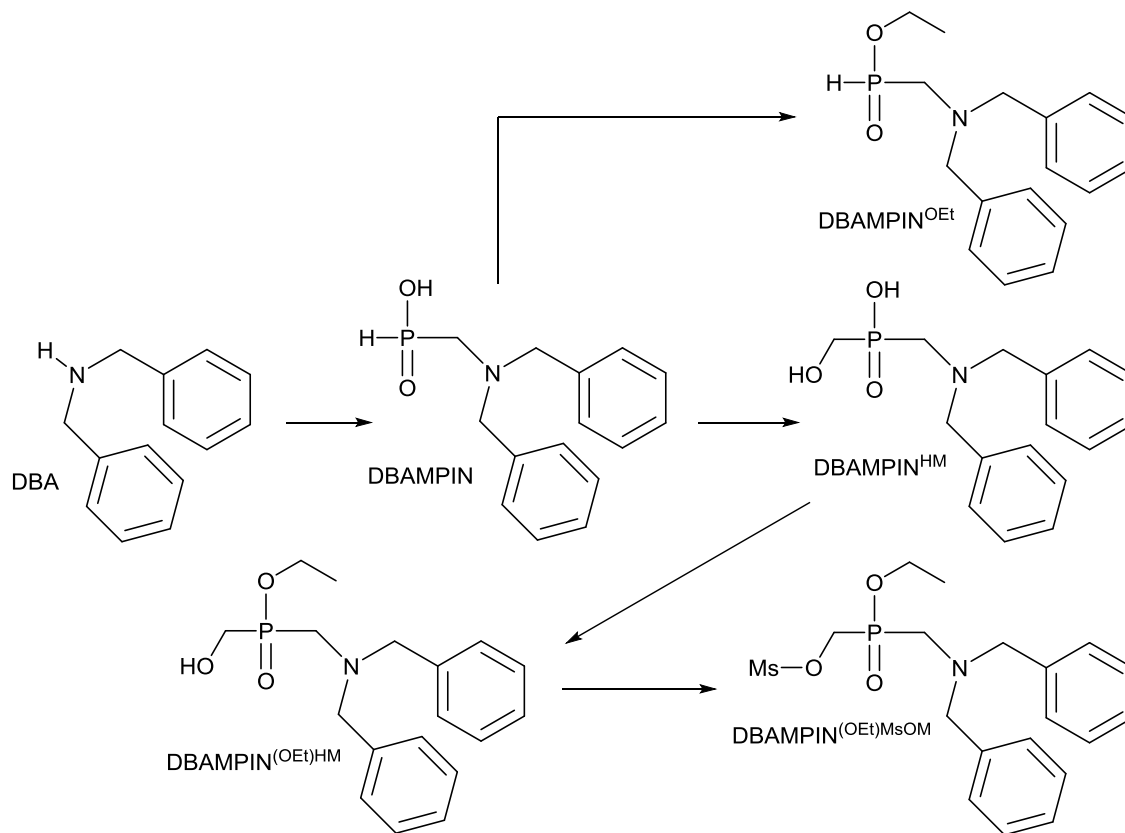


Schéma 2:

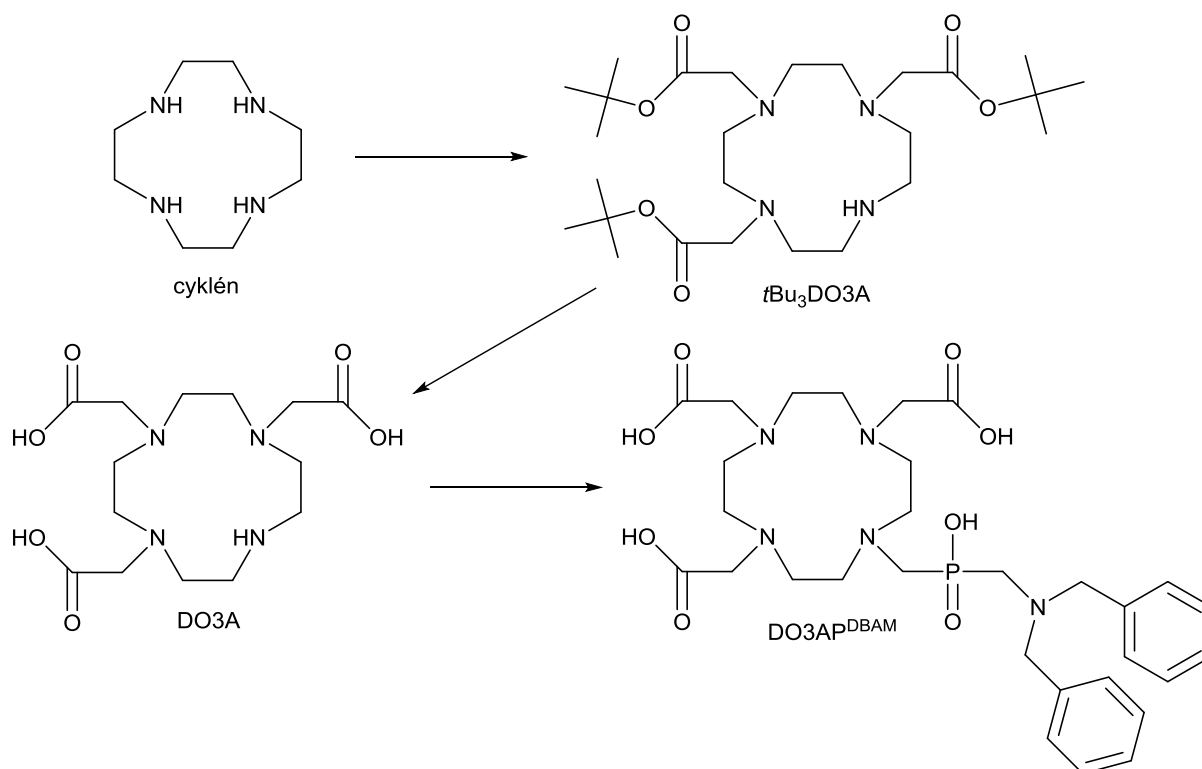
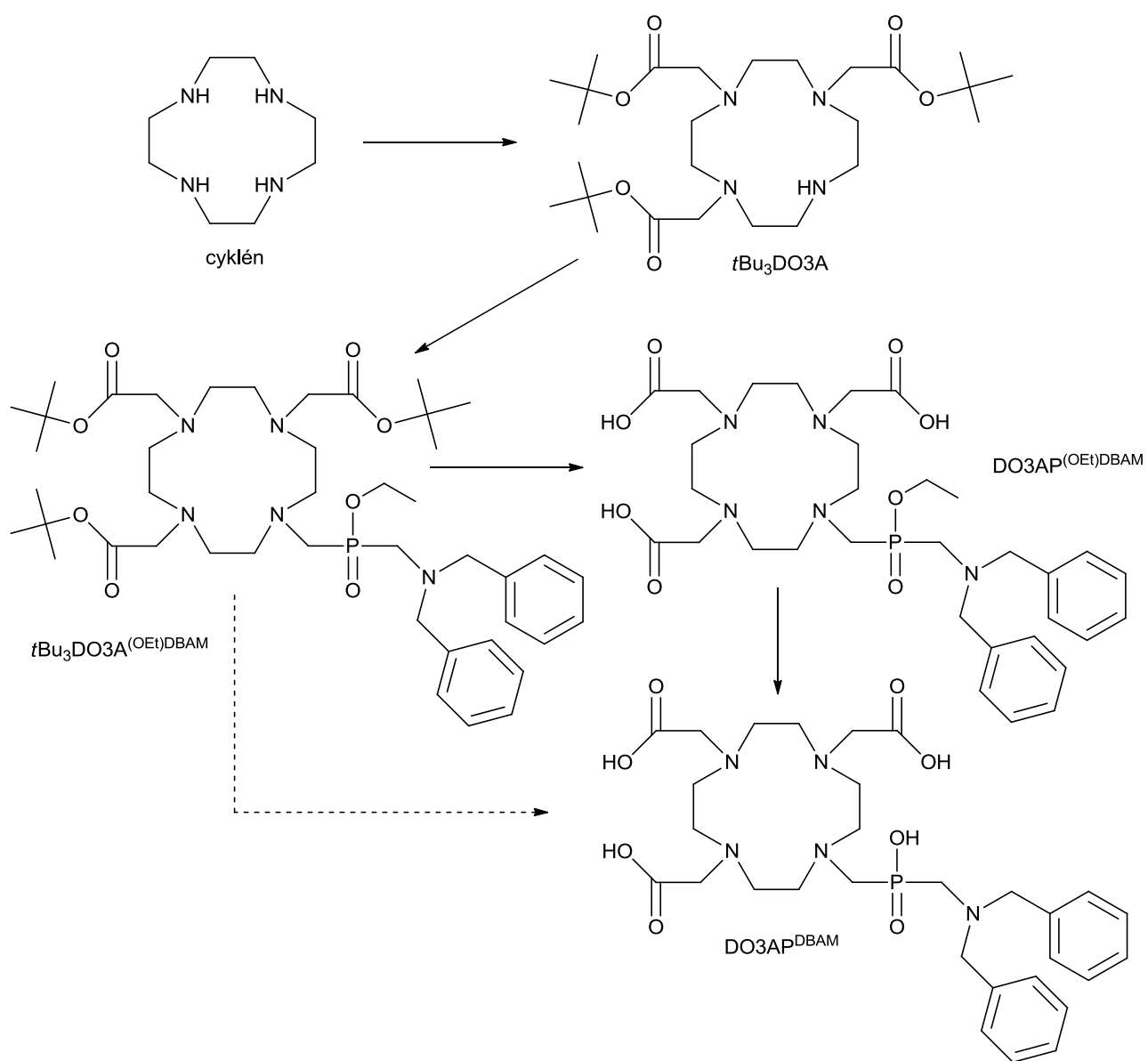
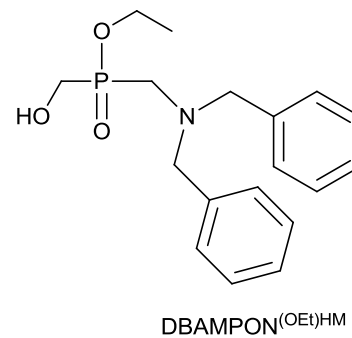
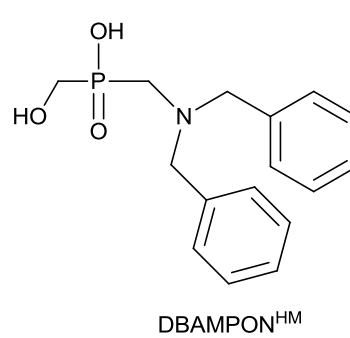
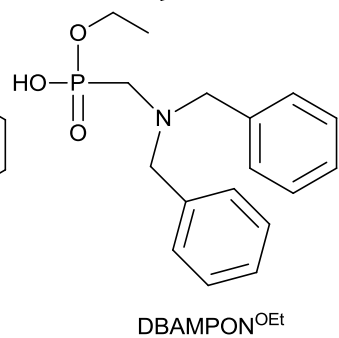
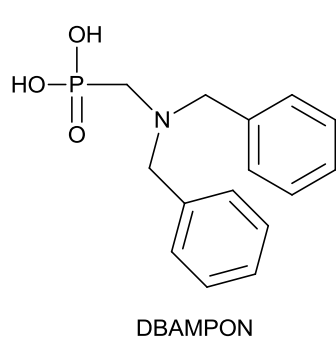
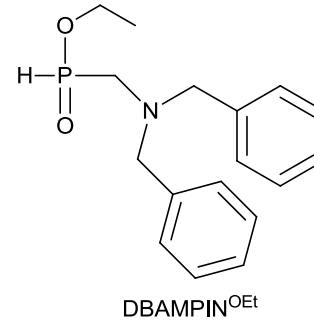
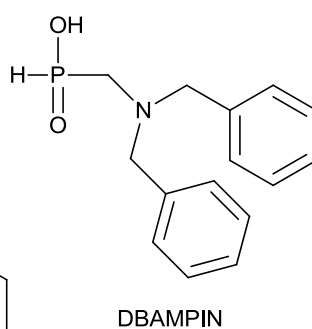
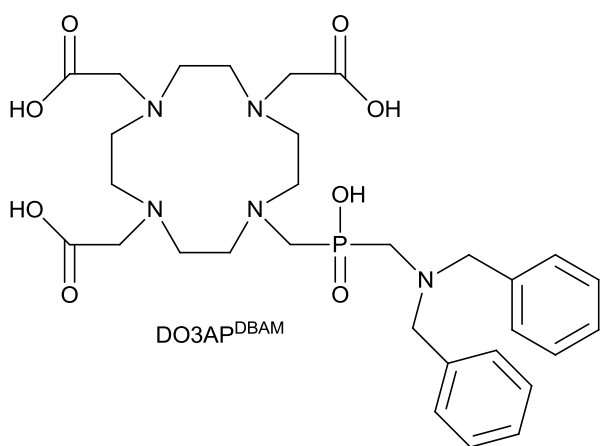
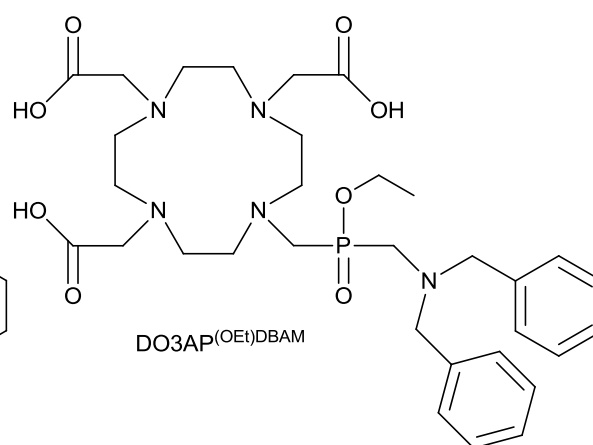
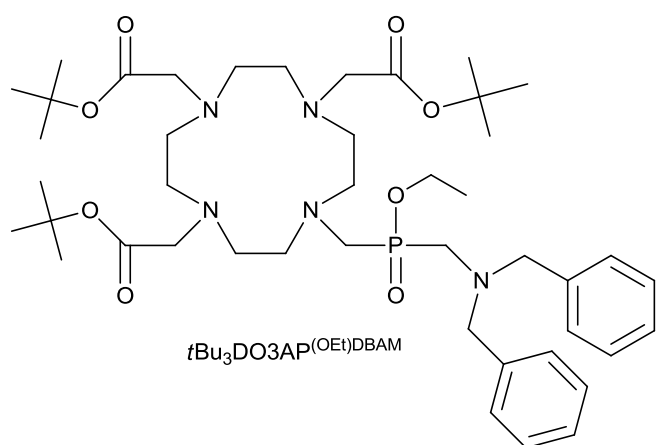
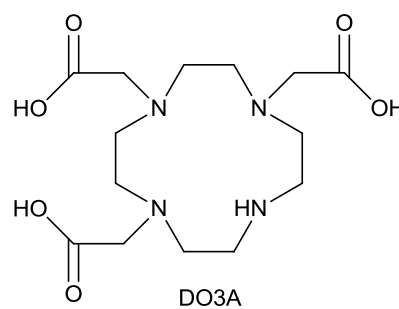
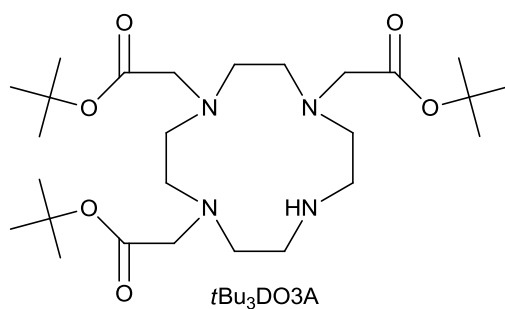
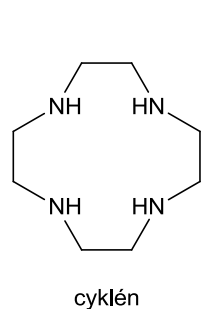


Schéma 3:



## 2.3 Kódové označenie molekúl



### 3. Syntetická časť

Miešanie reakčnej zmesi bolo vždy uskutočnené magnetickým miešadlom (magnet obalený teflónom) prítomným v roztoku. Boli použité magnetické miešačky v kombinácii s varičom s termostatom a olejové kúpele naplnené silikónovým olejom, ktorý bol premiešavaný pozdĺžnym magnetickým predmetom.

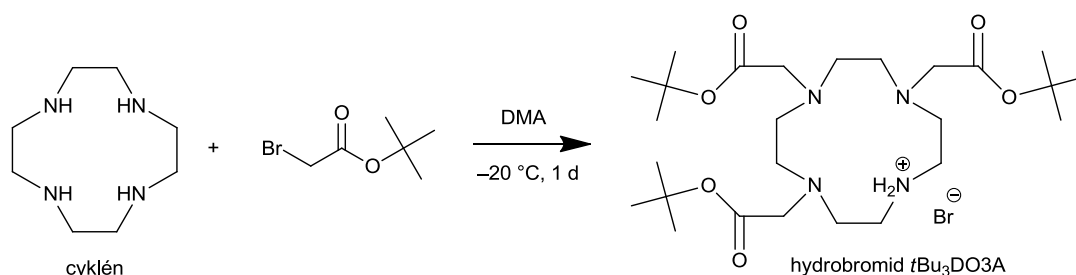
Ďalej popísané postupy sú reprezentatívne a hlavná príprava („nevodná cesta“ s rozpúšťadlom DMF) bola viackrát zreprodukovaná sa podobnými výsledkami.

Pojmom  $\text{NH}_3$  sa vždy myslí koncentrovaný vodný roztok amoniaku (25%), silný kationový menič bol vždy Dowex 50, silný aniónový menič Dowex 1 a slabý kationový menič Amberlite CG50.

Ak nie je napísané inak, použité TLC dosky mali sorbent  $\text{SiO}_2$  a boli „vyvolané“ ponorením do roztoku modrej skalice. TLC dosky so sorbentom  $\text{Al}_2\text{O}_3$  boli použité iba na komplexy lanthanoidov a boli „vyvolané“ adsorbciou plynného  $\text{I}_2$ .

## 3.1 Základné reaktanty

### 3.1.1 1,4,7-tris(*tert*-butoxykarbonylmethyl)cyklén hydrobromid – *t*Bu<sub>3</sub>DO3A



Postup bol zreprodukovaný podľa návodu v literatúre – (50).

V zábrusovej banke, ponorenej v ethanole, bola vytvorená suspenzia 5,00 g (29,0 mmol) cyklenu a 7,86 g (95,9 mmol; 1,1 ekv.) bezvodého<sup>3</sup> octanu sodného v 60,0 ml suchého *N,N*-dimethylacetamidu (DMA). Zmes bola temperovaná ethanolickým kúpeľom chladeným na teplotu v rozpätí –20 až –25 °C prídavkami suchého ľadu. K suspenzii bolo počas chladenia kvapkami pridaných zmes 14,1 ml (18,7 g; 95,9 mmol; 1,1 ekv.) *t*-butyl bromoacetátu v 20,0 ml DMA. Nasledujúcich 24 hodín sa zmes miešala pri laboratórnej teplote.

Vzniknutá biela suspenzia bola rozpustená vylitím do cca 300 ml destilovanej vody. Počas stáleho miešania bolo k roztoku prisypaných po častiach 15,00 g (150 mmol) KHCO<sub>3</sub> (zo zmesi unikal CO<sub>2</sub>), čím sa z roztoku vyzrážal produkt vo forme bieleho prášku. Produkt bol odfiltrovaný cez fritu hrubosti S3. Následne bol produkt rozpustený v chloroforme (cca 100 ml) a roztok bol dôkladne premytý destilovanou vodou (5 × 20 ml, odstraňovanie DMA). Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným (cca 2 g), prefiltrovaná od soli na frite hrubosti S3 a číry filtrát bol zahustený na rotačnej vákuovej odparke.

Produkt, hydrobromid *t*Bu<sub>3</sub>DO3A, bol z hustého nažltnutého oleja vyzrážaný v podobe bieleho ľahkého prášku prídavkom Et<sub>2</sub>O (zrážanie trvalo pár minút). Biela látka bola oddelená od kvapaliny na frite hrubosti S3 a sušená voľne na vzduchu.

Výtťažok reakcie bol 76 %; 13,10 g (22,0 mmol).

#### Charakterizácia

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, ref. TMS): 1,46 (s; 27H; *t*Bu–O–C); 2,89 (s; 4H; makrocyklus); 2,92 (m; 8H; makrocyklus); 3,10 (m; 4H; makrocyklus); 3,30 (s; 2H; HOOC–CH<sub>2</sub>–N); 3,38 (s; 4H; HOOC–CH<sub>2</sub>–N)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, ref. CDCl<sub>3</sub>): 28,3; 28,3; 47,7; 48,8; 49,3; 51,3; 51,5; 58,3; 81,8; 169,8; 170,6

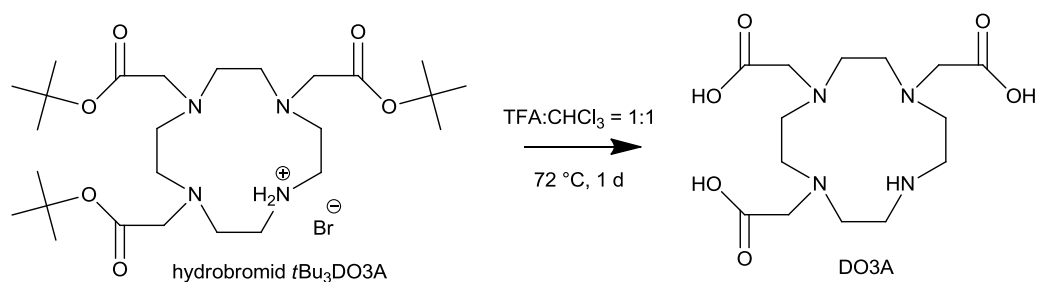
**MS(+)**: 515,6 ([M–Br]<sup>+</sup>; teor. 515,4)

**TLC**: *R*<sub>f</sub>(denat. EtOH) = 0,74

<sup>3</sup> 16,50 g trihydrátu octanu sodného bolo sušených v sušiarňi pri 120 °C po dobu 1 hodiny



### 3.1.2 1,4,7-tris(karboxymethyl)cyklen – DO3A



V banke boli 2,00 g (3,36 mmol) hydrobromidu *t*Bu<sub>3</sub>DO3A rozpustené v 30,0 ml roztoku TFA:CHCl<sub>3</sub> = 1:1. Pod spätným chladičom zakončeným sušiacou trubicou naplnenou CaCl<sub>2</sub> bola reakčná zmes zahrievaná k varu (72 °C v olejovom kúpeli).

Po 24 hodinách bol roztok odparený na rotačnej vákuovej odparke a odparok po rozpustení v minime azeotropického roztoku HCl bol odparený znova. Získaný produkt so zvyškami vodného roztoku HCl (cca 1,5 g) bol použitý v reakciách typu Moedritzer–Irani (oddiel 3.3.1).

#### Charakterizácia

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, ref. *t*BuOH): 2,82-3,00-3,07-3,18-3,26-3,52 (6 bs; 16H; makrocyklus); 3,58 (m; 4H; HOOC-CH<sub>2</sub>-N); 4,22 (s; 2H; HOOC-CH<sub>2</sub>-N); 8,78 (bs; 1H; N-H)

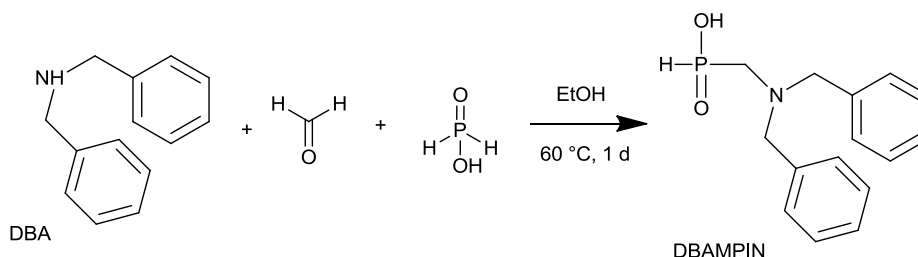
**<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O, ref. *t*BuOH): 44,4; 49,7; 51,3; 54,2; 55,2; 56,4; 170,2; 176,3

**MS(+)**: 347,8 ([M+H]<sup>+</sup>; teor. 347,2)

**MS(-)**: 345,5 ([M-H]<sup>-</sup>; teor. 345,2)

**TLC**: *R*<sub>f</sub>(denat. EtOH) = 0,05 (modrá škvrna); *R*<sub>f</sub>(NH<sub>3</sub>:denat. EtOH = 1:5) = 0,13 (modrá škvrna); *R*<sub>f</sub>(THIPAC = 1:2:5) = 0,00 (modrá škvrna)

### 3.1.3 (*N,N*-Dibenzylamino)methylfosfínová kyselina – DBAMPIN



Postup bol zreprodukovaný podľa návodu v literatúre – (51).

15,0 g (75,9 mmol) dibenzylamínu (DBA) v banke bolo zriedených cca 70 ml denat. EtOH. K žltému roztoku bolo pridaných 4,56 g (152,1 mmol; 2 ekv.) paraformaldehydu a heterogénny roztok sa miešal v uzatvorenej banke zahrievanej olejovým kúpeľom na 60 °C. Po vyhriatí reakčnej zmesi bolo k nej rýchlo pridaných 30,0 g (228 mmol; 3 ekv.) studeného 50% vodného roztoku fosforenej kyseliny a takmer plná uzatvorená banka sa miešala ponorená v olejovom kúpeli nastavenom na vyhrievanie na 60 °C počas 24 hodín.

Nasledovne bola zmes nanesená na cca 500 ml silného kationového meniča v H<sup>+</sup> cykle a kolóna bola premývaná destilovanou vodou do neutrality. Látka bola eluovaná roztokom 1:1 = denat. EtOH : konc. roztoku amoniaku (25% vodný roztok). Svietivo žltý roztok bol zahustený na rotačnej vákuovej odparke (max 50 °C pri odparovaní v kúpeli). Odparok bol kvantitatívne prenesený na cca 500 ml silného aniónového meniča v acetátovom cykle. Kolóna bola premývaná destilovanou vodou do eluovania zakaleného roztoku. Následne bol produkt z kolóny vymytý 10% roztokom kyseliny octovej. Eluát s produktom bol odparený na rotačnej vákuovej odparke pri teplote kúpeľa 45 °C.

Olej bol kvantitatívne preliaty do pripravenej nádoby, v ktorom stuhol na bieložltú pevnú hmotu. Produkt bol mechanicky rozdrvený a sušený v evakuovanom exsikátore nad jemným práškovým KOH. Po odstránení kyseliny octovej bol prášok rozpustený v minime acetónu za tepla, z ktorého sa vyžrážal po ochladení.

Výtťažok reakcie bol 83 %; 18,35 g (66,7 mmol).

#### Charakterizácia

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, ref. H<sub>2</sub>O): 3,16 (d; <sup>2</sup>J<sub>HP</sub> = 6,00 Hz; 2H; P-CH<sub>2</sub>-N); 4,48 (s; 4H; N-CH<sub>2</sub>-Ph); 7,49 (m; 10H; Ph)

**<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O, ref. δ(AcOH) = 20,32): 50,9 (d; <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 41,1 Hz; P-CH<sub>2</sub>-N); 59,07 (N-CH<sub>2</sub>-Ph); 128,71 (Ph); 129,32 (Ph); 130,27 (Ph); 131,28 (Ph)

**<sup>31</sup>P-NMR** (D<sub>2</sub>O, ref. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>): 10,18 (dt; <sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 554 Hz; <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 10,93 Hz)

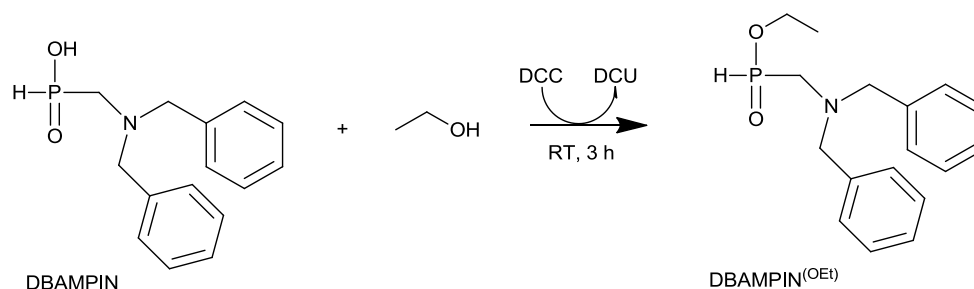
**MS(+)**: 298,6 ([M+Na]<sup>+</sup>; teor. 298,1); 314,6 ([M+K]<sup>+</sup>; teor. 314,1); 573,7 ([2M+Na]<sup>+</sup>; teor. 573,2)

**MS(-)**: 274,3 ([M-H]<sup>-</sup>; teor. 274,1); 549,3 ([2M-H]<sup>-</sup>; teor. 549,2)

**TLC**: R<sub>f</sub>(denat. EtOH) = 0,48; R<sub>f</sub>(NH<sub>3</sub>:denat. EtOH = 1:5) = 0,84;

R<sub>f</sub>(THIPAC = 1:2:5) = 0,07

### 3.1.4 Ethylester (*N,N*-dibenzylamino)methylfosfínovej kyseliny – DBAMPIN(OEt)



5,00 g (18,2 mmol) DBAMPIN s 4,12 g (20,0 mmol; 1,1 ekv.) DCC bolo rozpustené v cca 50 ml abs. EtOH a miešané 3 hodiny na magnetickej miešačke pri laboratórnej teplote.

Následne bola zmes prefiltrovaná cez filtračný papier od vylúčenej DCU a číry filtrát bol odparený na rotačnej vákuovej odparke pri teplote kúpeľa 50 °C.

Získaný olej bol rozpustený v rozpúšťadle použitom v ďalšom reakčnom kroku (vid' reakcie typu Kabachnik-Fields, oddiel 3.3.2 s 3.3.3) a prefiltrovaný cez filtračný papier od ďalšieho množstva vyzrážanej DCU rovno do reakčnej nádoby.

Výtťažok bol stanovený z <sup>31</sup>P-NMR a bol kvantitatívny.

#### Vlastnosti

Látka sa pomaly hydrolyzuje vodou na DBAMPIN, v bázickom prostredí rýchlo. Pri zvýšenej teplote (začína už pri 50 °C) sa pomaly oxiduje väzba P–H.

#### Charakterizácia

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, ref. *t*BuOH): 1,31 (t; <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,00 Hz; 3H; O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>); 2,90 (d; <sup>2</sup>J<sub>HP</sub> = 9,00 Hz; 2H; P–CH<sub>2</sub>–N); 3,76 (q; J = 15,0 Hz; 4H; N–CH<sub>2</sub>–Ph); 3,96 (m; 2H; O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>); 7,32 (m; 10H; Ph)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, ref. *t*BuOH): 15,5 (O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>); 50,4 (d; <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 56,9 Hz; P–CH<sub>2</sub>–N); 59,0 (N–CH<sub>2</sub>–Ph); 61,6 (O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>); 126,6 (Ph); 127,6 (Ph); 128,1 (Ph); 137,4 (Ph)

**<sup>31</sup>P-NMR** (DMF, ref. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>): 34,18 (dp; <sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 540 Hz; <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 8,50 Hz)

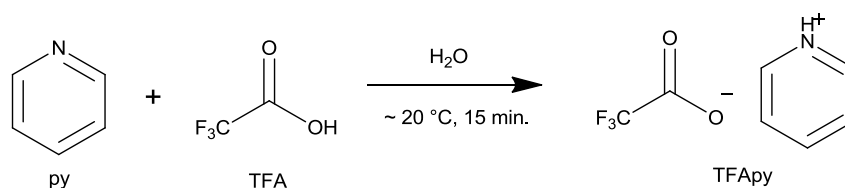
**MS(+)**: 326,7 ([M+Na]<sup>+</sup>; teor. 326,1)

**MS(–)**: 274,3 ([M–Et]<sup>–</sup>; teor. 274,1)

**TLC**: R<sub>f</sub>(denat. EtOH) = 0,68 (hydrofóbna škvRNA);

R<sub>f</sub>(NH<sub>3</sub>:denat. EtOH = 1:5) = 0,91; R<sub>f</sub>(THIPAC = 1:2:5) = 0,80 (hydrofóbna škvRNA)

### 3.2 Trifluoroacetát pyridínia – TFAPy



V zábrusovej banke bol vytvorený 30% vodný roztok z 0,7 ml (0,7 g; 8,7 mmol) pyridínu. Za chladienia studenou vodou a miešania bol po častiach k roztoku pridaný 30% vodný roztok pripravený z 0,6 ml (0,9 g; 7,8 mmol; 0,9 ekv.) TFA.

Po 15 minútach miešania boli prebytočné rozpúšťadlá odparené na rotačnej vákuovej odparke a odparok ostal v podobe hustého bezfarebného oleja. Soľ TFAPy vykryštalizovala z oleja po schladení.

Výtťažok reakcie nebol stanovovaný.

#### Vlastnosti

Soľ je rozpustná v nevodných polárnych rozpúšťadlách, akými sú Et<sub>2</sub>O a DMF.

#### Charakterizácia

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, ref. *t*BuOH): 8,09 (t; <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,00 Hz; 3H); 8,64 (m, 2H); 8,79 (m; 3H)

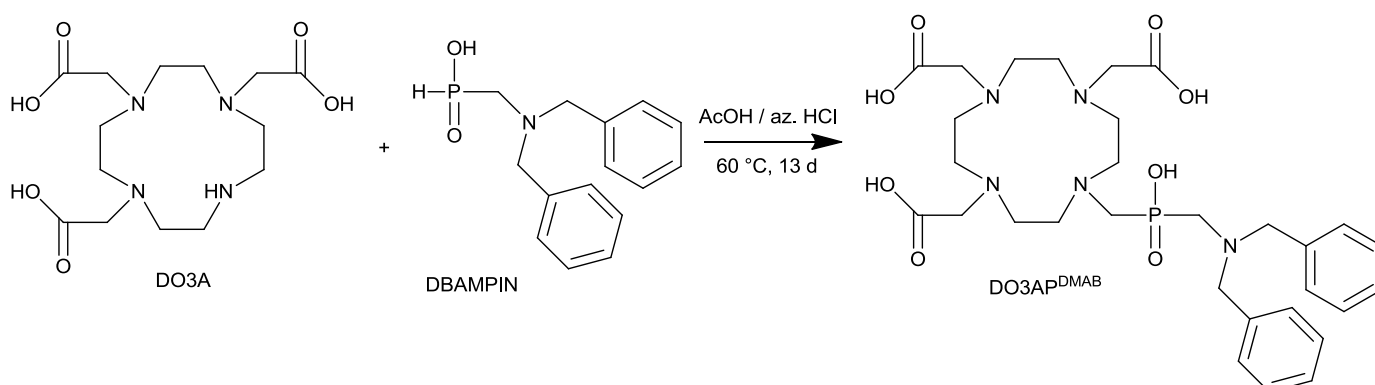
**<sup>19</sup>F-NMR** (D<sub>2</sub>O, ref. TFA): -79,56 (s)

**MS(+)**: 80,5 ([py+H]<sup>+</sup>; teor. 80,1)

**MS(-)**: 69,3 ([CF<sub>3</sub>]<sup>-</sup>; teor. 69,0); 113,0 ([TFA-H]<sup>-</sup>; teor. 113,0)

### 3.3 Reakcie Mannichového typu

#### 3.3.1 Vodná cesta – typ Moedritzer-Irani

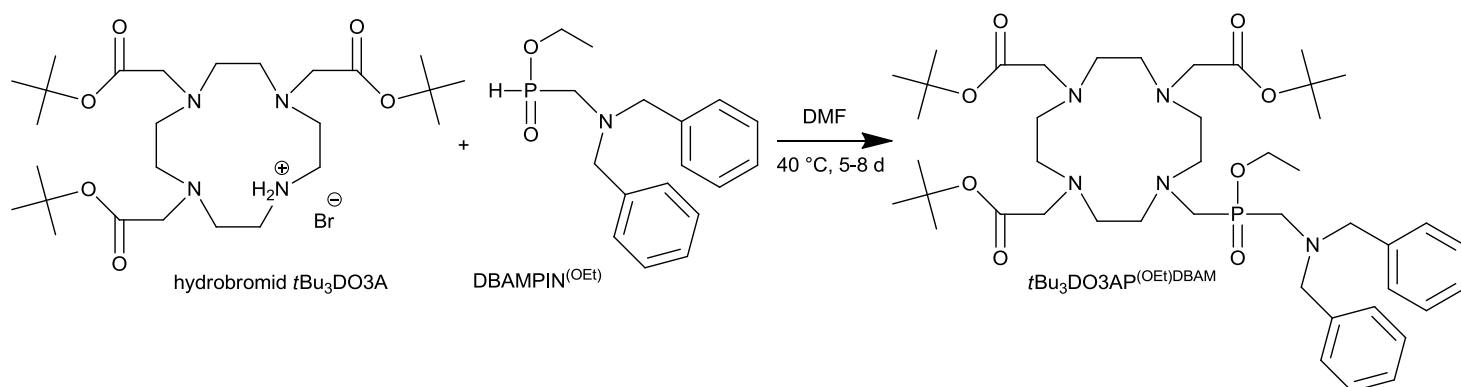


1,00 g ( $2 \times 1,45$  mmol) DO3A (vyrobená v oddieli 3.1.2) bol použitý do dvoch reakčných zmesí: prvá polovica bola rozpustená v 30,0 ml azeotropickej HCl a druhá v 30,0 ml kyseliny octovej. K obom roztokom bolo pridaných 0,60 g DBAMPIN (2,18 mmol; 1,5 ekv.) a 0,13 g CH<sub>2</sub>O (4,33 mmol; 3 ekv.). Reakčné nádoby boli uzatvorené a miešané v olejovom kúpeli zahrievanom na 65 °C. Obdeň bolo do reakčných zmesí pridávaných 0,04 g CH<sub>2</sub>O (1,44 mmol; 1 ekv.) a po 13 dňoch bola konverzia reaktantov po kvalitatívnej stránke zistená s MS a po kvantitatívnej z intenzít signálov <sup>31</sup>P-NMR (pre nízke pH reakčná zmes v azeotropickej HCl nemala viditeľné signály v spektre).

Obe reakčné zmesi boli odparené na rotačnej vákuovej odparke a nanesené na 100 ml silného kationového meniča v H<sup>+</sup> cykle. Po premytí kolóny destilovanou vodou boli látky eluované 5% vodným roztokom NH<sub>3</sub>. Po zahustení eluátov a odparení amoniaku na rotačnej vákuovej odparke boli reakčné zmesi aplikované na slabý kationový menič (cca 200 ml).

Po aplikovaní rôznych gradientov ethanolických roztokov kyseliny octovej a vodných kyseliny chlorovodíkovej bola chromatografia neefektívna v izolovaní produktu a tým neúspešná (prítomnosť produktu bola detegovaná pomocou <sup>1</sup>H-NMR).

### 3.3.2 Nevodná cesta – typ Kabachnik-Fields – rozpúšťadlo DMF



V 50ml banke boli rozpustené 3,00 g (5,04 mmol) hydrobromidu  $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$  v minime suchého DMF (cca 10 ml) a k suspenzii bol pridaný  $\text{DBAMPIN}^{\text{OEt}}$  (viď oddiel 3.1.4) vyrobený z 1,38 g (5,01 mmol; 1 ekv.) DBAMPIN. K zmesi bolo pridaných 2,27 g (75,59 mmol; 15 ekv.)  $\text{CH}_2\text{O}$  a banka bola doplnená so suchým DMF až takmer úplne po zábrus (cca 45 ml). Po jej uzavretí zátkou a oblepení parafilmom bola suspenzia mechanicky premiešaná. Reakčná zmes bola miešaná pri teplote olejového kúpeľa 40 °C čo najviac ponorená (ideálne po zábrus). Reakcia trvala 5–7 dní (závislé na ponorení banky v olejovom kúpeli a na „hustote“ reakčnej zmesi). Konverzia reaktantov bola sledovaná s TLC a  $^{31}\text{P}$ -NMR do vymiznutia P–H väzby.

Reakčná zmes bola prefiltrovaná cez filtračný papier od  $\text{CH}_2\text{O}$  a DCU a DMF bol odparený pomocou olejovej vývevy s vymrazovačkou chladenou tekutým dusíkom. Získaný olej bol rozpustený v 30,0 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  s malým prídavkom (cca 5 %) hexánu. Po voľnom odparení časti  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sa z oleja vyzrážali nečistoty (nezreagovaný  $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$  a  $\text{CH}_2\text{O}$ ). Suspenzia bola opatrne prefiltrovaná cez fritu hrubosti S4 a filtrát bol odparený na rotačnej vákuovej odparke.

Výtťažok reakcie bol stanovovaný len z  $^{31}\text{P}$ -NMR spektier (cca 100 %).

#### Charakterizácia

**$^1\text{H}$ -NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , ref. TMS): 1,21 (t;  $^3J_{\text{HH}} = 6,00$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--O}$ ); 1,38 (s; 27H;  $t\text{Bu--O--C}$ ); 2,72 (d;  $^2J_{\text{HP}} = 6,00$  Hz; P– $\text{CH}_2\text{--N}_{\text{BN}}$ ); 2,80 (d;  $^2J_{\text{HP}} = 6,00$  Hz;  $\text{N}_{\text{CYK--CH}_2\text{--P}}$ ); 2,88 (bs; 4H; makrocyklus); 2,98 (bs; 4H; makrocyklus); 3,18 (bs; 8H; makrocyklus); 3,46 (s; 2H;  $\text{HOOC--CH}_2\text{--N}$ ); 3,66 (q;  $J = 15,0$  Hz; 4H;  $\text{N--CH}_2\text{--Ph}$ ); 3,82 (s; 4H;  $\text{HOOC--CH}_2\text{--N}$ ); 4,00 (m; 2H;  $\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--O}$ ); 7,25 (m; 10H; Ph)

**$^{31}\text{P}$ -NMR** (DMF, ref.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ): 48,37 (d;  $J = 6,07$  Hz)

**MS(+)**: 802,5 ( $[\text{M--Et}+2\text{H}]^+$ ; teor. 802,5); 824,4 ( $[\text{M--Et}+\text{H}+\text{Na}]^+$ ; teor. 824,5); 830,5 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; teor. 830,5); 852,5 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; teor. 852,5)

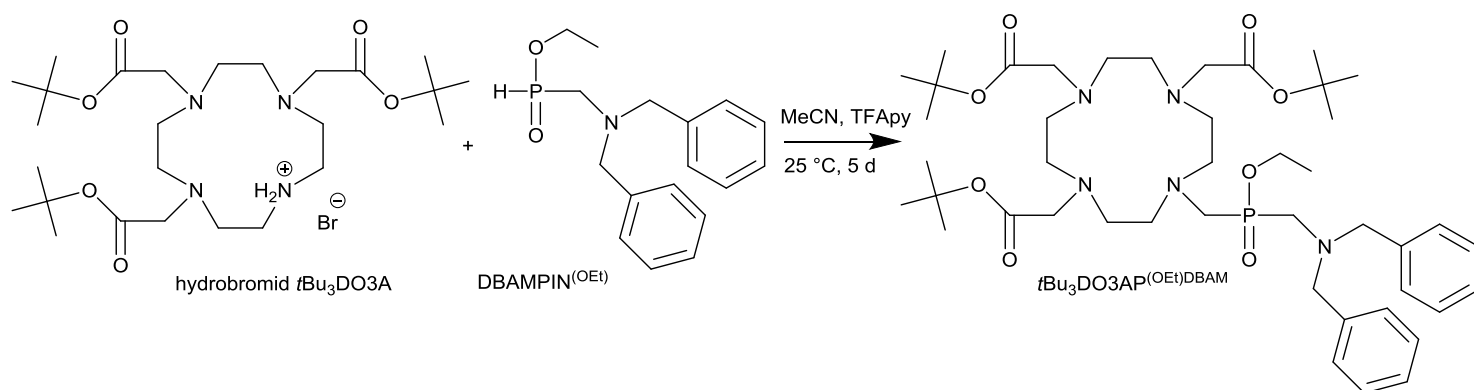
**MS(–)**: 800,2 ( $[\text{M--Et}]^-$ ; teor. 800,5)

**TLC**:  $R_f$ (denat. EtOH) = 0,77<sup>4</sup>;  $R_f$ ( $\text{NH}_3$ :denat. EtOH = 1:5) = 0,80;

$R_f$ (THIPAC = 1:2:5) = 0,56

<sup>4</sup> modrozelená škvrna pre pravdepodobný hydrobromid, modrá škvrna bez hydrobromidu; s nižším  $R_f$  (cca 0,6) je to konjugát s derivátom DBAMPIN alebo DBAMPON

### 3.3.3 Nevodná cesta – typ Kabachnik-Fields – rozpúšťadlo MeCN



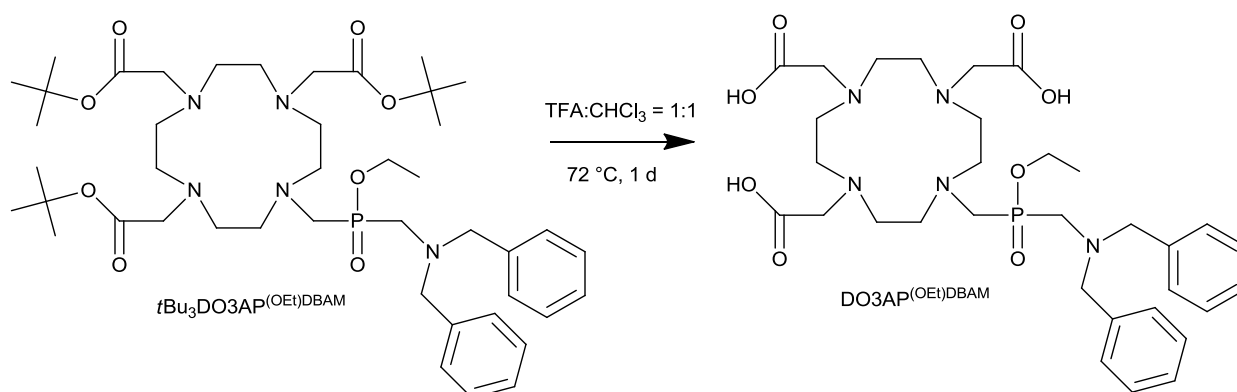
V 25ml banke bol rozpustený 1,00 g (1,68 mmol) hydrobromidu  $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$  v suchom MeCN a k číremu roztoku bol pridaný DBAMPIN<sup>OEt</sup> (viď oddiel 3.1.4) vyrobený z 0,51 g (1,85 mmol; 1,1 ekv.) DBAMPIN a 0,02 g (0,10 mmol; 0,1 ekv.) TFApy. K reakčnému roztoku bolo prisypaných 0,83 g (25,20 mmol; 15 ekv.)  $\text{CH}_2\text{O}$ . Banka bola doplnená suchým MeCN takmer po zábrus (celkovo 22 ml). Po jej uzatvorení a obalení zátky parafilmom bola mechanicky premiešaná, ponorená do olejového kúpeľa vyhriateho na 25 °C takmer po zábrus a miešaná v priebehu 7 dní. Konverzia reaktantov bola sledovaná s TLC a  $^{31}\text{P}$ -NMR do vymiznutia P–H väzby.

Poreakčná zmes bola prefiltrovaná cez filtračný papier od  $\text{CH}_2\text{O}$  a filtrát bol odparený na rotačnej vákuovej odparke. Odparok bol rozpustený v roztoku THIPAC = 1:2:5 a nanesený na kolónu s 200 ml silikagélu, ktorého mŕtvy objem (cca 50 ml) obsahoval THIPAC = 1:2:5. Po zachytení frakcií o celkovom objeme 75 ml bola kolóna premývaná s MeOH. Po ďalších 75 ml bol použitý roztok  $\text{NH}_3:\text{EtOH} = 1:5$ , po cca 50 ml bol obsah kolóny vymytý s  $\text{NH}_3:\text{EtOH} = 1:1$ . Frakcie boli odparené na rotačnej vákuovej odparke. Produkt podľa TLC (THIPAC = 1:2:5) obsahovali frakcie 80–110 ml.

Podľa  $^1\text{H}$ -NMR spektra získaného oleja produkt nebol dokonale čistý, ale  $^{31}\text{P}$ -NMR obsahoval len signál  $t\text{Bu}_3\text{DO3A}^{(\text{OEt})\text{DBAM}}$ . Ďalšie frakcie chromatografie obsahovali zmes fosfínových a fosfónových derivátov s  $t\text{Bu}_3\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$  (bol hydrolyzovaný ethylester molekuly  $t\text{Bu}_3\text{DO3A}^{(\text{OEt})\text{DBAM}}$ ).

## 3.4 Hydrolýza esterov

### 3.4.1 Postupná hydrolýza



Izolovaný prečistený olej po reakcii Mannichového typu (vyrobený zo 4,00 g hydrobromidu  $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ ) bol rozpustený v 40 ml roztoku  $\text{TFA}:\text{CHCl}_3 = 1:1$  a bol miešaný a zahrievaný k varu ( $72^\circ\text{C}$  v olejovom kúpeli) v priebehu 24 hodín. Roztok bol chladený spätným chladičom ukončeným sušiacou trubicou naplnenou s  $\text{CaCl}_2$ . Priebeh reakcie sa dal kontrolovať TLC (mobilná fáza denat. EtOH) alebo s MS.

Poreakčná zmes bola odparená na rotačnej vákuovej odparke a po rozpustení odparku v malom množstve (cca 10 ml) azotropickej HCl bola znova odparená. Banka s odparkom bola použitá v ďalšom kroku hydrolýzy.

#### Vlastnosti

Látka je slabo rozpustná v  $i\text{PrOH}$  a  $\text{Me}_2\text{CO}$ , za tepla dobre. Ethylester na molekule sa bázicky hydrolyzuje ťažko.

#### Charakterizácia

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , ref.  $\text{H}_2\text{O}$ ): 1,27 (t;  $^3J_{\text{HH}} = 6,00$  Hz; 3H;  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$ ); 3,02 (d;  $^2J_{\text{HP}} = 6,00$  Hz; 2H;  $\text{N}_{\text{cyk}}\text{-CH}_2\text{-P}$ ); 3,11 (d;  $^2J_{\text{HP}} = 6,00$  Hz; 2H;  $\text{P-CH}_2\text{-N}_{\text{Bn}}$ ); 3,14 (bs; 4H; makrocyklus); 3,33 (s; 4H; makrocyklus); 3,40 (bs; 8H; makrocyklus); 3,72 (s; 4H;  $\text{N-CH}_2\text{-Ph}$ ); 3,79 (m; 4H;  $\text{HOOC-CH}_2\text{-N}$ ); 3,84 (s; 2H;  $\text{HOOC-CH}_2\text{-N}$ ); 4,09 (m; 2H;  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$ ); 7,42 (m; 10H; Ph)

**$^{31}\text{P-NMR}$**  ( $\text{H}_2\text{O}$ , ref.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ): 53,35 (s)

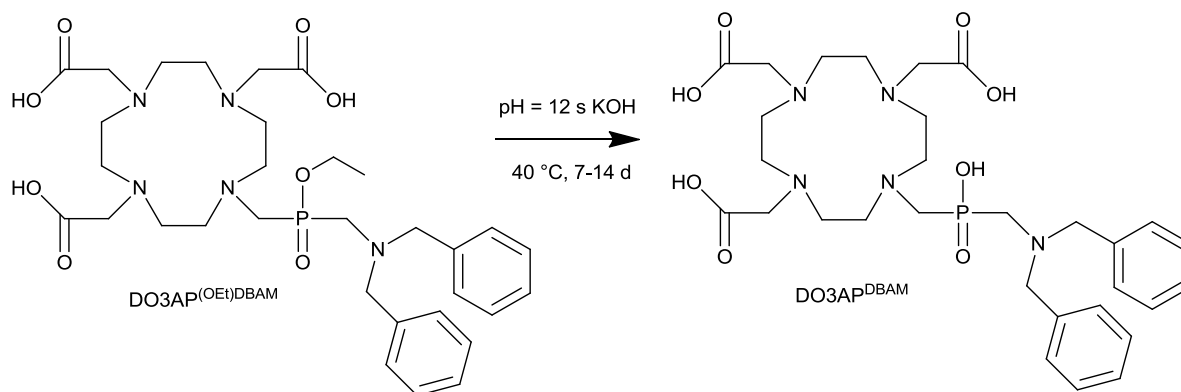
**$^{31}\text{P-NMR}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , ref.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ): 54,53 (s)

**MS(+)**: 656,3 ( $[\text{M-Et+H+Na}]^+$ ; teor. 656,3); 684,3 ( $[\text{M+Na}]^+$ ; teor. 684,3); 700,9 ( $[\text{M+K}]^+$ ; teor. 700,3); 738,9 ( $[\text{M-H+2K}]^+$ ; teor. 739,3)

**MS(-)**: 670,7 ( $[\text{M-Et-H+K}]^-$ ; teor. 670,2); 698,7 ( $[\text{M-2H+K}]^-$ ; teor. 698,3);

**TLC**:  $R_f$ (denat. EtOH) = 0,00–0,06 (modrá);  $R_f$ ( $\text{NH}_3$ :denat. EtOH = 1:5) = 0,50–0,66





Olej z predchádzajúcej hydrolýzy *t*Bu-esterov bol rozpustený v 150 ml destilovanej vody a k roztoku bol pridaný KOH tak, aby pH roztoku bolo približne 12. Reakčná zmes bola miešaná a zahrievaná olejovým kúpeľom vyhriatym na 40 °C. Reakčná doba bola 14 dni. Priebeh reakcie sa dal kontrolovať s TLC ( $\text{NH}_3:\text{EtOH} = 1:5$ ), s MS a  $^{31}\text{P}$ -NMR.

Doreagovaná zmes bola nanosená na silný kationový menič v  $\text{H}^+$  cykle (200 ml). Kolóna bola premývaná destilovanou vodou do neutrality, cca 2 objemami kolóny s denat. EtOH, destilovanou vodou k vyplaveniu EtOH a produkt bol eluovaný s 10% vodným roztokom pyridínu (kolóna následne musela byť premývaná s  $\text{NH}_3:\text{EtOH} = 1:1$  pre vyplavenie uchytených reziduií). Eluát bol odparený na rotačnej vákovej odparke a čiastočne rozpustený vo vriacom abs. EtOH (cca 250 ml). Produkt sa z roztoku vyzrážal po ochladení a bol odfiltrovaný pomocou frity hrubosti S4 a sušený voľne na vzduchu.

Kryštál vhodný na RTG meranie bol získaný rozpustením 11,2 mg produktu v minime destilovanej vody, upravením pH prídavkom cca 1% vodného roztoku HCl na hodnotu 4 a pomalým difundovaním suchého THF cez plynnú fázu do roztoku kryštalizovanej látky.

Výtťažok reakcií bol 69 %; 2,94 g (4,64 mmol) vzhľadom k *t*Bu<sub>3</sub>DO3AP(OEt)DBAM.

### Vlastnosti

Látka je relatívne rozpustná za tepla vo väčšine polárnych rozpúšťadiel so stopami vody.

## Charakterizácia

**<sup>1</sup>H-NMR** (H<sub>2</sub>O; ref. *t*BuOH; pH<sup>5</sup> = 3,12): 3,03 (d; <sup>2</sup>J<sub>HP</sub> = 9,00 Hz; 2H; N<sub>cyk</sub>-CH<sub>2</sub>-P); 3,10 (s; 4H; *makrocyklus*); 3,35 (bs; 4H; *makrocyklus*); 3,39 (s; 4H; *makrocyklus*); 3,46 (d; <sup>2</sup>J<sub>HP</sub> = 9,00 Hz; 2H; P-CH<sub>2</sub>-N<sub>Bn</sub>); 3,50 (s; 2H; HOOC-CH<sub>2</sub>-N); 3,58 (s; 4H; *makrocyklus*); 3,91 (m; *J* = 15,0 Hz; *J* = 18,0 Hz; 4H; HOOC-CH<sub>2</sub>-N); 4,45 (s; 4H; N-CH<sub>2</sub>-Ph); 7,52 (m; 10H; *Ph*)

**<sup>13</sup>C-NMR** (H<sub>2</sub>O; ref. *t*BuOH; pH = 3,12): 49,8; 50,5; 51,2; 51,8; 56,6; 57,5; 59,4; 129,3; 129,6; 131,1; 172,6; 176,7 (chýbajúce 3 signály neboli rozlíšené, dublety signálov N<sub>cyk</sub>-CH<sub>2</sub>-P a P-CH<sub>2</sub>-N<sub>Bn</sub> taktiež)

**<sup>31</sup>P-NMR** (H<sub>2</sub>O; ref. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; pH<sup>6</sup> = 3,34): 25,04 (s)

**MS(+)**: 672,2 ([M+K]<sup>+</sup>; teor. 672,3); 694,2 ([M-H+Na+K]<sup>+</sup>; teor. 694,2); 710,2 ([M-H+2K]<sup>+</sup>; teor. 710,2); 732,2 ([M-2H+Na+2K]<sup>+</sup>; teor. 732,2);

**MS(-)**: 670,0 ([M-2H+K]<sup>-</sup>; teor. 670,2); 708,0 ([M-3H+2K]<sup>-</sup>; teor. 708,2); 730,0 ([M-4H+Na+2K]<sup>-</sup>; teor. 730,2)

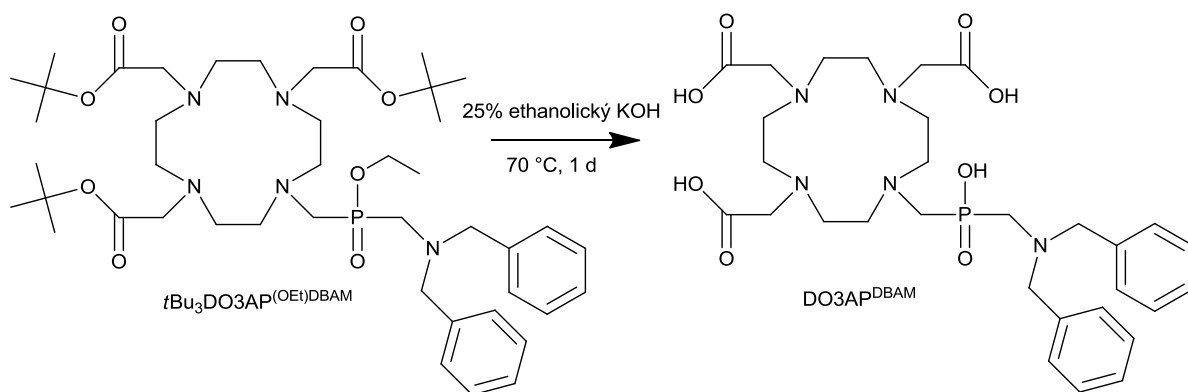
**TLC**: R<sub>f</sub>(NH<sub>3</sub>:denat. EtOH = 1:5) = 0,32 (modrastá škvrna); R<sub>f</sub>(IPAV = 7:3:3) = 0,68 (modrá škvrna)

**Elementárna analýza**: DO3AP<sup>DBAM</sup> · 3 H<sub>2</sub>O = C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>P – nájdené (*vypočítané*):  
C 52,10 % (52,39 %), H 7,16 % (7,33 %); N 10,19 % (10,18 %)

<sup>5</sup> Pre posuny v iných hodnotách pH pozri NMR titráciu (oddiel 5.2.1)

<sup>6</sup> Pre posuny v iných hodnotách pH pozri NMR titráciu (oddiel 5.2.1)

### 3.4.2 Celková hydrolýza

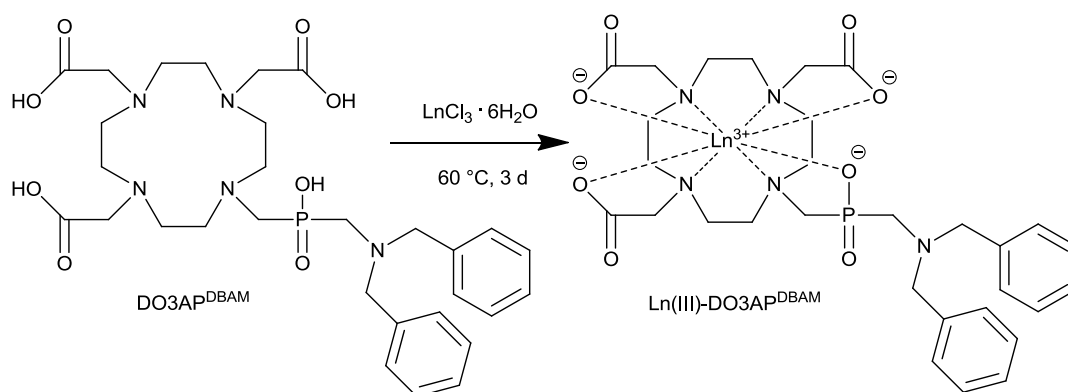


1,26g (1,52 mmol) olejovitej látky  $t\text{Bu}_3\text{DO3AP}^{(\text{OEt})}\text{DBAM}$  bolo rozpustených vo vodnom denat. EtOH (cca 75%; 4 ml) a bol pridaný pevný KOH tak, aby vznikol asi 25% roztok hydroxidu. Reakčná zmes bola miešaná a zahrievaná olejovým kúpeľom vyhriatym na 70 °C počas 24 hodín.

Roztok po reakcii bol nanesený na silný kationový menič v  $\text{H}^+$  cykle. Kolóna bola premývaná v destilovanej vode do neutrality, cca 2 objemami kolóny denat. EtOH a destilovanou vodou k vymytiu zvyškov EtOH. Produkt bol následne eluovaný z kolóny 10% roztokom pyridínu a odparený na rotačnej vákuovej odparke. Po získaní produktu bola kolóna zbavená uchytených reziduí roztokom  $\text{NH}_3:\text{EtOH} = 1:1$ .

Odparok bol rozpustený v minime destilovanej vody a prídavkom suchého THF sa z roztoku vyzrážal produkt, ktorý bol odfiltrovaný pomocou frity hrubosti S4. Následne bol sušený voľne na vzduchu. Podľa TLC a  $^1\text{H-NMR}$  obsahovala látka množstvo rôznych nečistôt v nízkej koncentrácii.

### 3.5 Príprava komplexov



Vo vialkách a banke (pre Gd(III)) boli vytvorené vodné roztoky podľa *Tabuľky 10*.

*Tabuľka 10:*

<b>Vytvorenie Ln(III) komplexov DO3AP<sup>DBAM</sup></b>			
Lanthanoid Ln	$m(\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}) / \text{mg}$	$m(\text{LnCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}) / \text{mg}$	$n / \text{mmol}$
Eu	100,0	57,8	0,16
Tb	100,0	58,9	0,16
Yb	50,0	35,0	0,08
Gd	500,0	293,4	0,790

Ku každej vialke a k banke bola pridaná kvapka indikátoru brómkrezolovej zelene, rozpúšťadlom bola destilovaná voda. Klesajúce pH bolo merané pH metrom a bolo udržiavané v rozpätí 5–5,5 jednotiek prídavkami 5% vodného roztoku LiOH. Po ustálení na relatívne konštantnú hodnotu (rádovo desiatky minút) boli vialky miešané a zahrievané olejovým kúpeľom vyhrievanom na 60 °C počas 3 dní.

Následne boli roztoky odparené<sup>7</sup> na rotačnej vákuovej odparke, rozpustené v minime roztoku IPA V = 10:1:2 a nanosené na kolónu s Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (200 ml). Boli zachytávané nasledovné frakcie: 2 × 40 ml a 15 × 10 ml. Frakcie boli odparené a podľa TLC (IPA V = 10:1:2, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) komplex obsahovali frakcie 9. až 12., ktoré boli zmyté do jednej banky a odparené na rotačnej vákuovej odparke do formy suchého popraskaného oleja.

Výtťažok reakcie pre Eu(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> bol 57 %; 70 mg (89 μmol).

Výtťažok reakcie pre Tb(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> bol 48 %; 60 mg (76 μmol).

Výtťažok reakcie pre Yb(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> bol 25 %; 16 mg (20 μmol).

Výtťažok reakcie pre Gd(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> bol 80 %; 550 mg (700 μmol).

<sup>7</sup> Roztoky museli byť prenesené do veľkých baniek (250 ml), pretože enormne penili pri odparovaní.

## Charakterizácia

M je  $[\text{Ln}(\text{Hdo3ap}^{\text{DBAM}})]$ , pričom  $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{DBAM}}$  je  $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$ .

Eu(III)- $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; ref.  $t\text{BuOH}$ ; pH = 8,08): -12,68; -10,11; -9,95; -7,86; -6,37; -5,96; -5,65; -4,81; -4,50; -4,06; -3,65; -3,39; -2,33; -1,63; -0,48; -0,04; 0,80; 2,73; 3,15; 3,41; 3,68; 4,77; 5,29; 7,83; 8,43; 11,40; 15,08; 20,69; 25,85

**$^{31}\text{P-NMR}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; ref.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; pH = 8,08): 75,37 (s); 87,52 (bs)

**MS(+)**: 806,8 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; teor. 806,2); 828,8 ( $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$ ; teor. 828,2)

**MS(-)**: 782,7 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ; teor. 782,2)

**TLC**:  $R_f(\text{IPAV} = 10:1:2, \text{Al}_2\text{O}_3) = 0,33$  (žltá škvrna)

Tb(III)- $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; ref.  $t\text{BuOH}$ ; pH = 8,18): -137,74; -122,80; -83,72; -77,65; -71,08; -60,40; -40,87; -24,94; -18,05; -10,00; -2,44; 11,13; 19,94; 21,98; 22,24; 23,10; 24,26; 25,95; 26,75; 27,46; 28,26; 28,90; 29,74; 30,01; 40,11; 44,13; 46,15; 47,95; 49,00; 55,10; 57,57; 139,07; 146,95; 161,90; 188,97

**$^{31}\text{P-NMR}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; ref.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; pH = 8,18): 477,32 (bs)

**MS(+)**: 790,8 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; teor. 790,2); 834,8 ( $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$ ; teor. 834,2)

**MS(-)**: 788,7 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ; teor. 788,2)

**TLC**:  $R_f(\text{IPAV} = 10:1:2, \text{Al}_2\text{O}_3) = 0,36$  (žltá škvrna)

Yb(III)- $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; ref.  $t\text{BuOH}$ ; pH = 8,72): -59,99; -53,57; -50,49; -48,62; -37,00; -32,71; -28,92; -28,56; -16,01; -11,15; -4,52; -0,43; 1,88; 2,33; 3,34; 5,00; 5,42; 5,94; 7,51; 21,86; 26,12; 41,28; 44,77; 45,34; 68,76; 92,55; 118,92

**$^{31}\text{P-NMR}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; ref.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; pH = 8,72): -40,90 (s)

**MS(+)**: 804,9 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; teor. 805,2); 826,9 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; teor. 827,2); 848,9 ( $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$ ; teor. 849,2)

**MS(-)**: 802,7 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ; teor. 803,2)

**TLC**:  $R_f(\text{IPAV} = 10:1:2, \text{Al}_2\text{O}_3) = 0,36$  (žltá škvrna)

Gd(III)- $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{H}_2\text{O}$ , ref.  $t\text{BuOH}$ ): viditeľné len signály  $\text{H}_2\text{O}$  a  $t\text{BuOH}$

**MS(+)**: 833,4 ( $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$ ; teor. 833,2)

**MS(-)**: 787,2 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ; teor. 787,2)

**TLC**:  $R_f(\text{IPAV} = 10:1:2, \text{Al}_2\text{O}_3) = 0,33$  (žltá škvrna)

## 4. Charakterizácie výsledných produktov

### 4.1 NMR titrácie

Komplexy DO3AP<sup>DBAM</sup> s Eu(III), Tb(III) a Yb(III) (pripravené v oddieli 3.5) a 21,0 mg DO3AP<sup>DBAM</sup> boli rozpustené v minime destilovanej vody (cca 0,6 ml) a prenesené do dvojíc NMR kyviet. Jednej bolo pH menené cca 1% roztokom HCl do kyslej oblasti, druhej 0,75% roztokom LiOH do bázičkej oblasti (pre komplexy rozsah pH 2 až 10, pre DO3AP<sup>DBAM</sup> 1–12,5). Roztoky meniace pH boli pridávané 10 $\mu$ l sklenenou injekčnou striekačkou značky Hamilton. pH bolo menené o 0,2–0,5 jednotky a po každej úprave pH boli zmerané <sup>1</sup>H-NMR a <sup>31</sup>P-NMR spektrá.

Z chemických posunov signálov DO3AP<sup>DBAM</sup> v závislosti na pH bol zostrojený *Graf 1* (<sup>1</sup>H-NMR) a *Graf 2* (<sup>31</sup>P-NMR) a z neho boli vypočítané disociačné konštanty skupín. Obdobne boli spracované <sup>31</sup>P-NMR spektrá DO3AP<sup>DBAM</sup> a komplexov (*Graf 3–5*).

Z intenzít paramagnetických posunov signálov komplexov Eu(III) a Yb(III) a intenzít <sup>31</sup>P-NMR signálov komplexu Eu(III) bolo vypočítané zastúpenie izomérov SA a TSA v závislosti na pH (*Tabuľka 18*).

### 4.2 Luminiscencie

Komplexy DO3AP<sup>DBAM</sup> s Eu(III) a Tb(III), pripravené z navážky DO3AP<sup>DBAM</sup> (t.j. L) rovnej 2  $\times$  112,2 mg, boli odparené na rotačnej vákuovej odparke dosucha. Oba odparky boli rozpustené v 6,000 ml H<sub>2</sub>O. Z oboch roztokov komplexov bolo odobratých 2  $\times$  1,500 ml do malých vialiek, kde bolo pH upravené konc. HCl alebo pevným LiOH do kyslej, resp. bázičkej oblasti (pH(kys. [EuL]) = 3,15; pH(báz. [EuL]) = 8,23; pH(kys. [TbL]) = 3,56; pH(báz. [TbL]) = 8,55). Zvyšné 3,000 ml roztoky komplexov boli odparené na rotačnej vákuovej odparke. Následne boli rozpustené v minime D<sub>2</sub>O a znova boli odparené. Oba odparky boli rozpustené v 3,000 ml D<sub>2</sub>O a prenesené do malých vialiek, kde ich pH bolo upravené obdobne ako u predchádzajúcich vzoriek (pD(kys. [EuL]) = 3,71; pD(báz. [EuL]) = 8,33; pD(kys. [TbL]) = 4,30; pD(báz. [TbL]) = 8,69).

Pripravené roztoky boli zmerané na luminiscenčnom spektrometri. Po získaní vhodných exitačných a emisných vlnových dĺžok bola nameraná doba vyhasínania fluorescencie vzoriek. Meranie prebiehalo pri excitačnej vlnovej dĺžke 362 nm pre komplexy Eu a 379 nm pre komplexy Tb a pri emisnej vlnovej dĺžke 616 nm pre komplexy Eu a 544 nm pre komplexy Tb. Získané údaje boli preložené exponenciálov, čím bol získaný parameter doby vyhasínania  $T$ . Z neho bola vypočítaná rýchlostná konštanta depopulácie excitovaných stavov  $k$  a počet priamo koordinovaných vôd k lanthanoidu  $q$ .

### 4.3 Relaxačné časy $T_1$ Gd(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup>

Komplex DO3AP<sup>DBAM</sup> s Gd(III) bol rozpustený v 6,000 ml destilovanej vody. Z roztoku bolo odobratých 0,445 ml do NMR kyvety a k nemu bolo pridaných 5  $\mu$ l *t*BuOH. Bolo zmerané  $^1\text{H}$ -NMR spektrum s externou inzerťovou kyvetou naplnenou s D<sub>2</sub>O a *t*BuOH. Pomocou Evansovej metódy (BMS) bola zmeraná koncentrácia zásobného roztoku ( $c_Z = 51,9$  mM). Z neho bolo odobratých 0,394 ml a zriedených destilovanou vodou na objem 5,000 ml ( $c_R = 4,10$  mM). Z takto pripraveného zásobného roztoku boli pripravené vzorky pre všetky tri série meraní relaxačných časov  $T_1$  na relaxometroch. 5% vodný roztok BSA bol pripravený rozpustením 1,0530 g BSA v 20,0070 g destilovanej vody.

Prvá séria meraní – kombináciou roztokov zásobného a zriedeného, destilovanej vody a 5% vodného roztoku BSA podľa *Tabuľky 11* boli vytvorené vzorky, ktoré boli zmerané relaxometrami. Presná koncentrácia roztokov bola zistená metódou BMS.

*Tabuľka 11:*

<b>Prvá séria prípravy vzoriek</b>				
$c_{\text{BMS}} / \text{mM}$	$V(c_R = 4,10 \text{ mM}) / \mu\text{l}$	$V(c_Z = 51,9 \text{ mM}) / \mu\text{l}$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \mu\text{l}$	$V_{5\% \text{ BSA}} / \mu\text{l}$
0,05	15,25	–	234,75	1000
0,10	30,51	–	219,49	1000
0,15	45,76	–	204,24	1000
0,20	61,02	–	188,98	1000
0,40	122	–	128	1000
0,56	183	–	67	1000
0,78	250	–	0	1000
1,00	–	24,09	225,91	1000
2,08	–	48,17	201,83	1000
4,03	–	96	154	1000
7,81	–	192	58	1000

Druhá séria meraní – zriedený zásobný roztok  $c_R = 4,10$  mM bol nariedený päťkrát a bolo vytvorených 16 vialiek s 1,300 ml gadolinitého komplexu, ktorých pH bolo upravené cca 1% vodným roztokom HCl do kyslej oblasti a 5% vodným roztokom LiOH do bázičkej oblasti. pH každého roztoku (rozostupy medzi nimi bolo 0,3–0,7 jednotiek pH) vo vialke bolo zaznamenané a boli zmerané relaxometrami.

Tretia séria meraní – do 16 vialiek bolo pipetou daných 1,000 ml 5% vodného roztoku BSA a 0,250 ml zásobného roztoku gadolinitého komplexu. pH bolo upravené obdobne ako u „druhej série“, len namiesto 5% vodného roztoku LiOH bol použitý 5% vodný roztok NaOH. Všetky vzorky boli zmerané na relaxometroch a taktiež 4% vodný roztok BSA a použitá destilovaná voda pre získanie hodnoty ( $R_1$ )<sub>dia</sub>.

## 5. Komentár

### 5.1 Reakcia Mannichového typu – vodná cesta

Príprava DO3AP<sup>DBAM</sup> priamou syntézou reaktantov vo vodnom prostredí nebola efektívna. Cieleného produktu vznikalo malé množstvo (detegované pomocou <sup>31</sup>P-NMR) a primárne sa DBAMPIN oxidoval na DBAMPON alebo reagoval s formaldehydom na hydroxymethyl derivát DBAMPIN.

Nasledovné delenie na slabom kationovom meniči, Amberlite CG50, bolo komplikované v optimalizácii elučnej zmesi. DO3AP<sup>DBAM</sup> ako i vedľajšie produkty so skupinou dibenzylamínu hydrofóbne interagovali s nosičom a pre ich eluovanie bolo potrebné pomerne kyslé prostredie. Kyslosť vodného roztoku 20% AcOH nebola dostatočná. Následne boli použité roztoky zriedenej kyseliny octovej s denat. EtOH. Optimálny pomer bol AcOH:H<sub>2</sub>O:EtOH = 9:23:23 alebo 35% ethanolícky roztok kyseliny octovej. H<sup>+</sup> ióny z roztoku boli odstraňované nanosením eluátu na silný kationový menič v H<sup>+</sup> cykle.

Týmto postupom sa produkt nepodarilo úplne purifikovať. Pre pracný a neefektívny postup izolácie bola schéma „vodnej cesty“ vylúčená.

### 5.2 Reakcie Mannichového typu – nevodná cesta

Ďalším možným spôsobom prípravy DO3AP<sup>DBAM</sup> bolo ochránenie funkčných skupín východiskových reaktantov esterami a prevedenie reakcie v nevodných rozpúšťadlách. Steglichova esterifikácia DBAMPIN na DBAMPIN<sup>OEt</sup> pomocou DCC bola vždy kvantitatívna a z pôvodného pomeru DBAMPIN ku DCC rovnému 1:1,5 bol zmenený na výhodnejší – 1:1,1 – čím sa zamedzilo nadbytku DCU a prítomnosti reaktívnej molekuly DCC. Pre ťažšiu rozpustnosť DCU v niektorých použitých rozpúšťadlách bola čiastočne odstránená filtráciou pred reakciou Mannichového typu. Vlastná reakcia bola uskutočňovaná v bezvodom MeCN pri teplote olejového kúpeľa 60 °C a v pomere reaktantov: hydrobromidu *t*Bu<sub>3</sub>DO3A ku DO3AP<sup>DBAM</sup> ku CH<sub>2</sub>O rovnému 1:3:5.

Výťažky reakcie boli uspokojivé (konverzia hydrobromidu *t*Bu<sub>3</sub>DO3A sa blížila ku 100 % podľa <sup>31</sup>P-NMR). Aj pri kvantitatívnom priebehu reakcie vzhľadom ku *t*Bu<sub>3</sub>DO3A by v reakčnej zmesi ostali 2 ekvivalenty použitých fosforových derivátov. Pri vyššej teplote (60 °C a viac) bočnými reakciami DBAMPIN<sup>OEt</sup> vznikali molekuly DBAMPON<sup>OEt</sup> a DBAMPON, ktoré sa nepodarilo kvantitatívne odstrániť zo zmesi a sprevádzali *t*Bu<sub>3</sub>DO3AP<sup>(OEt)DBAM</sup> a jeho deesterifikované analógy. Počas spracovania poreakčnej zmesi nezreagovaný DBAMPIN<sup>OEt</sup> býval čiastočne oxidovaný na odolný DBAMPON<sup>OEt</sup>.



### 5.3 Odstraňovanie derivátov DBAMPIN

Purifikácia zmesi po hydrolyze esterov prítomných molekúl bola vykonaná na slabom kationovom meniči a na silikagéli. Po reakčná zmes bez esterov bola nanosená na slabý kationový menič v  $H^+$  cykle, Amberlite CG50, a boli skúšané rôzne elučné zmesi popísané v oddieli 5.1 s rovnakým výsledkom. Chromatografia na silikagéli s mobilnou fázou denat. EtOH s vodným roztokom amoniaku (zvyšujúci sa gradient 1:11  $\rightarrow$  1:5  $\rightarrow$  1:3 po určitom objeme) nebola dostatočne efektívna. Proces bol výrazne stratový na výťažku  $DO3AP^{DBAM}$  vďaka viacnásobnému opakovaniu.

Separovateľné boli molekuly pred hydrolyzovaním esterových skupín. Účinné bolo premývanie  $CH_2Cl_2$  roztoku poreakčnej zmesi destilovanou vodou, čím sa odstránil nezreagovaný DBAMPIN, ale nie  $DBAMPIN^{OEt}$ . Preto bolo pristúpené k hydrolyze  $DBAMPIN^{OEt}$  roztokom amoniaku s denat. EtOH v pomere 1:1. Priebeh bol kvantitatívny podľa  $^{31}P$ -NMR a u  $tBu_3DO3AP^{(OEt)DBAM}$  hydrolyza neprebíhala. Prítomný  $DBAMPON^{(OEt)}$  bol hydrolyzovateľný len v prítomnosti hydroxidu za zvýšenej teploty.  $DBAMPON^{(OEt)}$  bol raz odstránený premývaním AcOEt obsahujúcim  $tBu_3DO3AP^{(OEt)DBAM}$  s vodným roztokom denat. EtOH, ale toto premývanie nebolo zreprodukované. Pomer zloženia dvoch roztokov bol neznámy i napriek opakovanej simulácii delenia s rôznymi pomermi rozpúšťadiel.

### 5.4 Kvantitatívny priebeh nevodnej reakcie Mannichového typu

Vyššie uvedené komplikácie mali za následok hľadanie optimálnej syntézy, bez vzniku rôznych derivátov fosfínovej a fosfónovej kyseliny. Ekvivalenty reaktantov boli upravené nasledovne na pomer hydrobromid  $tBu_3DO3A$  ku DBAMPIN v esterovej forme ku  $CH_2O$  rovnému 1:1:5. Reakcia prebiehala pomaly v suchom rozpúšťadle MeCN aj v suchom DMF. Po zvýšení ekvivalentov  $CH_2O$  na 10 bola pozorovaná požadovaná reakcia v  $^{31}P$ -NMR, ale jej rýchlosť bola stále nízka. Až po reagovaní 15 ekvivalentov  $CH_2O$  s reakčnou zmesou rýchlosť reakcie sa blížila k rýchlosti reakcii so zmesou v pomere reaktantov 1:3:5. Po reakcii bol nadbytok použitého  $CH_2O$  z heterogénnej zmesi odfiltrovaný cez filtračný papier (v porovnaní s fritou hrubosti S3 a S4 bol tento spôsob efektívnejší).

Doba reakcie, po ktorej bol v  $^{31}P$ -NMR vidieť len jeden fosforový signál  $tBu_3DO3AP^{(OEt)DBAM}$ , bola variabilná. Trvanie v rozsahu 6 dní ( $\pm$  2 dni) bolo ovplyvnené „hustotou“ zmesi (použitie 25ml banky na cca 10 g reaktantov), plnosťou banky a jej ponorením (účinným temperovaním) v olejovom kúpeli. Kombináciou týchto optimalizačných parametrov reakcie sa jedenkrát dosiahlo skrátenie reakčného času na 4 dni. V jednom prípade bola pozorovaná oxidácia  $DBAMPIN^{OEt}$  na  $DBAMPON^{OEt}$ , ale pravdepodobne sa banka dotýkala dna nádoby s olejom a tým bola lokálne prehrievaná.

Syntézou  $tBu_3DO3AP^{(OEt)DBAM}$  bez vedľajších produktov sa výrazne zjednodušili purifikačné procesy. Problémom bolo rozpúšťadlo DMF, ktoré na obyčajnej rotačnej

vákuovej odparke pri teplote nižšej ako cca 60 °C vo vodnom kúpeli nebolo možné odpariť. Ďalší reakčný krok zahŕňal aj bázickú hydrolyzu a tou by sa DMF rozkladal na nepríjemne páchnuci  $\text{Me}_2\text{NH}$  a kyselinu mravčiu, resp. mravčan. Prvotne bol  $\text{tBu}_3\text{DO3AP}^{(\text{OEt})\text{DBAM}}$  izolovaný z DMF pridaním soľanky a extrakciou  $\text{Et}_2\text{O}$ . Týmto spôsobom sa  $\text{tBu}_3\text{DO3AP}^{(\text{OEt})\text{DBAM}}$  s trochou DMF zrazil vo forme čierneho oleja na rozhraní. Alternatívne bol extrahovaný do AcOEt zo zmesi DMF a soľanky, ale v AcOEt bol prítomný i DMF (podľa  $^1\text{H-NMR}$ ) – bol odstránený premývaním AcOEt so soľankou, ale nie kvantitatívne. Navyše pri tomto spôsobe izolácie produktu bola badateľná prítomnosť signálu DBAMPON<sup>OEt</sup> v  $^{31}\text{P-NMR}$  (príčina je neznáma). Jedným z vysvetlení mohla byť reakcia retromannichového typu. Riedenie suchého DMF (po reakcii) vodou je silno exotermický dej a chladenie ľadovým kúpeľom sa zdalo byť neúčinné (DBAMPON<sup>OEt</sup> prítomný v  $^{31}\text{P-NMR}$ ).

Suchý DMF bol nakoniec odstránený niekoľkonásobným odparením na olejovej výveve s vymrazovačkou ponorenou v tekutom dusíku. Behom tohto postupu nedochádzalo k rozkladu prítomných látok v roztoku.

## 5.5 Katalýza reakcie Mannichového typu

Používaný typ Mannichovej reakcie v nevodných suchých rozpúšťadlách MeCN a DMF mal relatívne pomalý časový priebeh a tým sa vytváral priestor na oxidáciu DBAMPIN<sup>OEt</sup>, popri prípade jeho deesterifikáciu. Preto boli skúsené tri sady potenciálnych katalyzátorov (bolo použitých vždy cca 10 molárnych %), ktoré by tieto nedostatky odstránili a zachovali si kvalitatívny priebeh. Vyhodnotenie bolo učené spektrami  $^{31}\text{P-NMR}$  poreakčných zmesí.

Prvými otestovanými katalyzátormi boli soli AcOLi a TFApy pre rozpúšťadlá MeCN, DMF a ich zmes v pomere 1:1 na zníženie reakčnej teploty na 25 °C. Octan lítny spôsobil čiastočnú hydrolyzu ethylesterov prítomných molekúl a katalytická účinnosť bola nízka (u oboch rozpúšťadiel). Soľ TFApy nemala výrazný kladný účinok na priebeh u rozpúšťadla DMF, ale poreakčná zmes s rozpúšťadlom MeCN mala konverziu na produkt blížiacu sa k 100 % (podľa  $^{31}\text{P-NMR}$ , 25 °C, 7 dní, pomer reaktantov 1:3:5). Opätovné použitie soli TFApy s rozpúšťadlom MeCN na reakciu Mannichového typu mala vždy rovnaký pozitívny účinok (i pre pomer reaktantov 1:1:15). Zmes DMF s MeCN v oboch prípadoch kombinovala vlastnosti čistých rozpúšťadiel a reakcii v nich prevádzaných.

Druhým typom katalyzátorov boli anorganické soli  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$  a  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  pre zníženie časového priebehu reakcie v rozpúšťadle DMF. Zámerom bol posun elektrónovej hustoty koordinovaním do dutiny  $\text{tBu}_3\text{DO3AP}^{(\text{OEt})\text{DBAM}}$  a tým okyslenie sekundárneho amínu – zvýšenie jeho reaktivity. V nevodnom prostredí sa soli rozpúšťali len veľmi obmedzene a možné vzniknuté komplexy sa zrážali. Bazickosť uhličitanu navyše zapríčiňovala čiastočnú hydrolyzu ethylesterov prítomných molekúl.

Poslednými skúmanými katalyzátormi boli DMP, TsOH a dve modifikácie TiO<sub>2</sub> (anatas a rutil). Kým modifikácie oxidu titaničitého reakciu skôr spomaľovali (anatas bol účinnejší v spomaľovaní) a TsOH čiastočne hydrolyzoval estery (aj *t*Bu) molekúl, DMP v priebehu 2 dní v pomere reaktantov 1:1:15 mal cca 100% konverziu DBAMPIN<sup>(OEt)</sup> na *t*Bu<sub>3</sub>DO3AP<sup>DBAM</sup> podľa <sup>31</sup>P-NMR. Úspech bol zreprodukovaný, ale čistenie poreakčnej zmesi už nepriebehalo tak ľahko ako bez použitia katalyzátora. Chyba a príčina neštandardného chovania nebola zistená.

## 5.6 Príprava mezylátu

Syntéza DBAMPIN<sup>HM</sup> prebiehala v azeotropickej HCl kvantitatívne a čisto (podľa <sup>31</sup>P-NMR). Určité množstvo DBAMPIN a 1,5 ekvivalentu CH<sub>2</sub>O sa miešalo v uzatvorenej banke počas 5 dní pri teplote olejového kúpeľa 70 °C, čím kvantitatívne vznikol DBAMPIN<sup>HM</sup> (podľa <sup>31</sup>P-NMR). Po vysušení niekoľkonásobným odparením s abs. EtOH na rotačnej vákuovej odparke bola zmes esterifikovaná s DCC a neskôr i s prídavkom katalyzátoru DMAP. Konverzia reakcie sa blížila k maximálne 75 % (bolo použitých najviac 5 ekvivalentov DCC). Následná purifikácia extrakciami a premývaniami nebola efektívna, ale zlomok čistého DBAMPIN<sup>(OEt)HM</sup> bol získaný premývaním poreakčnej zmesi rozpustenej v CHCl<sub>3</sub> s 3% vodným roztokom amoniaku.

DBAMPIN<sup>(OEt)HM</sup> reagoval s MsCl v prítomnosti DIPEA rozpusteným v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> za chladenia ľadom, ale konverzia podľa <sup>31</sup>P-NMR bola nízka. Následné prečistenie chromatograficky na kolóne so silikagélom malo za následok deesterifikáciu produktu a opätovná Steglichova esterifikácia už neprebíhala s vysokými výťažkami (<sup>31</sup>P-NMR).

Od tejto schémy prípravy ligandu bolo upustené, nebola ďalej skúmaná, pretože výťažky a relatívna čistota súbežne testovanej reakcie Mannichového typu v nevodnom prostredí reakcie bola už dostatočná.

## 5.7 Hydrolýza esterov *t*Bu<sub>3</sub>DO3A<sup>(OEt)DBAM</sup>

Deesterifikácia *t*Bu esterov látok vo zmesi TFA:CHCl<sub>3</sub> = 1:1 so zahrievaním k varu bola úspešná. Terciálne butyl-estery boli hydrolyzované v priebehu pár hodín. Problémom bol vznik reziduí vo forme tmavých dechtových látok, ktoré boli odstraňované veľmi ťažko. Po odparení TFA zo zmesi bol DO3AP<sup>(OEt)DBAM</sup> nanosený na silný kationový menič v H<sup>+</sup> cykle. Eluovaním 5% vodným roztokom NH<sub>3</sub> boli z kolóny vymyté i dechtové látky s produktom. Táto nepríjemnosť bola vyriešená premývaním kolóny pred eluovaním produktu. Po nanosení hydrolyzovanej zmesi na silný kationový menič v H<sup>+</sup> cykle bola kolóna prepláchnutá destilovanou vodou (odstránenie HCl), denat. EtOH (dechtové látky), destilovanou vodou (vymytie EtOH), 5 % vodným roztokom NH<sub>3</sub> (eluovanie DO3AP<sup>(OEt)DBAM</sup> s možnými nečistotami) a EtOH:NH<sub>3</sub> = 1:1, čím boli eluované zvyšné uchytené látky na silnom kationovom meniči. Následne bol DO3AP<sup>(OEt)DBAM</sup> selektívne rozpustený z odparku eluátu s horúcim

vodným roztokom iPrOH (cca 80%). Týmto spôsobom však dochádzalo k nemalým stratám pri izolovaní produktu, preto DO3AP<sup>(OEt)DBAM</sup> bol ďalej hydrolyzovaný bez prečistenia na silnom kationovom meniči.

Ethylester na fosfinátovej skupine produktu bol hydrolyzovaný hydroxidom v ethanolickom (neskôr čisto vodnom) roztoku. Za použitia malého množstva KOH (pH = 9–10) a laboratórnej teploty deesterifikácia trvala cca 3–4 týždne. Po zahriatí na 40 °C bol reakčný čas skráteneý na približne 1–2 týždne. Ďalšie skráteneý sa podarilo dosiahnuť zakoncentrovaním hydroxidu (10–30% vodný roztok) a to na 4 dni. Vzniknutý DO3AP<sup>DBAM</sup> bol následne prečistený na silnom kationovom meniči v H<sup>+</sup> cykle postupom popísaným vyššie, ale namiesto 5% vodného roztoku amoniaku bol použitý 10% vodný roztok pyridínu (selektívnejšie vymytie produktu z kolóny).

Pokusy o úplnú hydrolyzu všetkých esterov naraz boli nad očakávanie úspešné. Zahrievaním tBu<sub>3</sub>DO3AP<sup>(OEt)DBAM</sup> na 70 °C v prítomnosti konc. ethanolického roztoku KOH estery boli do 24 hodín hydrolyzované. Zahrievanie, ktoré trvalo dlhšie ako 24 hodín, malo za následok nevratnú zmenu (rozklad) produktu podľa <sup>31</sup>P-NMR. Hydrolyza koncentrovaným roztokom KOH pri zvýšenej teplote je v štádiu testovania. Získané poznatky podporujú záujem o optimalizáciu – skráteneý reakčnej doby hydrolyzy esterov tBu<sub>3</sub>DO3AP<sup>(OEt)DBAM</sup> na 1 deň.

## 5.8 Purifikácia a kryštalizácia DO3AP<sup>DBAM</sup>

Na základe prítomnosti troch karboxylových skupín a jednej skupiny fosfínovej kyseliny bola predpokladaná znížená rozpustnosť v nevodných rozpúšťadlách. Zrážanie DO3AP<sup>DBAM</sup> z roztoku prídavkom abs. EtOH nemalo požadovaný účinok – vytvoril sa homogénny roztok. Zrážanie so suchým THF bolo úspešné, avšak do pevnej fázy sa dostali aj prítomné nečistoty. Ďalej bol použitý suchý MeCN, ale v ňom bol DO3AP<sup>DBAM</sup> mierne rozpustný. Prítomnosť dvoch benzylových skupín zjavne zapríčiňovala neštandardné chovanie molekuly.

Najväčším prekvapením bola dokonalá rozpustnosť DO3AP<sup>DBAM</sup> vo vodnom Me<sub>2</sub>CO. Pri podrobnejšom skúmaní bolo zistené, že v bezvodnom Me<sub>2</sub>CO sa primárne rozpustia nečistoty a už i pár percent (hmotn.) vody rozpúšťa produkt. Ideálny pomer voda ku Me<sub>2</sub>CO pre rozpustenie DO3AP<sup>DBAM</sup> zo zmesi ležal v okolí pomeru 1:4. Pri náhrade Me<sub>2</sub>CO za iPrOH sa dosahovali podobné výsledky. So zahriatím roztokov rozpustnosť produktu rástla – DO3AP<sup>DBAM</sup> nakoniec bol izolovaný rozpustením vo vriacom abs. EtOH a postupným chladnutím a státím v pokoji sa zrážal vo forme bielych ľahkých chumáčov.

Pre spomínanú výbornú rozpustnosť produktu bola kryštalizácia náročná. Z čistých vodných roztokov nebolo kryštalizovanie úspešné – ani s prídavkom THF, abs. EtOH, Me<sub>2</sub>CO. Z vodných roztokov rozpúšťadiel DO3AP<sup>DBAM</sup> zväčša koaguloval vo forme bezfarebného oleja na stenách nádoby alebo na dne vo forme žltého oleja.

Najúspešnejšia bola neštandardná kryštalizácia – DO3AP<sup>DBAM</sup> zakoncentrovaný vo vodnom roztoku bol prevrstvený s AcOEt. Práve pre nemiesiteľnosť a zvýšenú

rozpustnosť vody v ethylacetáte sa olej s produktom pomaly dehydratoval a časom vykryštalizoval, ale kryštály boli príliš malé, tenké a prítomné v oleji nečistôt pre RTG meranie. Ďalšou nevýhodou bola hydrolýza AcOEt zapríčinená kyslosťou DO3AP<sup>DBAM</sup>.

Kryštalizácia produktu vo forme hydrochloridu bola úspešná vo vodnom iPrOH, avšak vzniknuté kryštály boli na RTG meranie nevhodné. Kryštalová štruktúra DO3AP<sup>DBAM</sup> bola získaná až z kryštálu vzniknutého z koncentrovaného vodného roztoku ligandu o pH = 4 difúziou suchého THF cez plynnú fázu.

## 5.9 Komplexácie DO3AP<sup>DBAM</sup>

Po príprave dostatočného množstva DO3AP<sup>DBAM</sup> v relatívne čistej forme ligand komplexoval pridany hydrát chloridu lanthanoidu. pH, merané elektródou, spočiatku veľmi rýchlo klesalo. Vznikajúce H<sup>+</sup> ióny boli neutralizované pridávaným vodným roztokom LiOH, ktorý ale zrážal lanthanoidy vo forme bielych šupiniek hydroxidu. V kyslom prostredí za miešania sa Ln(OH)<sub>3</sub> pomaly rozpustil. Malými postupnými prídavkami LiOH a zakomplexovaním Ln(III) sa docielilo zastabilizovanie pH na hodnote cca 5,5. Dokončenie komplexácie prebiehalo za zvýšenej teploty v priebehu 3 dní.

Chromatografická separácia syntetizovaného komplexu od nečistôt prebiehala na neutrálnom Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Optimalizácia mobilnej fázy bola zdĺhavá, pretože dibenzylová skupina komplexu je dostatočne nepolárna – retenčný faktor bol vždy veľký. Práve pre prítomnosť dibenzylovej skupiny boli komplexy rozpustné v „málo-vodných“ mobilných fázach, ako bol nakoniec použitý IPA = 10:1:2, kde sa látky delili s dostatočným rozdielom  $R_f$ .

Pri samotnom prevedení chromatografie sa nie vždy podarilo odstrániť indikátor. Funkčné skupiny brómkrezolovej zelene pravdepodobne s komplexom interagovali a v kolóne boli viditeľné dva modré pásy (pre prítomnosť NH<sub>3</sub>), z ktorých jeden obsahoval purifikovaný komplex.

## 5.10 Meranie luminiscencií

Z pripravených vzoriek komplexov Eu(III) a Tb(III) s DO3AP<sup>DBAM</sup> v dvoch oblastiach pH a dvoch rozpúšťadlách (H<sub>2</sub>O a D<sub>2</sub>O) boli zmerané excitačné a emisné spektrá. Väčšina charakteristických emisných signálov lanthanoidov bola prekrytá dvoma širokými signálmi benzylových skupín komplexu. Po zmeraní experimentu pre získanie doby vyhasínania fluorescencie centrálnych atómov preložené exponenciálne krivky nekopirovali získané dáta presne a hodnoty  $\tau$  presahovali očakávanú veľkosť – nastávala interferencia dvoch dejov. Opakovaním merania pri inej excitačnej vlnovej dĺžke, ktorá už priveľmi nezasahovala do excitačného pásu benzylových skupín, sa hodnoty  $\tau$  priblížili k reálnym (zníženie časov  $\tau$  až o 30 % medzi meraniami), avšak interferenciu benzylových skupín podľa emisného spektra nemožno ani pri použitej vlnovej dĺžke úplne vylúčiť.

## 6. Výsledky

### 6.1 Optimalizácia nevodného typu Mannichovej reakcie

Nasledujúce tabuľky zachytávajú otestované reakcie s výsledkom a komentárom. Pomer reaktantov znamená pomer hydrobromidu  $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$  ku  $\text{DBAMPIN}^{\text{OEt}}$  ku  $\text{CH}_2\text{O}$ .

Tabuľka 12:

<b>Pomer reaktantov 1:3:5 – teplotná optimalizácia</b>			
<b>Rozpúšťadlo</b>	<b>Teplota</b>	<b>Reakčná doba<sup>a</sup></b>	<b>Problémy</b>
MeCN	72 °C	7 d	Vznik $\text{DBAMPON}^{\text{OEt}}$ , metylácia $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$
TOL	60 °C	7 d	Vznik $\text{DBAMPON}^{\text{OEt}}$
MeCN	60 °C	7 d	Vznik $\text{DBAMPON}^{\text{OEt}}$
MeCN	55 °C	7 d	Výrazná metylácia $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$
DMF	60 °C	5 d	$^{31}\text{P}$ zmes, rozpúšťadlo DMF
DMF	40 °C	5–7 d	Rozpúšťadlo DMF
DMF	35 °C	14 d	Pomalá reakcia, rozpúšťadlo DMF

<sup>a</sup> Do vymiznutia P–H väzby

Tabuľka 13:

<b>Pomer reaktantov 1:1:X – pomerová optimalizácia</b>				
<b>Rozpúšťadlo</b>	<b>Teplota</b>	<b>Reakčná doba</b>	<b>Pomer reaktantov</b>	<b>Konverzia<sup>a</sup></b>
DMF	40 °C	1.–4. d	1:1:5	22 %
DMF	40 °C	4.–5. d	1:1:10	35 %
DMF	40 °C	5.–10. d	1:1:15	100 %

<sup>a</sup> Podľa  $^{31}\text{P}$ -NMR spektra

Tabuľka 14:

<b>Katalýza – 1. sada (pomer reaktantov 1:3:5)</b>			
<b>Katalyzátor</b>	<b>Rozpúšťadlo</b>	<b>Teplota<sup>a</sup></b>	<b>Problém</b>
AcOLi	MeCN	25 °C	Čiastočná hydrolýza, pomalá reakcia
AcOLi	MeCN + DMF	25 °C	Zmes vlastností reakcii v MeCN a DMF
AcOLi	DMF	25 °C	Spomalená reakcia oproti rozpúšťadlu MeCN
TFAPy	MeCN	25 °C	Kvantitatívna reakcia
TFAPy	MeCN + DMF	25 °C	Zmes vlastností reakcii v MeCN a DMF
TFAPy	DMF	25 °C	Nereaguje

<sup>a</sup> Reakčná doba bola 5 dní

Tabuľka 15:

<b>Katalýza – 2. sada (pomer reaktantov 1:1:15)</b>			
<b>Katalyzátor</b>	<b>Rozpúšťadlo</b>	<b>Reakčná doba<sup>a</sup></b>	<b>Problém</b>
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	DMF	1 d	Zrazenie vzniknutých komplexov (konverzia reaktantov bola nižšia ako u slepej vzorky), čiastočná hydrolýza esterov pri použití K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	DMF	1 d	
Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	DMF	1 d	
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	1 d	
CaCl <sub>2</sub>	DMF	1 d	

<sup>a</sup> Reakčná teplota bola 40 °C (v olejovom kúpeli)

Tabuľka 16:

<b>Katalýza – 3. sada (pomer reaktantov 1:1:15)</b>			
<b>Katalyzátor</b>	<b>Rozpúšťadlo</b>	<b>Reakčná doba<sup>a</sup></b>	<b>Problém</b>
DMP	DMF	2 d	Kvantitatívna reakcia
TsOH	DMF	2 d	Čiastočná hydrolýza esterov
TiO <sub>2</sub> – anatas	DMF	2 d	Reakcia pomalšia ako u slepej vzorky
TiO <sub>2</sub> – rutil	DMF	2 d	Pomalá reakcia, ale rýchlejšia ako u reakčnej zmesi s anatasom

<sup>a</sup> Reakčná teplota bola 40 °C (v olejovom kúpeli)

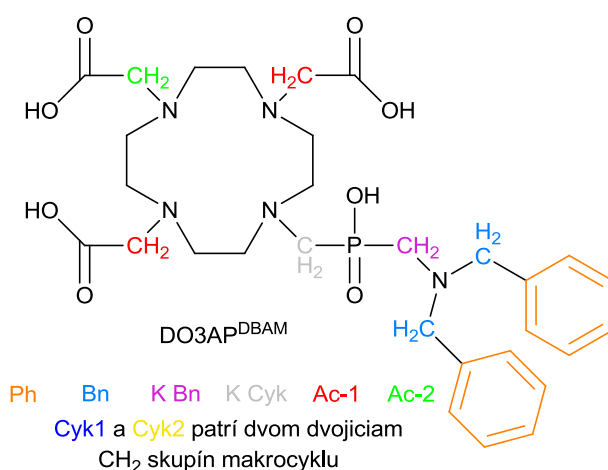
## 6.2 NMR titrácie

Teoretické krivky preložené experimentálnymi dátami boli vypočítané zo získaných hodnôt  $pK_a$  programom OPIUM.

### 6.2.1 DO3AP<sup>DBAM</sup>

Uvedené tabuľky zachycujú jednoznačne určené signály funkčných skupín z NMR spektier (chýbajúce 2 signály makrocyklu neboli presne určené), ich posun v závislosti na pH roztoku. Graficky sú zobrazené posuny signálov vzhľadom k pH – dáta sú uvedené z dvoch nezávislých titrácií DO3AP<sup>DBAM</sup> (dva rôzne experimenty prípravy DO3AP<sup>DBAM</sup>). Graficky nie sú zobrazené aromatické signály, ale kopírujú tvar krivky benzylových methylenov. Experimentálne zistené body signálov „Cyk2“ sú v *Grafe 1* len uvedené ilustratívne, neboli optimálne preložené teoretickou krivkou.

Posuny skupín sú uvedené v jednotkách ppm, spektrá boli referencované na tBuOH ( $\delta = 1,25$  ppm) prítomným v inzertovej kyvete. V tabuľkách a grafoch boli použité nasledovné skratky skupín:



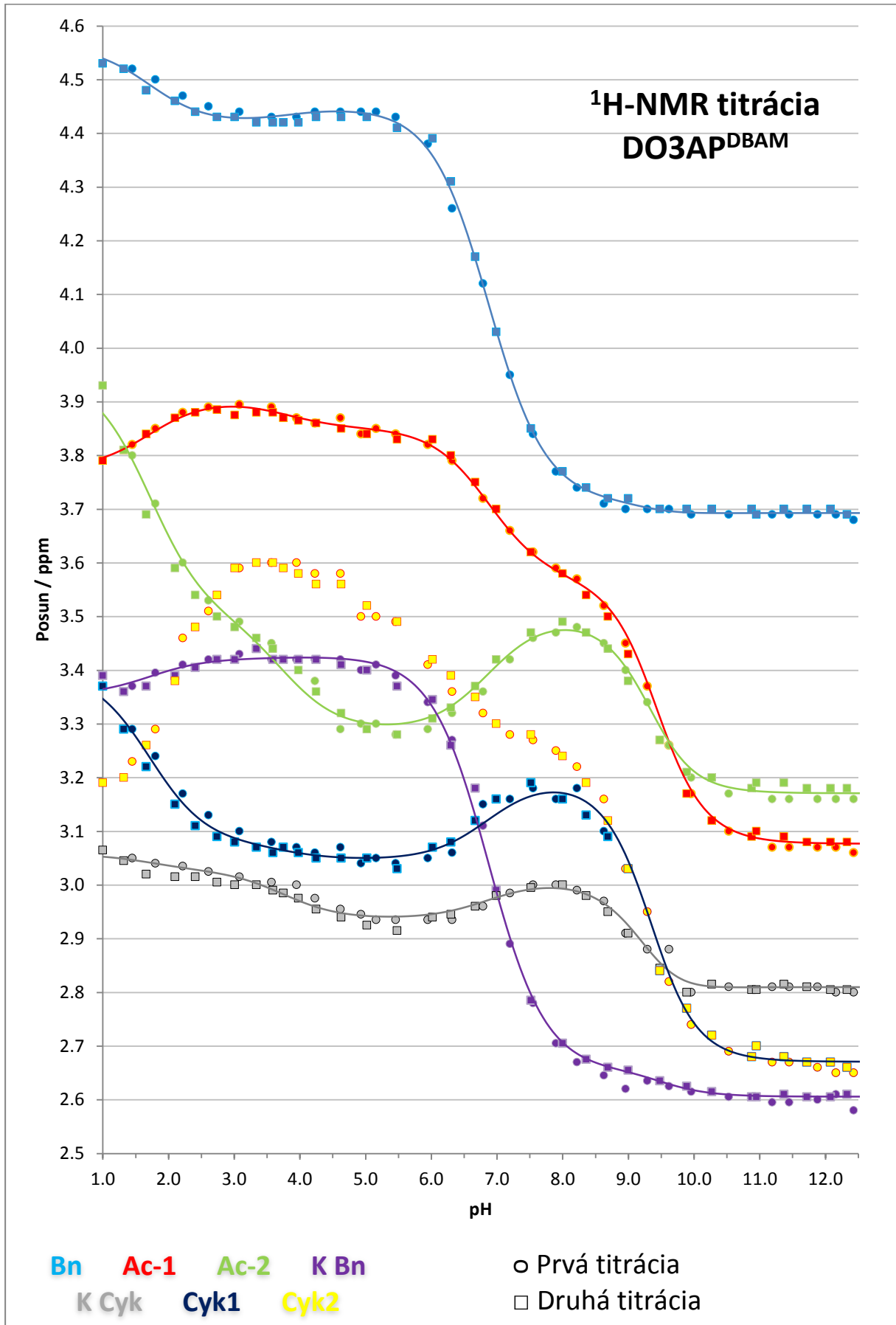
Nasledujúca tabuľka uvádza vypočítané hodnoty  $pK_a$  molekuly. Teoretické formy molekuly v závislosti na pH sú uvedené v Prílohe (oddiel 8.4).

Tabuľka 17:

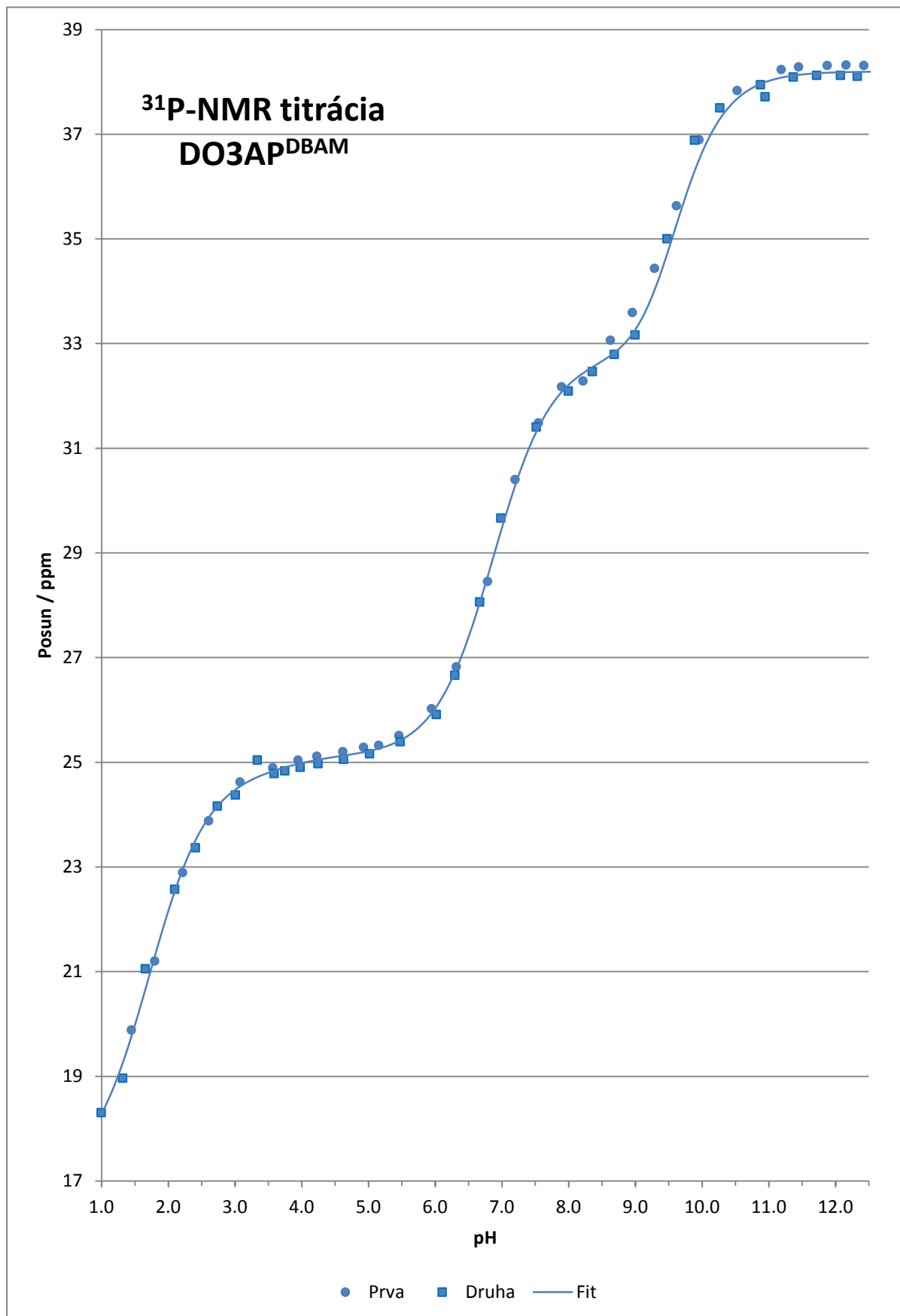
Hodnoty $pK_a$ DO3AP <sup>DBAM</sup>	
$pK_a$	Chyba
1,71	0,23
3,76	0,22
6,87	0,13
9,28	0,13
9,56	0,04



Graf 1:



Graf 2:

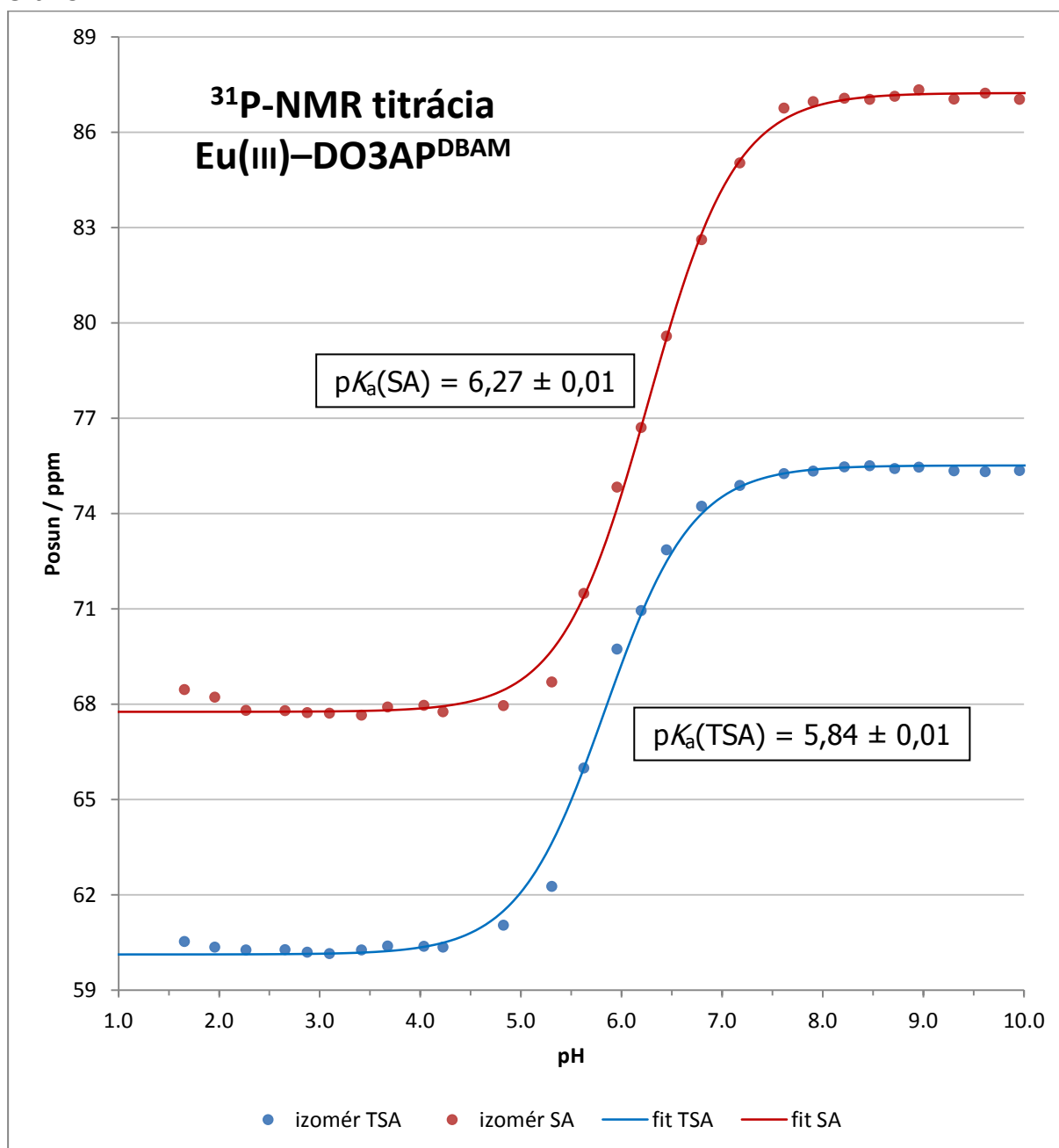


## 6.2.2 Komplexy

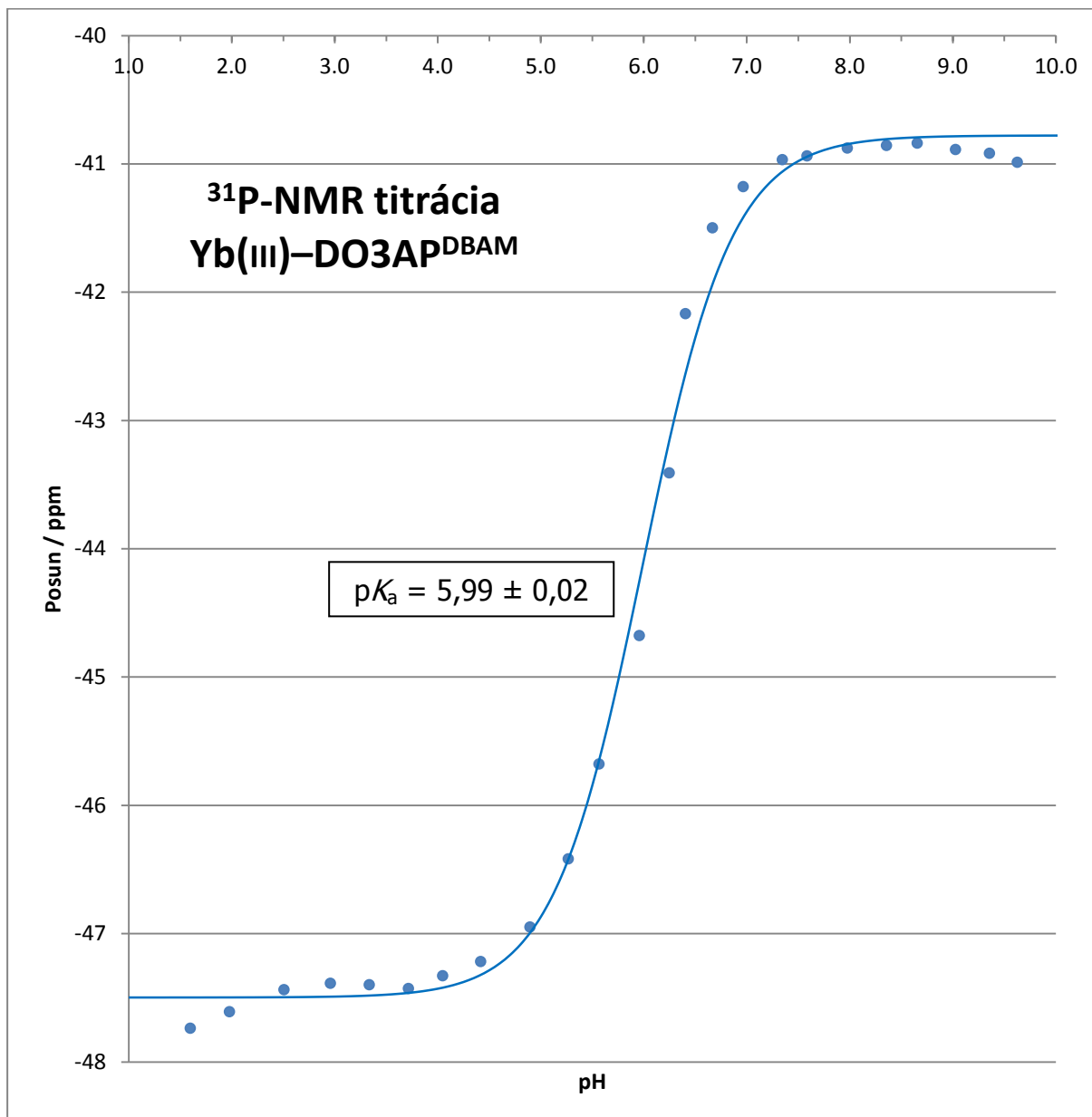
V nasledujúcich tabuľkách a grafoch sú vyhodnotené posuny fosforových signálov (referencované na externú inertovú kvetu s  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) vzhľadom k pH komplexov  $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$  s  $\text{Eu(III)}$  a  $\text{Yb(III)}$ . Ich protónové spektrá a spektrá komplexu  $\text{Tb(III)}$  neboli jednoznačné a preto neboli vyhodnocované.

Z integrálov signálov protónov paramagnetických posunov (4H makrocyklu, orientované k centrálnemu atómu) a  $^{31}\text{P}$  signálov (len pre komplex  $\text{Eu(III)}$ ) bolo určené zastúpenie dvoch izomérov SA a TSA, resp. TSA', v komplexoch.

Graf 3:



Graf 4:



Tabuľka 18:

<b>Zastúpenie izomérov v komplexoch [EuL] a [YbL]</b>				
<b>[LnL]<sup>8</sup></b>	<b>pH</b>	<b>SA<sup>9</sup> / %</b>	<b>TSA / %</b>	<b>Chyba / %</b>
[EuL]	1,5–5	47	53	10
	7,5–10	26	74	
[YbL]	1,5–5	70	30	
	7,5–10	53	47	

<sup>8</sup> [LnL] je komplex Ln(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup>

<sup>9</sup> Určené podľa posunov štvorice signálov izoméru SA prítomných nad hodnotou cca  $\delta = 25$  ppm (t. j. nad štvoricu signálov izoméru TSA, resp. TSA'), pre komplex Eu(III) boli získané hodnoty korelované s integrálmi signálov v <sup>31</sup>P-NMR spektrách – určené podľa publikácie (55)

### 6.3 Luminiscentné merania

Tabuľka 19:

Luminiscenčné merania komplexov Eu(III) a Tb(III) s DO3AP <sup>DBAM</sup>								
Ln	pH	Voda	$T / \text{ms}$	$k / \text{ms}^{-1}$	$\Delta k$	$q^a$	$\Delta k'$	$q'^b$
Eu	Kys	H <sub>2</sub> O	0,846	1,18	0,71	0,75	0,46	0,56
		D <sub>2</sub> O	2,13	0,47				
	Baz	H <sub>2</sub> O	0,455	2,20	1,19	1,25	0,94	1,13
		D <sub>2</sub> O	0,994	1,01				
Tb	Kys	H <sub>2</sub> O	2,10	0,48	0,11	0,48	0,05	0,27
		D <sub>2</sub> O	2,76	0,36				
	Baz	H <sub>2</sub> O	1,82	0,55	0,11	0,48	0,05	0,27
		D <sub>2</sub> O	2,30	0,43				

<sup>a</sup> Chyba stanovenia je  $\pm 0,50$

<sup>b</sup> Chyba stanovenia je 25 %

Vzorcie na výpočet parametrov boli prevzaté z publikácie – (52).

Použité boli nasledujúce vzorce a parametre:

$$k = \frac{1}{T} \quad [9]$$

$$\Delta k = k_H - k_D \quad [10]$$

$$q = A \Delta k \quad [11]$$

$$\Delta k' = \Delta k - \text{corr}_{Ln} \quad [12]$$

$$q' = A' \Delta k \quad [13]$$

$$A(\text{Eu}) = 1,05$$

$$A(\text{Tb}) = 4,20$$

$$A'(\text{Eu}) = 1,20$$

$$A'(\text{Tb}) = 5,00$$

$$\text{corr}_{\text{Eu}} = 0,25$$

$$\text{corr}_{\text{Tb}} = 0,06$$

## 6.4 Relaxivita Gd(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup>

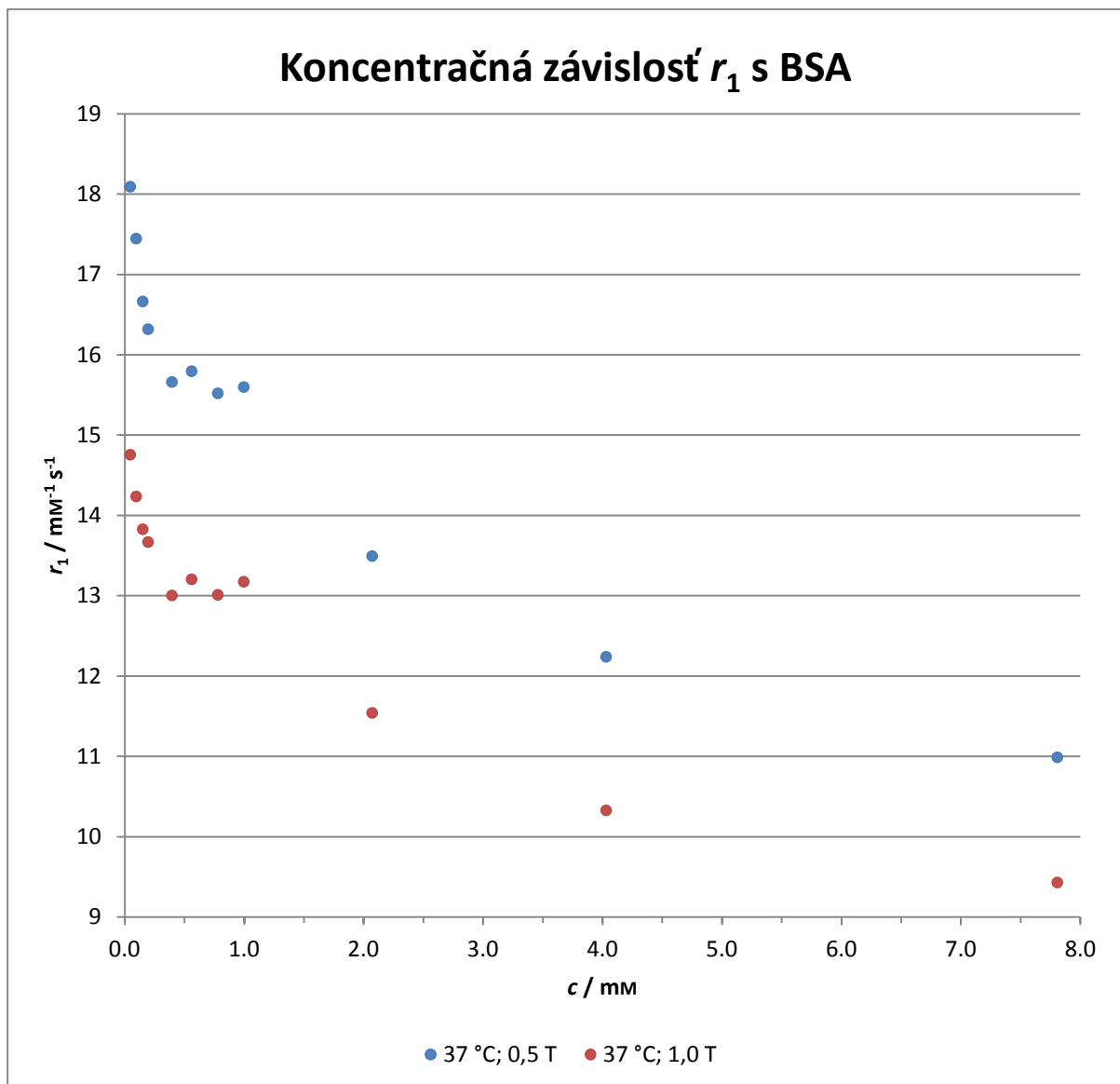
Merania boli uskutočnené na dvoch relaxometroch (magnetické pole 0,5 T a 1,0 T) na pracovisku IKEM. Koncentrácie zásobných roztokom Gd(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> a meraných roztokov boli overené Evansovou metódou (BMS). V tabuľkách v Prílohe (oddiel 8.3) sú uvedené chyby merania v časoch  $T_1$ . Relaxivita kontrastnej látky bola vypočítaná ako:

$$[(R_1)_{\text{celk}} - (R_1)_{\text{dia}}] / c_{\text{GdL}}, \text{ kde } (R_1)_{\text{dia}} \text{ je relaxivita roztoku bez prítomného [GdL].}$$

### 6.4.1 Koncentračná závislosť relaxivity [GdL] s prítomným albumínom

Výsledky z prvej série relaxačných meraní sú v tabuľkách v Prílohe (oddiel 8.3) a v *Grafe 5*. Teplota temperovania vzoriek a pri meraní bola 37 °C.

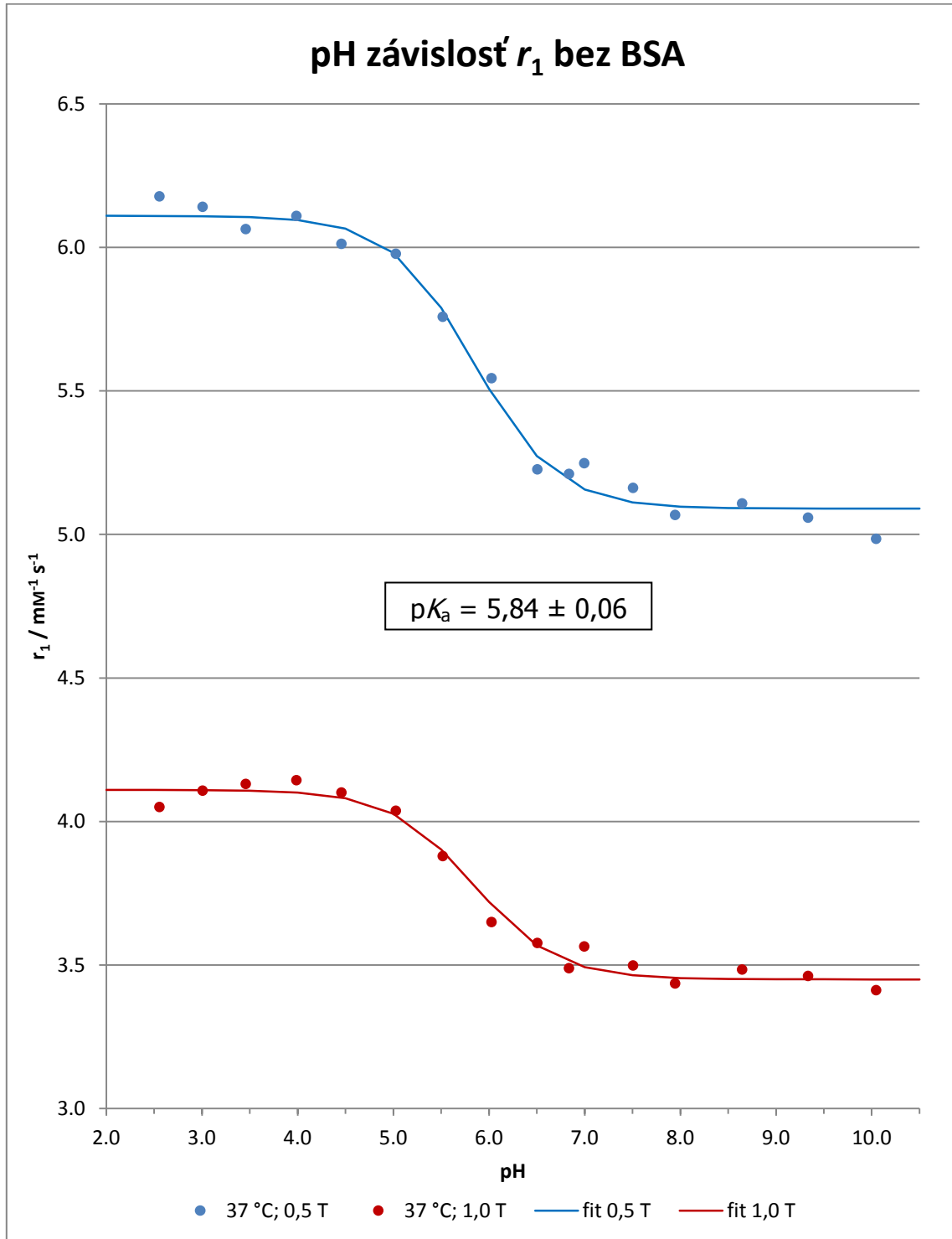
*Graf 5:*



### 6.4.2 pH závislosť relaxivity [GdL] bez prítomného albumínu

Výsledky z druhej série relaxačných meraní sú v tabuľkách v Prílohe (oddiel 8.3) a v *Grafe 6*. Koncentrácia [GdL] vo vzorkách bola  $c = 0,857 \text{ mM}$  (podľa BMS).  $(R_1)_{\text{dia}}$  bola braná ako relaxácia destilovanej vody.

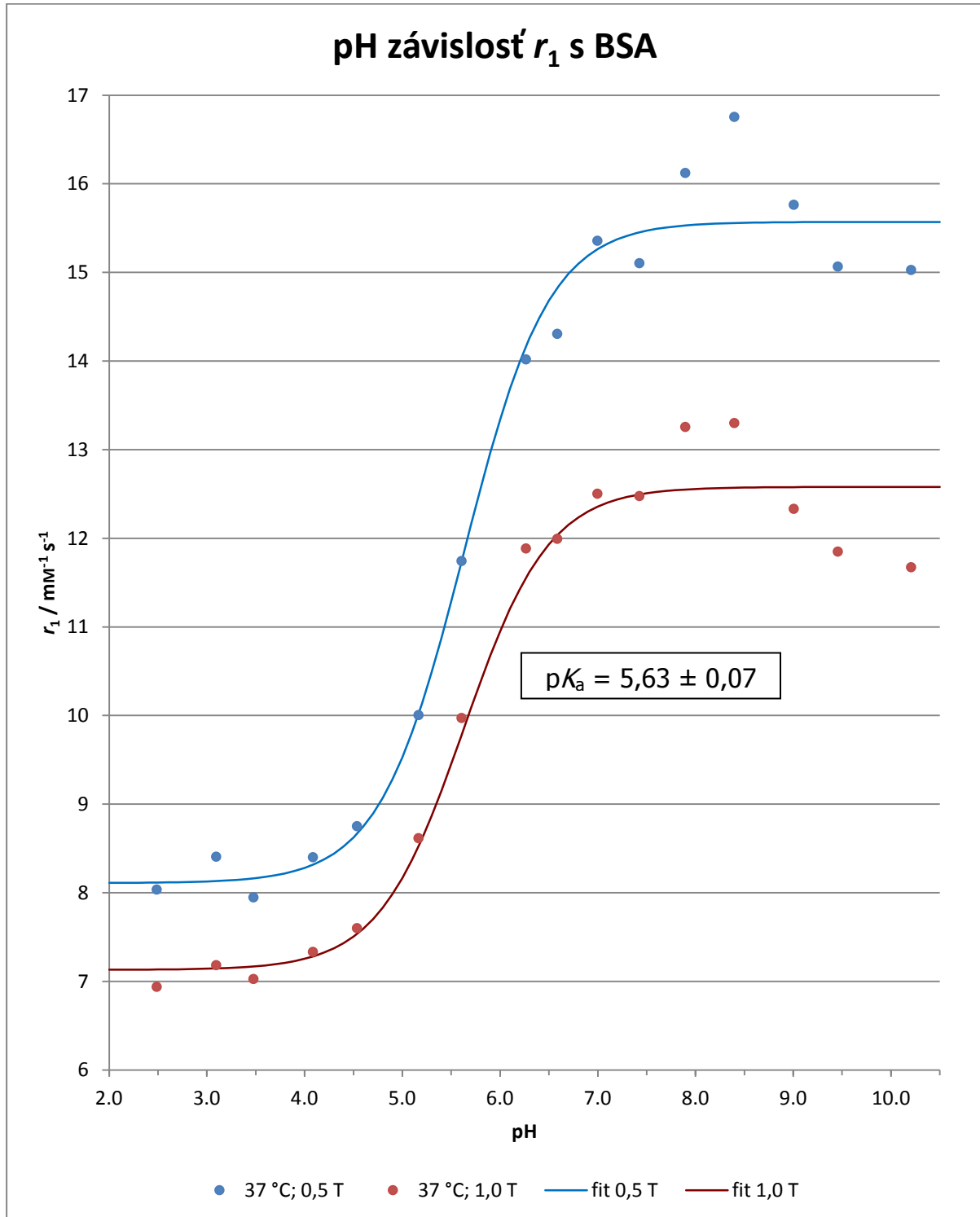
*Graf 6:*



### 6.4.3 pH závislosť relaxivity [GdL] s prítomným albumínom

Výsledky z tretej série relaxačných meraní sú v tabuľkách v Prílohe (oddiel 8.3) a v *Grafe 7*. Koncentrácia [GdL] vo vzorkách bola  $c = 0,784$  mM (podľa BMS).  $(R_1)_{\text{dia}}$  bola braná ako relaxácia 4% vodného roztoku BSA.

*Graf 7:*





## 7. Záver

Po optimalizovaní reakcie Mannichového typu v nevodnom prostredí bolo pripravené dostatočné množstvo syntetizovaného ligandu DO3AP<sup>DBAM</sup> v relatívne čistej forme a bol získaný kryštál vhodný na RTG meranie. Ligand bol otitrovaný v rozsahu 1–12,5 jednotiek pH (po 0,3–0,5 jednotky pH) a z posunov signálov v spektrách <sup>1</sup>H-NMR a <sup>31</sup>P-NMR spektrách boli vypočítané disociačné konštanty pK<sub>a</sub> a možné rôzne protonizované formy molekuly vzhľadom k pH. Boli vytvorené komplexy trojmocných kationov euróbia, terbia a yterbia s DO3AP<sup>DBAM</sup>, ktoré boli otitrované rovnako ako ligand v rozsahu 2–10 jednotiek pH a na komplexoch europitých a terbitých boli namerané luminiscenčné merania pre zistenie počtu koordinovaných vôd v závislosti na pH. Napokon bol pripravený komplex DO3AP<sup>DBAM</sup> s Gd(III) a bola zmeraná jeho relaxivita bez a s prítomnosťou sérového albumínu v závislosti na pH pri 2 poliach (0,5 a 1,0 T) ako i relaxivita na koncentračnej závislosti komplexu s prítomným albumínom. Komplex gadolína bol injekčne podaný testovanému potkanovi, z ktorého boli zachytené MRI snímky v oblasti trupu pred podaním a po každých 2 minútach počas 30 minút.

Počas vypracovávania tejto bakalárskej práce boli získané nasledujúce informácie:

### Optimalizácia nevodného typu Mannichovej reakcie:

- **rozpúšťadlo** – v suchom DMF je metylácia makrocyclu potlačená
- **teplota** – zníženie reakčnej teploty na 40 °C v rozpúšťadle DMF (25 °C v prípade rozpúšťadla MeCN za použitia katalyzátoru TFApy) a tým minimalizovanie šance na oxidáciu použitého esteru fosfínovej kyseliny
- **katalyzátor** – použitie soli TFApy s rozpúšťadlom MeCN a tým možné zníženie teploty o cca 35 °C s rovnakými výťažkami, použitie DMP s rozpúšťadlom DMF pre zníženie reakčného času zo 7 dní na 2 dni
- **pomer reaktantov** – prejdienie z pomeru 1:3:5 (makrocyclus ku esteru fosfínovej kyseliny ku formaldehydu) k pomeru 1:1:15, čím P–H väzba kvantitatívne zreaguje na produkt

Bola vytvorená syntetická cesta prípravy ligandu DO3AP<sup>DBAM</sup> s takmer kvantitatívnymi výťažkami reakcii (podľa <sup>31</sup>P-NMR spektier). Významnejšie straty nastávali len pri separačných, purifikačných a manipulačných úkonoch.

### NMR titrácia ligandu:

Boli zistené niektoré pK<sub>a</sub> protonizovateľných skupín DO3AP<sup>DBAM</sup> (oddiel 6.2.1) a pravdepodobné formy ligandu v závislosti na pH (oddiel 8.4).

### NMR titrácie komplexov:

Boli zistené **pK<sub>a</sub> komplexov** Eu(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> a Yb(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> (oddiel 6.2.2) a zastúpenie ich izomérov SA a TSA (resp. TSA') z intenzít <sup>1</sup>H a <sup>31</sup>P signálov (oddiel 6.2.2).

### Luminiscenčné merania komplexov Eu(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> a Tb(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup>:

Komplex Eu(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> pravdepodobne koordinuje priamo jednu molekulu vody nezávisle na pH a komplex Tb(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> nekoordinuje vodu. Výsledky meraní nie sú jednoznačné pre možnú rovnováhu v koordinácii molekuly vody a stericitu komplexov. Diskutabilná koordinácia vody v komplexe Eu(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> (oddiel 6.3) bude vyriešená uskutočnením experimentu na UV-VIS spektrometri s vysokým rozlíšením excitáciou Eu(III) zo stavu <sup>7</sup>F<sub>0</sub> → <sup>5</sup>D<sub>0</sub> pri vlnovej dĺžke 578-582 nm.

### Relaxivita komplexu s gadolíniom:

Dosiahnuté výsledky sú prehľadne znázornené v nasledujúcich tabuľkách:

Tabuľka 20:

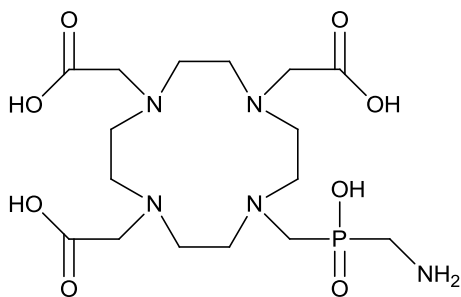
Priemerná relaxivita Gd(III)-DO3AP <sup>DBAM</sup> – 37 °C; 0,5 T				
4% BSA	pH	c / mm	T <sub>1</sub> / ms	r <sub>1</sub> / mm <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
nie	2,5–5	0,857	181	6,11
nie	7,5–10		216	5,09
áno	2,5–4,5	0,784	148	8,11
áno	7–10,5		79	15,57

Tabuľka 21:

Priemerná relaxivita Gd(III)-DO3AP <sup>DBAM</sup> – 37 °C; 1,0 T				
4% BSA	pH	c / mm	T <sub>1</sub> / ms	r <sub>1</sub> / mm <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
nie	2,5–5	0,857	265	4,11
nie	7,5–10		312	3,45
áno	2,5–4,5	0,784	167	7,13
áno	7–10,5		98	12,58

Získané údaje poukazujú, že kontrastná látka Gd(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> je z hľadiska relaxivity vhodná ako **pH-próba** s dost' veľkou relaxivitou, viažuca sa na albumín (z *Grafu 5* vyplýva, že sa na albumín dobre viaže – na jeho obe hydrofóbne miesta), a zároveň ľahko vylúčiteľná pri nízkom pH (aké je v glomerulách), pretože konjugát komplex–albumín sa pravdepodobne pri ňom rozpadá. Predpoklad veľmi dobrého viazania komplexu k oboj hydrofóbnym miestam albumínu bol založený na výsledkoch v *Grafe 5* (koncentračná závislosť r<sub>1</sub> s BSA) – relaxivita kontrastnej látky klesá až po hodnote 1,0 mM [GdL] v 0,6 mM BSA (t. j. prítomnosť „1,2 mM hydrofóbných miest“).

Ďalším smerom vývoja práce bude odstránenie benzylových skupín na ligande hydrogenačnou reakciou a tým vytvorenie nového ligandu vhodného na PARACEST. Voľná terminálna amino-skupina môže vstupovať do ďalších reakcií ako „linker“ a tým vzniknú konjugáty s väčšími molekulami (napr. dendrimérmi). Na amino-skupinu môžu byť naviazané alifatické reťazce, čím amfifílnosť ligandu môže zapríčiniť vznik micel alebo inkorporáciu do lipozómov.



## Pod'akovanie

V prvom rade by som chcel pod'akovať rodičom, bez ktorých by som nebol ja, školiteľovi doc. RNDr. Janu Kotkovi, Ph.D., a prof. RNDr. Ivanovi Lukešovi, CSc., bez ktorých by nevznikla táto práca, resp. jej počiatočný návrh, a v neposlednom rade Přírodovědeckej fakulte Univerzity Karlovy za možnosť realizácie bakalárskej práce.

Ďalej moja vd'aka patrí kolegom z „malého a veľkého labu“ za priateľskú, odľahčenú až „domácu“ atmosféru, za motiváciu, meranie kvánt spektier, cenné rady a za drobné „sprivatizovanie“ našej odparky. Menovite abecedne (bez titulov): Jan Bartoň, Martina Benešová, Jan Blahut, Jan Kotek, Tereza Krchová, Matyáš Krijt, Marie Martinisková, Luděk Míka, Monika Paurová a Ondřej Zemek.

Terke Krchovej ďakujem aj za prevrhnutie kryštalizačnej nádoby s DO3AP<sup>DBAM</sup>, z ktorej jedinej nakoniec (a konečne) vznikol RTG merateľný kryštál.

Honzovi Kotkovi ďakujem viacnásobne, pretože túto prácu čítal neraz a aj staršie verzie, pri ktorých bolo vyžadovaná veľká dávka trpezlivosti a psychickej pohody, a za zmeranie časti luminiscencií [EuL] a [TbL].

Ešte raz špeciálne ďakujem Matesovi za meranie relaxív [GdL] (tých 3 sérii po 20 vzorkách, pri 2 poliach na tom „vzdialenom“ IKEM-e).

V neposlednom rade ďakujem oponentovi docentovi RNDr. Pavlovi Vojtíškovi, CSc., za ochotu oponovať túto bakalársku prácu – už i len za to, že sa „dočítal“ až sem.

A ďakujem všetkým českým občanom za zvládnutie možného utrpenia pri čítaní slovenčiny ☺.

## Použitá literatúra

1. **Wennerstrom, H. a Westlund, P.-O.** The Stern–Gerlach experiment and the effects of spin relaxation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, Zv. 14, 5, s. 1677–1684.
2. **Watanabe, K., a iní.** Case study of a 20 T- $\phi$ 400 mm room temperature bore superconducting outsert for a 45 T hybrid magnet. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, 2008, Zv. 18, 2, s. 552–555.
3. **Alshits, V. I., a iní.** Resonant Dislocation Motions in NaCl Crystals under EPR Conditions in the Earth's Magnetic Field with a Radio-Frequency Pump Field. *Physics of the Solid State*, 2011, Zv. 53, 10, s. 2117–2125.
4. The Nobel Prizes. *Nobelprize.org*. [Online] [Dátum: 23. 4 2013.] [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/).
5. **Nakashima, T., a iní.** A perspective from magnetic resonance imaging findings of the inner ear: Relationships among cerebrospinal, ocular and inner ear fluids. *Auris, Nasus, Larynx*, 2012, Zv. 39, 4, s. 345–355.
6. **Hiller, W., a iní.** Online ThFFF–NMR: A Novel Tool for Molar Mass and Chemical Composition Analysis of Complex Macromolecules. *Macromolecules*, 2013, Zv. 46, 7, s. 2544–2552.
7. **Wagstaff, J. L., Taylor, S. L. a Howard, M. J.** Recent developments and applications of saturation transfer difference nuclear magnetic resonance (STD NMR) spectroscopy. *Molecular BioSystems*, 2013, Zv. 9, 4, s. 571–577.
8. **Ribeiro, F. Z., a iní.** Nuclear magnetic resonance water relaxation time changes in bananas during ripening: a new mechanism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, Zv. 90, 12, s. 2052–2057.
9. *Modification of 4 MHz N.M.R. Water Proton Relaxation Times in Very High Diluted Aqueous Solutions.* **Demangeat, J. L., Gries, P. a Poitevin, B.** Jerusalem, Israel : Communication presented at the 8th GIRI Meeting, 1994.
10. Health policies and data - Organisation for Economic Co-operation and Development. [Online] [Dátum: 26. 4 2013.] <http://www.oecd.org/els/health-systems/oecdhealthdata2012-frequentlyrequesteddata.htm>.
11. **Shellock, F. G.** MRI Safety. [Online] Bracco Diagnostics Inc. [Dátum: 27. 4 2013.] [http://www.mrisafety.com/safety\\_article.asp?subject=170](http://www.mrisafety.com/safety_article.asp?subject=170).
12. **Loren, K.** Karl Loren: Researcher, Author and Philosopher. [Online] [Dátum: 26. 4 2013.] <http://www.karlloren.com/ultrasound/p55.htm>.
13. **Rinck, P.** *Magnetic Resonance in Medicine*, 2012.
14. **Perlman, H.** Water properties: The water in you (Water Science for Schools). *Georgia Water Science Center*. [Online] U.S. Geological Survey. [Dátum: 27. 4 2013.] <http://ga.water.usgs.gov/edu/propertyou.html>.
15. **Zhou, Z. a Lu, Z.-R.** Gadolinium-based Contrast Agents for Magnetic Resonance Cancer Imaging. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2013, Zv. 5, 1, s. 1–18.
16. **Hellerhoff.** Bluthirnschranke nach Infarkt nativ und KM. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online] [Dátum: 27. 4 2013.] [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bluthirnschranke\\_nach\\_Infarkt\\_nativ\\_und\\_KM.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bluthirnschranke_nach_Infarkt_nativ_und_KM.png).
17. **Jia, J., a iní.** A LC–MS/MS method to evaluate the hepatic uptake of the liver-specific magnetic resonance imaging contrast agent gadoxetate (Gd-EOB-DTPA) in vitro and in humans. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2012, Zv. 891-892, s. 20–26.
18. **Kozel, F. A., a iní.** Functional MRI Detection of Deception After Committing a Mock Sabotage Crime. *Journal Forensic Sciences*, 2009, Zv. 54, 1, s. 220–231.

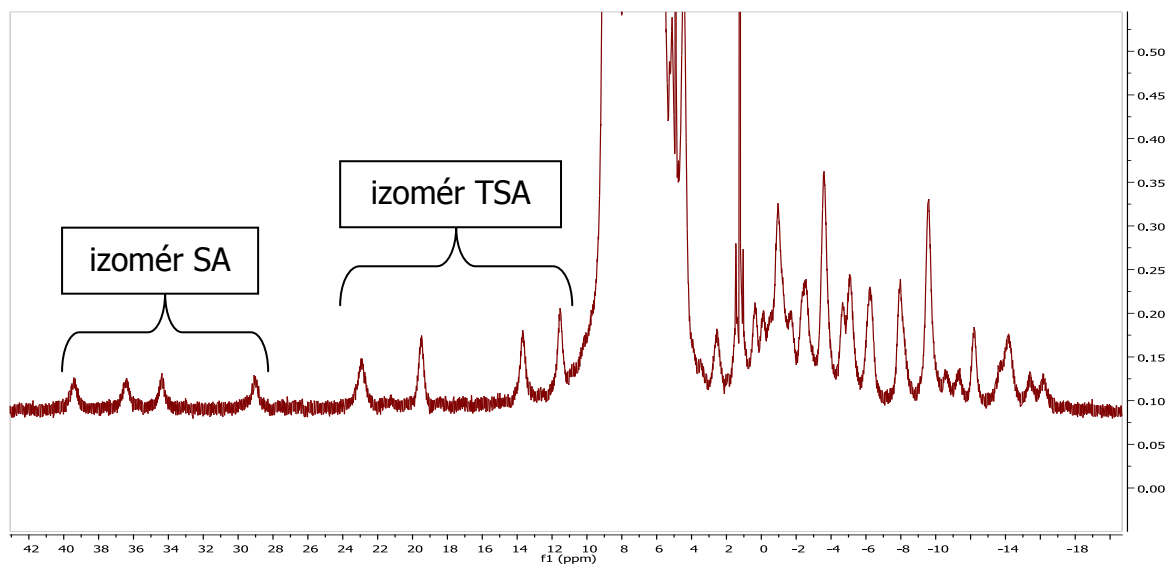
19. **Bjørnerud, A.** MR Contrast Agents. [aut.] A. Bjornerud. *The Physics of Magnetic Resonance Imaging*, 2008, s. 129–153.
20. **Lancashire, R. J.** Magnetic Moment Calculations from UWI, Mona, JAMAICA. *The University of the West Indies at Mona, Jamaica; The Department of Chemistry*. [Online] 15. 1 2003. [Datum: 12. 5 2013.] <http://wwwchem.uwimona.edu.jm/spectra/MagMom.html>.
21. **Idee, J.-M., a iní.** Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2006, Zv. 20, 6, s. 563–576.
22. **Bousquet, J. C., a iní.** Gd-DOTA: characterization of a new paramagnetic complex. *Radiology*, 1988, Zv. 166, 3, s. 693–698.
23. **Moeller, P., Morteani, G. a Dulski, P.** Anomalous Gadolinium, Cerium, and Yttrium Contents in the Adige and Isarco River Waters and in the Water of Their Tributaries (Provinces Trento and Bolzano/Bozen, NE Italy). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 2003, Zv. 31, 3, s. 225–239.
24. **Bellin, M. F., Vasile, M. a Morel-Precetti, S.** Currently used non-specific extracellular MR contrast media. *European Radiology*, 2003, Zv. 13, 12, s. 2688–2698.
25. **Bruecher, E. a Sherry, A. D.** Stability and toxicity of contrast agents. [aut.] A. E. Merbach a E. Toth. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, 2001, s. 243–279.
26. **Caravan, P., a iní.** Thermodynamic Stability and Kinetic Inertness of MS-325, a New Blood Pool Agent for Magnetic Resonance Imaging. *Inorganic Chemistry*, 2001, Zv. 40, 9, s. 2170–2176.
27. **Caravan, P., a iní.** Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chemical Reviews*, 1999, Zv. 99, 9, s. 2293–2352.
28. **Moreau, J., a iní.** Complexing mechanism of the lanthanide cations Eu<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup>, and Tb<sup>3+</sup> with 1,4,7,10-tetrakis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (dota)-characterization of three successive complexing phases. *Chemistry – A European Journal*, 2004, Zv. 10, 20, s. 5218–5232.
29. **Schmitt-Willich, H., a iní.** Synthesis and physicochemical characterization of a new gadolinium chelate: the liver-specific magnetic resonance imaging contrast agent Gd-EOB-DTPA. *Inorganic Chemistry*, 1999, Zv. 38, 6, s. 1134–1144.
30. **Uggeri, F., a iní.** Novel contrast agents for magnetic resonance imaging. Synthesis and characterization of the ligand BOPTA and its Ln(III) complexes (Ln = Gd, La, Lu). *Inorganic Chemistry*, 1995, Zv. 34, 3, s. 633–642.
31. **Brittain, Harry G., Mantha, S. a Tweedle, Michael F.** Effect of Oligomerization on the Solvent Water Proton Longitudinal Relaxation Rates of Lanthanide EDTA Complexes. *Journal of the Less-Common Metals*, 1986, Zv. 126, s. 339–342.
32. **Weinmann, H.-J., a iní.** Characteristics of Gadolinium-DTPA Complex: A Potential NMR Contrast Agent. *American Journal of Roentgenology*, 1984, Zv. 142, 3, s. 619–624.
33. **Werner, E. J., a iní.** High-Relaxivity MRI Contrast Agents: Where Coordination Chemistry Meets Medical Imaging. *Angewandte Chemie, International Edition*, 2008, Zv. 47, 45, s. 8568–8580.
34. **Livramento, J. B., a iní.** A benzene-core trinuclear GdIII complex: towards the optimization of relaxivity for MRI contrast agent applications at high magnetic field. *Dalton Transactions*, 2008, 9, s. 1195–1202.
35. **Gugliotta, G., a iní.** Fast and easy access to efficient bifunctional chelators for MRI applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, Zv. 19, 13, s. 3442–3444.
36. **Tweedle, M. F.** Physicochemical properties of gadoteridol and other magnetic resonance contrast agents. *Investigative Radiology*. 1992, Zv. 27, 1, s. 2–6.
37. **Tweedle, M. F., a iní.** Reaction of gadolinium chelates with endogenously available ions. *Magnetic Resonance Imaging*, 1991, Zv. 9, 3, s. 409–415.
38. **Niendorf, H.P. a Seifert, W.** Serum iron and serum bilirubin after administration of Gd-DTPA in healthy volunteers. *Investigative Radiology*, 1988, Zv. 23, 1, s. S275–S280.

39. **Marckmann, P., a iní.** Nephrogenic Systemic Fibrosis: Suspected Causative Role of Gadodiamide Used for Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2006, *Zv.* 17, 9, s. 2359–2362.
40. **Hermann, P., a iní.** Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. *Dalton Transactions*, 2008, 23, s. 3027–3047.
41. **Kotkova, Z., a iní.** Gadolinium complexes of monophosphinic acid DOTA derivatives conjugated to cyclodextrin scaffolds: efficient MRI contrast agents for higher magnetic fields. *Dalton Transactions*, 2012, *Zv.* 41, 43, s. 13509–13519.
42. **Strandberg, E. a Westlund, P.-O.** 1H NMRD Profile and ESR Lineshape Calculation for an Isotropic Electron Spin System with  $S = 7/2$ . *Journal of Magnetic Resonance*, 1996, *Zv.* 122, 2, s. 179–191.
43. **Botta, M.** Second Coordination Sphere Water Molecules and Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Implications for MRI Contrast Agents. *European Journal Inorganic Chemistry*, 2000, 3, s. 399–407.
44. **Vander Elst, L., a iní.** In vitro Relaxometric and Luminescence Characterization of P792 (Gadomelitol, Vistarem®), an Efficient and Rapid Clearance Blood Pool MRI Contrast Agent. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2005, 6, s. 1142–1148.
45. **Zong, Y., a iní.** Structural effect on degradability and in vivo contrast enhancement of polydisulfide Gd(III) complexes as biodegradable macromolecular MRI contrast agents. *Magnetic Resonance Imaging*, 2009, *Zv.* 27, 4, s. 503–511.
46. **Henoumont, C., a iní.** Study of non-covalent interactions between MRI contrast agents and human serum albumin by NMR diffusometry. *Journal Biological Inorganic Chemistry*, 2009, *Zv.* 14, 5, s. 683–691.
47. **Jung, K.-H., a iní.** Gd Complexes of Macrocyclic Diethylenetriaminepentaacetic Acid (DTPA) Biphenyl-2,2'-bisamides as Strong Blood-Pool Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Journal Medicinal Chemistry*, 2011, *Zv.* 54, 15, s. 5385–5394.
48. **Kiryu, S., a iní.** Evaluation of gadoxetate disodium as a contrast agent for mouse liver imaging: comparison with gadobenate dimeglumine. *Magnetic Resonance Imaging*, 2009, *Zv.* 27, 1, s. 101–107.
49. **CHMP.** Vasovist, INN-Gadofosvese. *European Public Assessment Report*. s.l. : European Medicines Agency, 27. 10 2005.
50. **Jagadish, B., a iní.** On the synthesis of 1,4,7-tris(tert-butoxycarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane. *Tetrahedron Letters*, 2011, *Zv.* 52, 17, s. 2058–2061.
51. **Kotek, J., a iní.** Lanthanide(III) Complexes of Novel Mixed Carboxylic-Phosphorus Acid Derivatives of Diethylenetriamine: A step towards More Efficient MRI Contrast Agents. *Chemistry – A European Journal*, 2003, *Zv.* 9, 23, s. 5899–5915.
52. **Beeby, A., a iní.** Non-radiative deactivation of the excited states of europium, terbium and ytterbium complexes by proximate energy-matched OH, NH and CH oscillators: an improved luminescence method for establishing solution hydration states. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry*, 1999, 3, s. 493–504.
53. **Corsi, D. M., a iní.** Determination of paramagnetic lanthanide(III) concentrations from bulk magnetic susceptibility shifts in NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2001, *Zv.* 39, s. 723–726.
54. **Jastrzebska, B., a iní.** New Enzyme-Activated Solubility-Switchable Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging: From Synthesis to in Vivo Imaging. *Journal Medicinal Chemistry*, 2009, *Zv.* 52, 6, s. 1576–1581.
55. **Kotková, Z., a iní.** Lanthanide(III) Complexes of Phosphorus Acid Analogues of H4DOTA as Model Compounds for the Evaluation of the Second-Sphere Hydration. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2009, 1, s. 119–136.

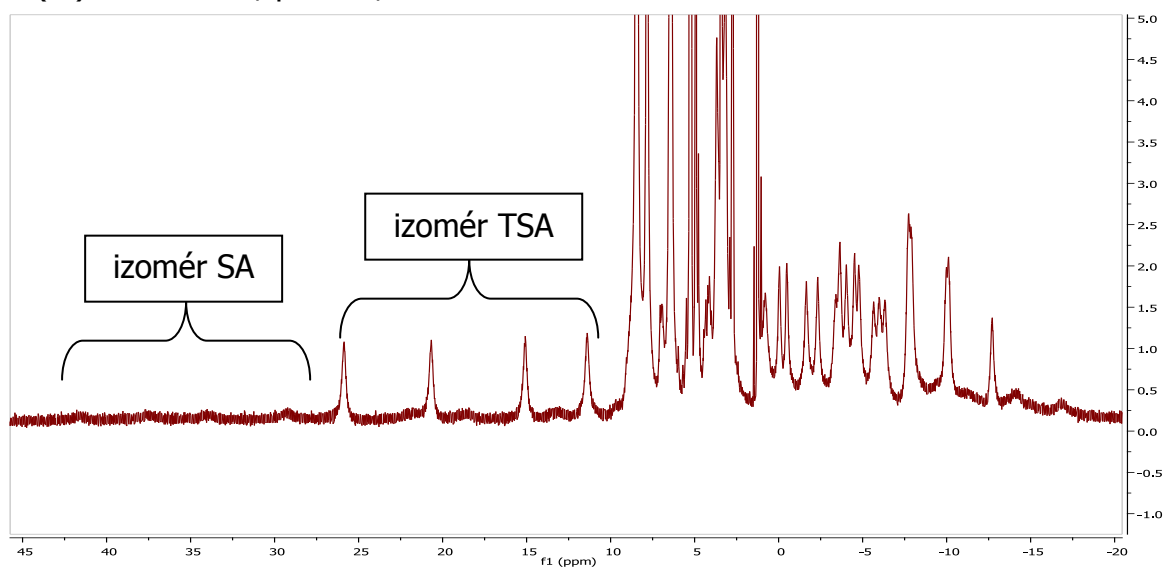
## 8. Príloha

### 8.1 $^1\text{H-NMR}$ spektrá Ln(III) komplexov $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$

$\text{Eu(III)-DO3AP}^{\text{DBAM}}$ ; pH = 5,63

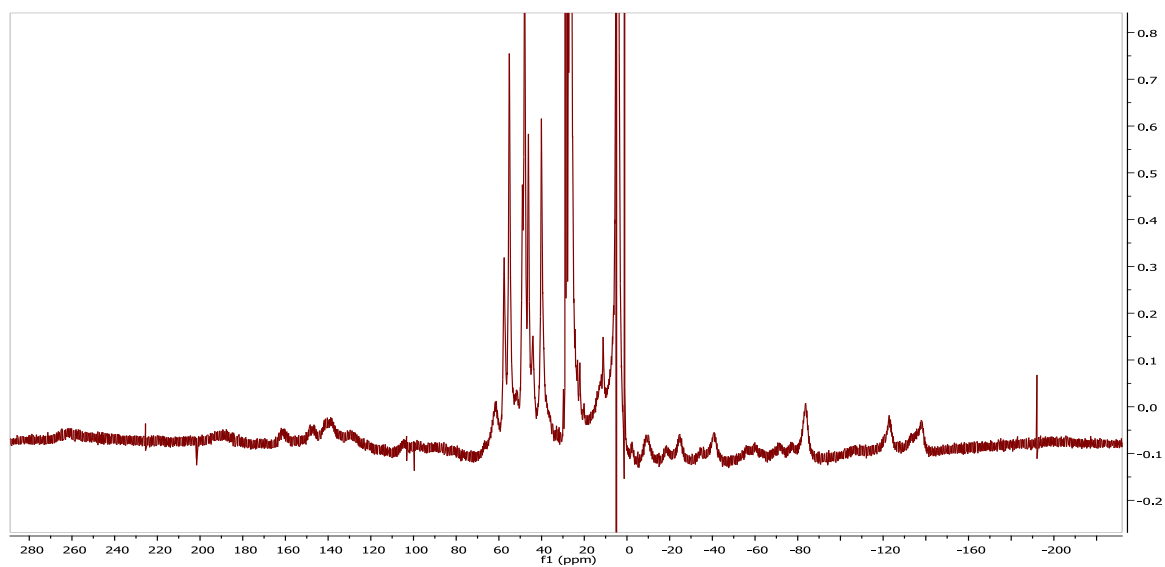


$\text{Eu(III)-DO3AP}^{\text{DBAM}}$ ; pH = 8,08

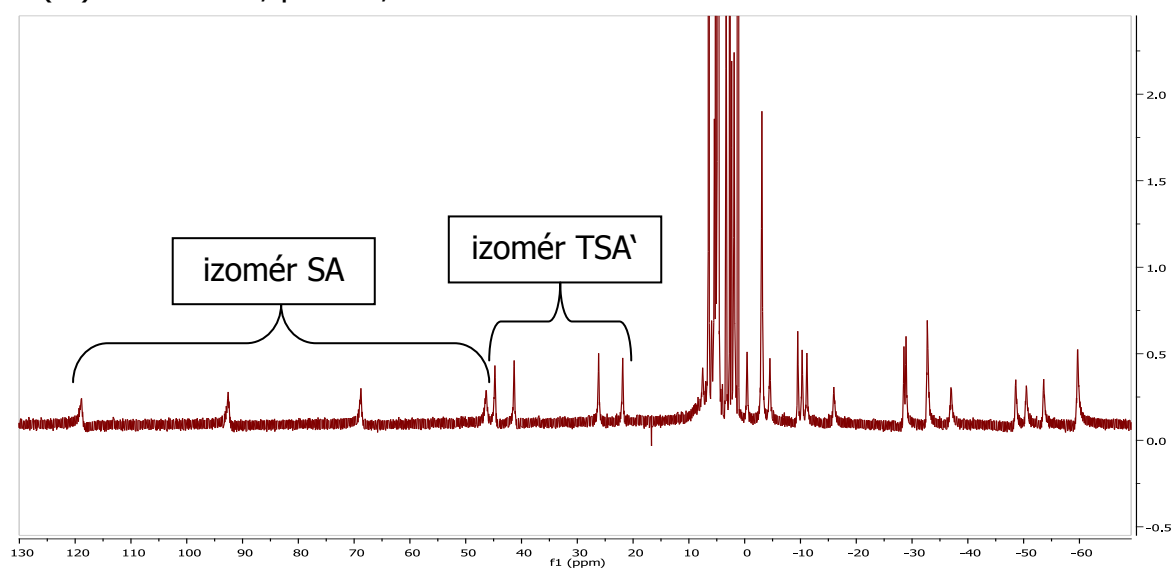




Tb(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup>; pH = 8,18



Yb(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup>; pH = 8,72



## 8.2 NMR titrácie

### 8.2.1 DO3AP<sup>DBAM</sup>

Tabuľka 22:

<b><sup>1</sup>H-NMR titrácia DO3AP<sup>DBAM</sup> – prvá</b>								
<b>pH</b>	<b>Ph</b>	<b>Bn</b>	<b>Ac-1</b>	<b>Ac-2</b>	<b>K Bn</b>	<b>K Cyk</b>	<b>Cyk1</b>	<b>Cyk2</b>
1,45	7,55	4,52	3,82	3,80	3,37	3,05	3,29	3,23
1,80	7,54	4,50	3,85	3,71	3,40	3,04	3,24	3,29
2,22	7,53	4,47	3,88	3,60	3,41	3,04	3,17	3,46
2,61	7,51	4,45	3,89	3,53	3,42	3,03	3,13	3,51
3,08	7,52	4,44	3,90	3,49	3,43	3,02	3,10	3,59
3,57	7,52	4,43	3,89	3,45	3,42	3,01	3,08	3,60
3,95	7,51	4,43	3,87	3,42	3,42	3,00	3,07	3,60
4,23	7,51	4,44	3,86	3,38	3,42	2,98	3,06	3,58
4,62	7,53	4,44	3,87	3,29	3,42	2,96	3,07	3,58
4,93	7,50	4,44	3,84	3,30	3,40	2,95	3,04	3,50
5,16	7,52	4,44	3,85	3,30	3,41	2,94	3,05	3,50
5,46	7,53	4,43	3,84	3,28	3,39	2,94	3,04	3,49
5,95	7,52	4,38	3,82	3,29	3,34	2,94	3,05	3,41
6,32	7,48	4,26	3,79	3,32	3,27	2,94	3,06	3,36
6,79	7,48	4,12	3,72	3,36	3,11	2,96	3,15	3,32
7,20	7,45	3,95	3,66	3,42	2,89	2,99	3,16	3,28
7,55	7,44	3,84	3,62	3,46	2,78	3,00	3,18	3,27
7,90	7,42	3,77	3,59	3,47	2,71	3,00	3,16	3,25
8,22	7,41	3,74	3,57	3,48	2,67	2,99	3,18	3,22
8,63	7,41	3,71	3,52	3,45	2,65	2,97	3,10	3,16
8,96	7,41	3,70	3,45	3,40	2,62	2,91	3,03	3,03
9,29	7,41	3,70	3,37	3,34	2,64	2,88	2,95	2,95
9,62	7,41	3,70	3,26	3,26	2,63	2,88	2,82	2,82
9,96	7,41	3,69	3,17	3,20	2,62	2,80	2,74	2,74
10,53	7,41	3,69	3,10	3,17	2,61	2,81	2,69	2,69
11,19	7,40	3,69	3,07	3,16	2,60	2,81	2,67	2,67
11,45	7,40	3,69	3,07	3,16	2,60	2,81	2,67	2,67
11,88	7,40	3,69	3,07	3,16	2,60	2,81	2,66	2,66
12,16	7,40	3,69	3,07	3,16	2,61	2,80	2,65	2,65
12,43	7,40	3,68	3,06	3,16	2,58	2,80	2,65	2,65

Tabuľka 23:

<b><sup>1</sup>H-NMR titrácia DO3AP<sup>DBAM</sup> – druhá</b>								
<b>pH</b>	<b>Ph</b>	<b>Bn</b>	<b>Ac-1</b>	<b>Ac-2</b>	<b>K Bn</b>	<b>K Cyk</b>	<b>Cyk1</b>	<b>Cyk2</b>
1,00	7,54	4,53	3,79	3,93	3,39	3,07	3,37	3,19
1,32	7,53	4,52	3,81	3,81	3,36	3,05	3,29	3,20
1,66	7,52	4,48	3,84	3,69	3,37	3,02	3,22	3,26
2,10	7,51	4,46	3,87	3,59	3,39	3,02	3,15	3,38
2,41	7,51	4,44	3,88	3,54	3,41	3,02	3,11	3,48
2,74	7,50	4,43	3,89	3,50	3,42	3,01	3,09	3,54
3,01	7,50	4,43	3,88	3,48	3,42	3,00	3,08	3,59
3,34	7,49	4,42	3,88	3,46	3,44	3,00	3,07	3,60
3,59	7,51	4,42	3,88	3,44	3,42	2,99	3,06	3,60
3,75	7,51	4,42	3,87	3,42	3,42	2,99	3,07	3,59
3,98	7,51	4,42	3,87	3,40	3,42	2,98	3,06	3,58
4,25	7,51	4,43	3,86	3,36	3,42	2,96	3,05	3,56
4,63	7,52	4,43	3,85	3,32	3,41	2,94	3,05	3,56
5,02	7,52	4,43	3,84	3,29	3,40	2,93	3,05	3,52
5,48	7,52	4,41	3,83	3,28	3,37	2,92	3,03	3,49
6,02	7,53	4,39	3,83	3,31	3,35	2,94	3,07	3,42
6,30	7,52	4,31	3,80	3,33	3,26	2,95	3,08	3,39
6,67	7,49	4,17	3,75	3,37	3,18	2,96	3,12	3,35
6,99	7,47	4,03	3,70	3,42	2,99	2,98	3,16	3,30
7,52	7,42	3,85	3,62	3,47	2,79	3,00	3,19	3,28
8,00	7,42	3,77	3,58	3,49	2,71	3,00	3,16	3,24
8,36	7,41	3,74	3,54	3,47	2,68	2,98	3,13	3,19
8,69	7,40	3,72	3,50	3,44	2,66	2,95	3,09	3,12
9,00	7,40	3,72	3,43	3,38	2,66	2,91	3,03	3,03
9,48	7,39	3,70	3,27	3,27	2,64	2,85	2,84	2,84
9,89	7,39	3,70	3,17	3,21	2,63	2,80	2,77	2,77
10,27	7,39	3,70	3,12	3,20	2,62	2,82	2,72	2,72
10,88	7,39	3,70	3,09	3,18	2,61	2,81	2,68	2,68
10,95	7,38	3,69	3,10	3,19	2,61	2,81	2,70	2,70
11,37	7,39	3,70	3,09	3,19	2,61	2,82	2,68	2,68
11,72	7,39	3,70	3,08	3,18	2,61	2,81	2,67	2,67
12,08	7,39	3,70	3,08	3,18	2,61	2,81	2,67	2,67
12,33	7,39	3,69	3,08	3,18	2,61	2,81	2,66	2,66

Tabuľka 24:

<b><sup>31</sup>P-NMR titrácia DO3AP<sup>DBAM</sup> – prvá</b>					
<b>pH</b>	<b>P</b>	<b>pH</b>	<b>P</b>	<b>pH</b>	<b>P</b>
<b>1,45</b>	19,88	<b>5,16</b>	25,32	<b>8,96</b>	33,59
<b>1,80</b>	21,20	<b>5,46</b>	25,51	<b>9,29</b>	34,43
<b>2,22</b>	22,89	<b>5,95</b>	26,02	<b>9,62</b>	35,63
<b>2,61</b>	23,88	<b>6,32</b>	26,82	<b>9,96</b>	36,89
<b>3,08</b>	24,62	<b>6,79</b>	28,45	<b>10,53</b>	37,83
<b>3,57</b>	24,89	<b>7,20</b>	30,40	<b>11,19</b>	38,23
<b>3,95</b>	25,04	<b>7,55</b>	31,48	<b>11,45</b>	38,28
<b>4,23</b>	25,11	<b>7,90</b>	32,17	<b>11,88</b>	38,31
<b>4,62</b>	25,20	<b>8,22</b>	32,28	<b>12,16</b>	38,32
<b>4,93</b>	25,28	<b>8,63</b>	33,06	<b>12,43</b>	38,31

Tabuľka 25:

<b><sup>31</sup>P-NMR titrácia DO3AP<sup>DBAM</sup> – druhá</b>					
<b>pH</b>	<b>P</b>	<b>pH</b>	<b>P</b>	<b>pH</b>	<b>P</b>
<b>1,00</b>	18,30	<b>4,25</b>	24,97	<b>8,69</b>	32,79
<b>1,32</b>	18,96	<b>4,63</b>	25,05	<b>9,00</b>	33,16
<b>1,66</b>	21,05	<b>5,02</b>	25,16	<b>9,48</b>	35,00
<b>2,10</b>	22,57	<b>5,48</b>	25,39	<b>9,89</b>	36,88
<b>2,41</b>	23,36	<b>6,02</b>	25,91	<b>10,27</b>	37,50
<b>2,74</b>	24,16	<b>6,30</b>	26,66	<b>10,88</b>	37,94
<b>3,01</b>	24,37	<b>6,67</b>	28,06	<b>10,95</b>	37,71
<b>3,34</b>	25,04	<b>6,99</b>	29,66	<b>11,37</b>	38,09
<b>3,59</b>	24,78	<b>7,52</b>	31,40	<b>11,72</b>	38,12
<b>3,75</b>	24,83	<b>8,00</b>	32,09	<b>12,08</b>	38,12
<b>3,98</b>	24,90	<b>8,36</b>	32,46	<b>12,33</b>	38,10

### 8.2.2 $^{31}\text{P}$ -NMR titrácie komplexov $\text{Ln(III)}\text{-DO3AP}^{\text{DBAM}}$

Tabuľka 26:

$^{31}\text{P}$ -NMR titrácia $\text{Eu(III)}\text{-DO3AP}^{\text{DBAM}}$								
pH	SA	TSA	pH	SA	TSA	pH	SA	TSA
1,66	60,52	68,45	4,23	60,35	67,54	7,62	75,25	86,47
1,96	60,35	68,21	4,83	61,04	67,95	7,91	75,33	86,96
2,27	60,26	67,80	5,31	62,26	68,69	8,22	75,46	87,06
2,66	60,27	67,79	5,63	65,98	71,48	8,47	75,50	87,03
2,88	60,19	67,73	5,96	69,73	74,82	8,72	75,41	87,12
3,10	60,14	67,71	6,20	70,94	76,43	8,96	75,45	87,33
3,42	60,26	67,65	6,45	72,85	79,29	9,31	75,34	87,04
3,68	60,38	67,90	6,80	74,22	82,61	9,62	75,31	87,22
4,04	60,37	67,96	7,18	74,88	84,68	9,96	75,35	87,03

Tabuľka 27:

$^{31}\text{P}$ -NMR titrácia $\text{Yb(III)}\text{-DO3AP}^{\text{DBAM}}$					
pH	P	pH	P	pH	P
1,60	-47,74	4,90	-46,95	7,35	-40,97
1,98	-47,61	5,27	-46,42	7,59	-40,94
2,51	-47,44	5,57	-45,68	7,98	-40,88
2,96	-47,39	5,96	-44,68	8,36	-40,86
3,34	-47,40	6,25	-43,41	8,66	-40,81
3,72	-47,43	6,41	-42,20	9,03	-40,84
4,05	-47,30	6,67	-41,50	9,36	-40,92
4,42	-47,22	6,97	-41,18	9,63	-40,99

### 8.3 Meranie časov $T_1$ Gd(III)-D03AP<sup>DBAM</sup>

Tabuľka 28:

<b>Koncentračná závislosť <math>r_1</math> – 37 °C; 0,5 T</b>				
<b><math>c</math> / mm</b>	<b><math>T_1</math> / ms</b>	<b>Chyba / ms</b>	<b><math>R_1</math> / s<sup>-1</sup></b>	<b><math>r_1</math> / mm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup></b>
0,00	2460,0	10,0	0,41	–
0,05	763,0	3,0	1,31	18,09
0,10	465,0	1,0	2,15	17,44
0,15	335,0	1,0	2,99	16,66
0,20	272,2	0,7	3,67	16,31
0,40	150,0	0,6	6,67	15,66
0,56	107,3	0,3	9,32	15,79
0,78	79,6	0,2	12,56	15,52
1,00	62,5	0,3	16,00	15,59
2,08	35,2	0,1	28,41	13,49
4,03	20,1	0,5	49,75	12,23
7,81	11,6	0,5	86,21	10,98

Tabuľka 29:

<b>Koncentračná závislosť <math>r_1</math> – 37 °C; 1,0 T</b>				
<b><math>c</math> / mm</b>	<b><math>T_1</math> / ms</b>	<b>Chyba / ms</b>	<b><math>R_1</math> / s<sup>-1</sup></b>	<b><math>r_1</math> / mm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup></b>
0,00	2640,0	30,0	0,38	–
0,05	896,0	6,0	1,12	14,75
0,10	555,0	2,0	1,80	14,23
0,15	397,0	2,0	2,52	13,82
0,20	321,0	2,0	3,12	13,66
0,40	179,3	0,4	5,58	13,00
0,56	127,7	0,4	7,83	13,20
0,78	94,6	0,5	10,57	13,01
1,00	73,8	0,2	13,55	13,17
2,08	41,1	0,1	24,33	11,54
4,03	23,8	0,1	42,02	10,32
7,81	13,5	0,1	74,02	9,43

Tabuľka 30:

<b>pH závislosť <math>r_1</math> bez BSA – 37 °C; 0,5 T</b>				
<b>pH</b>	<b><math>T_1</math> / ms</b>	<b>Chyba / ms</b>	<b><math>R_1</math> / s<sup>-1</sup></b>	<b><math>r_1</math> / mm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup></b>
2,56	179,6	0,7	5,57	6,18
3,01	180,6	0,4	5,54	6,14
3,46	182,8	0,4	5,47	6,06
3,99	181,5	0,4	5,51	6,11
4,46	184,3	0,9	5,43	6,01
5,03	185,3	0,8	5,40	5,98
5,52	192,0	0,5	5,21	5,76
6,03	199,0	0,9	5,03	5,54
6,51	210,4	0,9	4,75	5,23
6,84	211,0	0,5	4,74	5,21
7,00	209,6	0,6	4,77	5,25
7,51	212,9	1,0	4,70	5,16
7,95	216,6	0,8	4,62	5,07
8,65	215,0	1,0	4,65	5,11
9,34	217,0	0,6	4,61	5,06
10,05	220,0	1,0	4,55	4,98
H <sub>2</sub> O	3670,0	10,0	0,27	–

Tabuľka 31:

<b>pH závislosť <math>r_1</math> bez BSA – 37 °C; 1,0 T</b>				
<b>pH</b>	<b><math>T_1</math> / ms</b>	<b>Chyba / ms</b>	<b><math>R_1</math> / s<sup>-1</sup></b>	<b><math>r_1</math> / mm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup></b>
2,56	268,7	0,2	3,72	4,05
3,01	265,2	0,4	3,77	4,11
3,46	263,8	0,6	3,79	4,13
3,99	263,0	2,0	3,80	4,14
4,46	265,6	0,6	3,77	4,10
5,03	269,5	1,0	3,71	4,04
5,52	279,7	0,6	3,58	3,88
6,03	296,0	0,3	3,38	3,65
6,51	301,6	0,7	3,32	3,58
6,84	308,6	1,0	3,24	3,49
7,00	302,5	0,9	3,31	3,56
7,51	307,8	0,7	3,25	3,50
7,95	313,0	0,6	3,19	3,44
8,65	309,0	2,0	3,24	3,48
9,34	310,8	0,7	3,22	3,46
10,05	315,0	1,0	3,17	3,41
H <sub>2</sub> O	4000,0	20,0	0,25	–

Tabuľka 32:

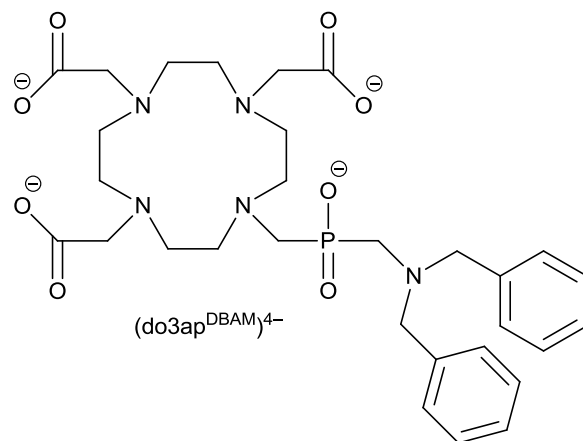
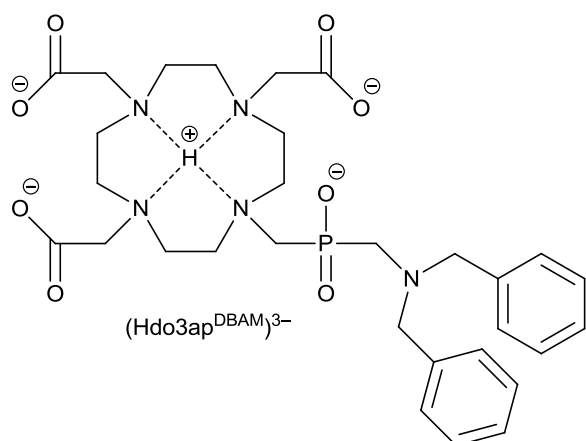
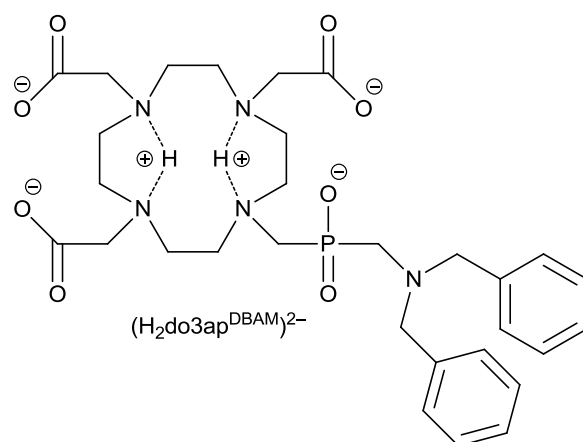
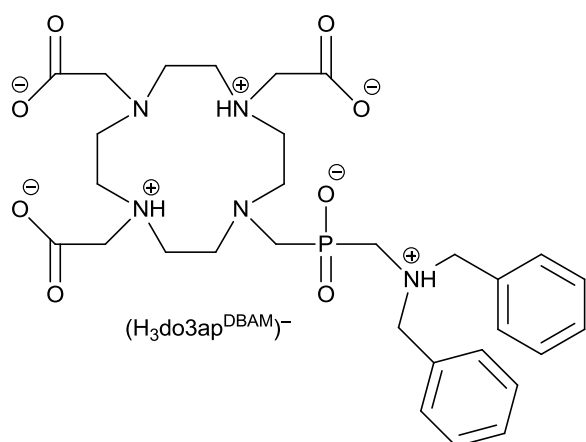
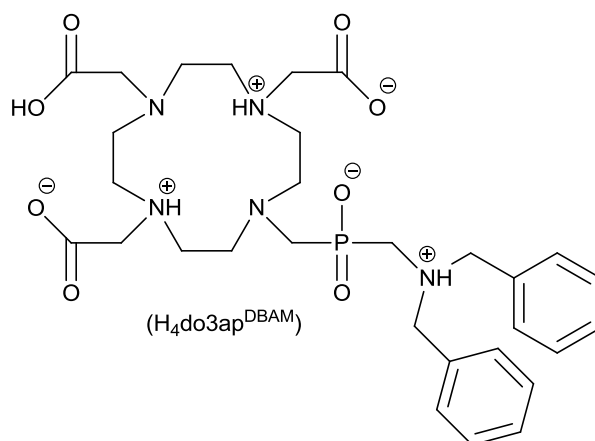
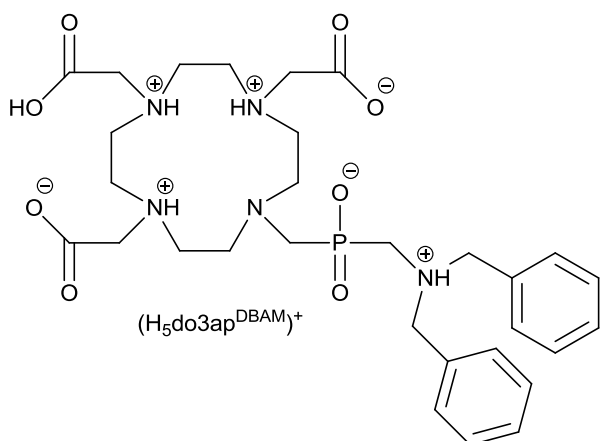
<b>pH závislosť <math>r_1</math> s BSA – 37 °C; 0,5 T</b>				
<b>pH</b>	<b><math>T_1</math> / ms</b>	<b>Chyba / ms</b>	<b><math>R_1</math> / s<sup>-1</sup></b>	<b><math>r_1</math> / mm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup></b>
2,49	149,2	0,9	6,70	8,04
3,10	143,0	1,0	6,99	8,41
3,48	150,8	0,5	6,63	7,94
4,09	143,1	0,8	6,99	8,40
4,54	137,7	0,8	7,26	8,75
5,17	121,3	0,4	8,24	10,00
5,61	104,1	0,4	9,61	11,74
6,27	87,8	0,2	11,39	14,02
6,59	86,1	0,4	11,61	14,30
7,00	80,4	0,4	12,44	15,36
7,43	81,7	0,3	12,24	15,10
7,90	76,7	0,4	13,04	16,12
8,40	73,9	0,2	13,53	16,75
9,01	78,4	0,4	12,76	15,76
9,46	81,9	0,4	12,21	15,07
10,21	82,1	0,2	12,18	15,03
4% BSA	2460,0	10,0	0,41	–

Tabuľka 33:

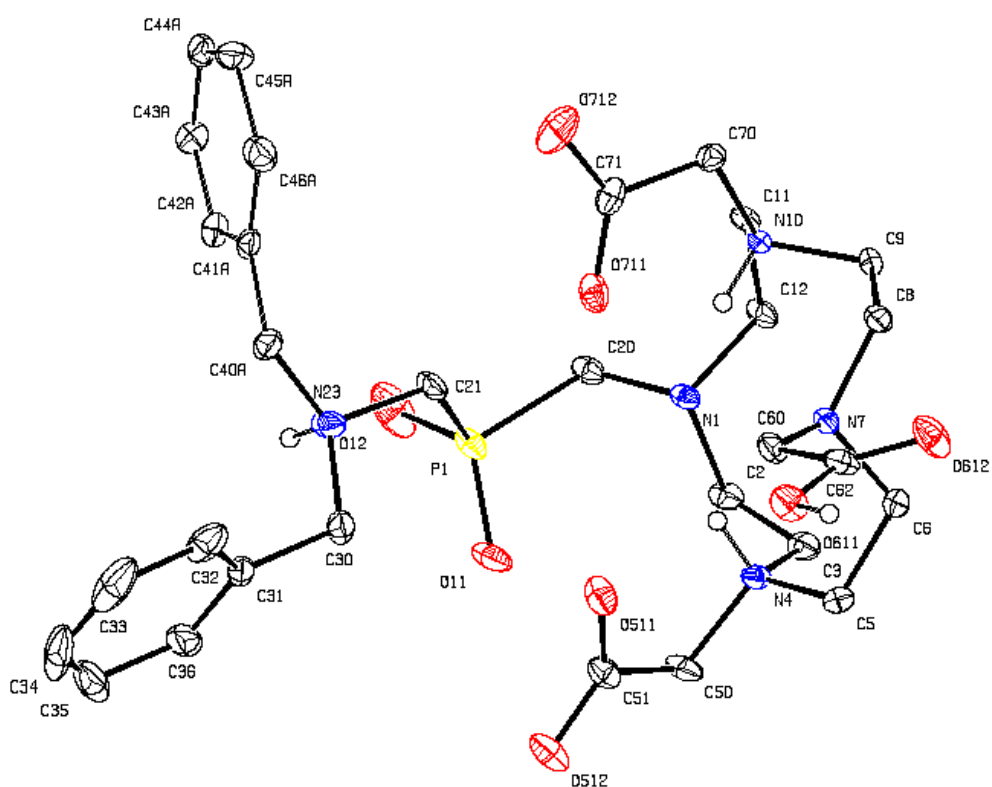
<b>pH závislosť <math>r_1</math> s BSA – 37 °C; 1,0 T</b>				
<b>pH</b>	<b><math>T_1</math> / ms</b>	<b>Chyba / ms</b>	<b><math>R_1</math> / s<sup>-1</sup></b>	<b><math>r_1</math> / mm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup></b>
2,49	172,0	1,0	5,81	6,94
3,10	166,5	0,5	6,01	7,18
3,48	170,0	1,0	5,88	7,02
4,09	163,3	0,7	6,12	7,33
4,54	157,9	0,6	6,33	7,60
5,17	140,3	0,6	7,13	8,61
5,61	122,1	0,4	8,19	9,97
6,27	103,2	0,3	9,69	11,88
6,59	102,3	0,3	9,78	11,99
7,00	98,3	0,4	10,17	12,50
7,43	98,5	0,4	10,15	12,47
7,90	92,9	0,3	10,76	13,26
8,40	92,6	0,3	10,80	13,30
9,01	99,6	0,3	10,04	12,33
9,46	103,5	0,4	9,66	11,85
10,21	105,0	0,5	9,52	11,67
4% BSA	2640,0	30,0	0,38	–



## 8.4 Rôzne protonizované molekuly DO3AP<sup>DBAM</sup>



## 8.5 RTG štruktúra DO3A<sup>PDBAM</sup>

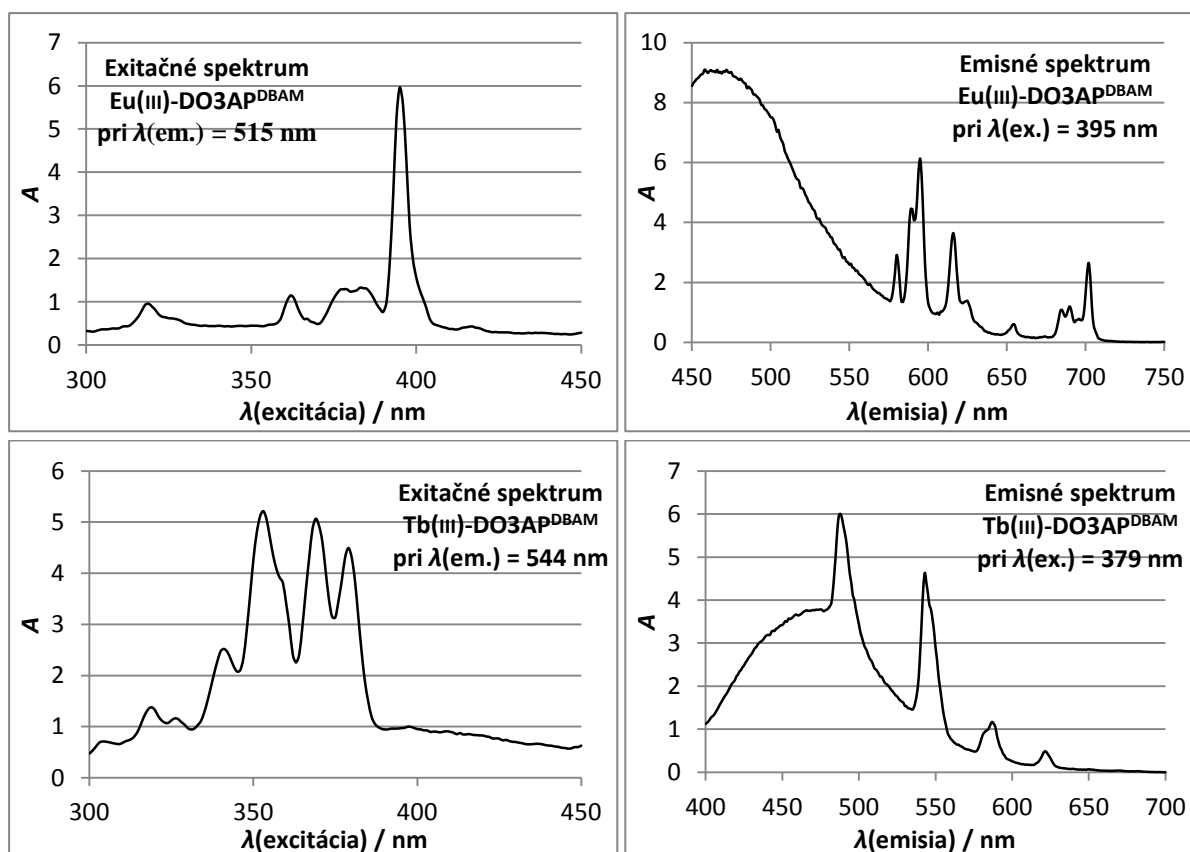


Tabuľka 34:

RTG <sup>a</sup> údaje kryštálu DO3AP <sup>DBAM</sup>			
Látka	Vzorec	$M_r$	Sústava
DO3AP <sup>DBAM</sup> · 7,4 H <sub>2</sub> O	C <sub>30</sub> H <sub>58,8</sub> N <sub>5</sub> O <sub>15,4</sub> P	766,99	triklinická
$a / \text{Å}$	$b / \text{Å}$	$c / \text{Å}$	$U / \text{Å}^3$
9,9765(2)	12,1735(3)	17,7149(4)	1865,68(7)
$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$Z$
108,402(1)	90,497(1)	112,479(1)	2
$R_1$		$wR_2$	
0,0682		0,2152	

<sup>a</sup> Merané pri teplote 150(2) K

## 8.6 Luminiscenčné merania



## 8.7 Rovnica pre výpočet koncentrácie z BMS

$$c = \frac{2,84^2 \Delta\delta T}{4\pi s \mu_{\text{eff}}^2 10^3} \quad [14]$$

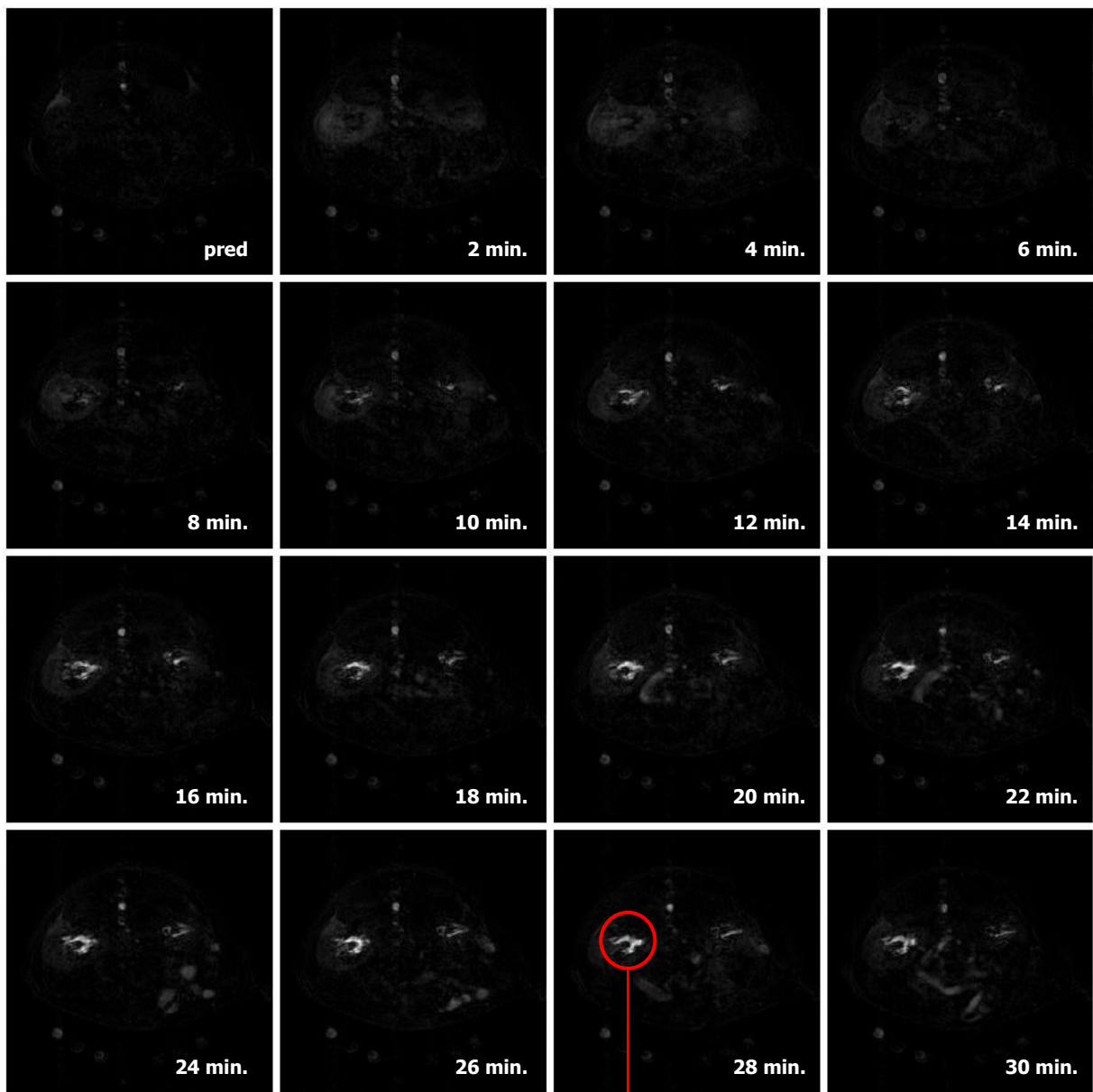
kde  $c$  je koncentrácia paramagnetika v roztoku v M,  $\Delta\delta$  je rozdiel chemických posunov signálov  $t\text{BuOH}$  s a bez prítomnosti paramagnetika,  $T$  je termodynamická teplota,  $s$  je geometrický faktor (pre cylinder rovný 1/3) a  $\mu_{\text{eff}}$  je efektívny magnetický moment paramagnetika (pre Gd(III) rovný 7,94).

Prevzaté z publikácie – (53).

## 8.8 Snímky z MRI experimentu

Gadolinitý komplex ligandu DO3AP<sup>DBAM</sup> bol injekčne podaný testovanému potkanovi a boli vyhotovené MRI skeny (*Obr. 10*) kolmé v oblasti trupu (v oblasti obličiek a pečene). Pre porovnanie je uvedená i séria MRI skenov druhého testovaného potkana po intravenózne aplikácii kontrastnej látky Ablavar<sup>®</sup> (Vasovist<sup>®</sup>) – *Obr. 9*. Prvý obrázok zo série ukazuje kontrast pred podaním kontrastnej látky a každý ďalší bol vyhotovený po 2 minútach (celkovo je zachytených 30 minút po podaní kontrastnej látky).

Obr. 9 – MRI snímky kontrastnej látky Vasovist® *in vivo*



Obr. 10 – MRI snímky kontrastnej látky Gd(III)-DO3AP<sup>DBAM</sup> *in vivo*

