

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANORGANICKEJ CHÉMIE

Anorganická chemie



MRI kontrastné látky pre angiografické aplikácie “MRI contrast agents for angiography”

DIPLOMOVÁ PRÁCA

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Kotka, Ph.D., a že jsem všechny použité citace řádně označil a uvedl všechny použité zdroje.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné jen po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne:

Podpis

Abstrakt

Súčasná diagnostická metóda magnetickej tomografie (MRI) používa kontrastné látky typu T_1 založené na komplexoch Gd^{3+} . Pre vysokú toxicitu voľného Gd^{3+} sú požadované jeho komplexy, ktoré sú termodynamicky stále, kineticky inertné a ľahko vylúčiteľné. Táto práca zhŕňa poznatky o novej kontrastnej látke založenej na ligande typu DO_3AP^R (1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1-methyl(alkyl)fosfínová-4,7,10-trioctová kyselina) s postrannou hydrofóbnou dibenzylamino skupinou, ktorá je schopná reverzibilnej interakcie s makromolekulou sérového albumínu. Stabilita suprakomplexu je závislá na hodnote pH, t.j. na protonizácii pendantnej amino skupiny komplexu ($pK_A = 5,6$) a táto interakcia bola potvrdená z 1H -NMRD profilu a fluorescenčnou analýzou. Látka bola testovaná pre jej angiografické vlastnosti *in vivo* na modeli potkana. Ďalej boli charakterizované komplexy ligandu s niektorými trojmocnými lanthanoidmi (Nd^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Er^{3+}) rôznymi metódami (XRD, luminiscencie, UV-VIS, 1H -, ^{17}O - a ^{31}P -NMR). Po odstránení benzylových skupín bol získaný ligand, ktorého Ln^{3+} komplexy vykazujú pH závislý PARACEST efekt. Tieto komplexy boli charakterizované metódami XRD, luminiscenčne a 1H - a ^{31}P -NMR. Ďalej boli pripravené nové ligandy s modifikovanou dĺžkou pendantného ramena a s postrannou dibenzylamino skupinou, ktorej zmenená hodnota pK_A bola zistená NMR titračnou metódou.

Kľúčové slová

MR, gadolinium, makrocyclické ligandy, makrocyclické komplexy, albumín

Abstract

Modern diagnostic method magnetic resonance imaging (MRI) usually uses contrast agents T_1 -type, which are based on Gd^{3+} complexes. Due to severe toxicity of free Gd^{3+} , it is desired to have thermodynamically stable and kinetically inert complexes with fast elimination from the body. This work summarizes information about a novel contrast agent based on ligand DO_3A^P (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-methyl(alkyl)phosphinic-4,7,10-triacetic acid) with pendant hydrophobic dibenzylamino group which is able to interact hydrophobically with the macromolecule of serum albumin. The stability of supracomplex is dependent on pH value, *i.e.* on the protonation of the pendant amino group of the complex ($pK_A = 5.6$) and this interaction was confirmed from 1H -NMRD profile and fluorescent analysis. The compound was tested for its angiographic properties *in vivo* on rat model. Furthermore, other complexes of the ligand with trivalent lanthanides (Nd^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Er^{3+}) were characterized by various methods (XRD, luminescence, UV-VIS, 1H -, ^{17}O - and ^{31}P -NMR). The cleavage of the benzyl groups affords ligand whose Ln^{3+} complexes possess pH dependent PARACEST effect. These complexes were characterized by XRD, luminescence and 1H - and ^{31}P -NMR. Moreover, the novel ligands with modified length of pendant arm and with dibenzylamino group were synthesized. The altered value of pK_A was determined by NMR titration method.

Keywords

MRI, gadolinium, macrocyclic ligands, macrocyclic complexes, serum albumin

Obsah

1.	TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
1.1	Nukleárna magnetická tomografia.....	11
1.1.1	Diagnostická metóda a jej princípy	11
1.1.2	Kontrastná látka	15
1.2	T_1 -kontrastná látka	17
1.2.1	Ligand	17
1.2.1.1	Lineárne cheláty	18
1.2.1.2	Makrocyclické polyaminokarboxyláty.....	19
1.2.2	Termodynamická stabilita a kinetická inertnosť.....	22
1.3	Zjednodušená SBM teória	26
1.3.1	Parametre ovplyvňujúce relaxivitu	28
1.3.1.1	Počet priamo koordinovaných vôd (q).....	28
1.3.1.2	Rezidentný čas koordinovanej molekuly vody (τ_M)	30
1.3.1.3	Rotačný korelačný čas komplexu (τ_R)	31
1.3.1.4	Ostatné parametre.....	32
1.3.2	Získanie relaxačných parametrov T_1 -kontrastnej látky.....	33
1.3.2.1	$^1\text{H-NMRD}$ a $^{17}\text{O-NMR}$	33
1.3.2.2	Počet priamo koordinovaných vôd (q)	35
1.4	Vybrané špeciálne atribúty MR kontrastných látok.....	38
1.4.1	Interakcia s ľudským sérovým albumínom.....	38
1.4.2	pH a teplotné sondy	41
1.4.3	PARACEST magnetická tomografia.....	42
2.	CIEĽ DIPLOMOVEJ PRÁCE	45
3.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	46
3.1	Použité chemikálie	47
3.2	Použité prístroje	47
3.3	Syntéza látky L^M	50
3.4	Syntéza látky L^A	53
3.5	Syntéza látky L^{2M}	56
3.6	Syntéza látky L^{3M}	59
3.7	Syntéza látky L^E	60
3.8	Syntéza látky L^P	67
3.9	Postup, usporiadanie a vyhodnotenie spektrálnymi metódami.....	72
4.	VÝSLEDKY A DISKUSIA	75
4.1	Syntéza navrhnutých ligandov	76
4.1.1	Ligand s pendantnou dibenzylaminometylovou skupinou (L^M).....	76
4.1.2	Ligand s pendantnou aminometylovou skupinou (L^A)	77
4.1.3	Ligand s pendantnou dibenzylamino-1,1-etylovou skupinou (L^{2M})	77
4.1.4	Ligand s pendantnou dibenzylamino-2,2-propylovou skupinou (L^{3M}).....	78

4.1.5	Ligand s pendantnou dibenzylamino-1,2-ethylovou skupinou (L^E)	80
4.1.6	Ligand s pendantnou dibenzylamino-1,3-propylovou skupinou (L^P)	84
4.2	Stanovenie hodnôt pK_A NMR titráciou a potenciometricky	86
4.3	NMR titračné experimenty komplexov $Ln-L^M$ a $Ln-L^A$	98
4.4	Počet priamo koordinovaných vôd (q)	102
4.4.1	Luminiscenčné experimenty	102
4.4.2	Vysokorozlíšené UV-VIS experimenty europitých komplexov	104
4.4.3	Dyspróziom indukovaný ^{17}O -NMR posun komplexov $Dy-L$	108
4.5	Relaxometrické titračné a ^{17}O -NMR experimenty $Gd-L$	110
4.6	Fluorescenčné titračné experimenty komplexu $Gd-L^M$	116
4.7	Experimenty <i>in vivo</i>	123
4.8	Analýza pripravených monokryštálov ligandov a komplexov	124
4.9	PARACEST experimenty	128
5.	ZÁVER	131
	Poďakovanie	133
	Bibliografia	134
6.	PRÍLOHY	138
6.1	Klinicky používané T_1 -kontrastné látky	138
6.2	Charakterizácia látky Ablavar [®]	140
6.3	Kódové označenie molekúl	142
6.4	Stanovenie koncentrácie metódou BMS	143
6.5	Výber z NMR titračných spektier a vyhodnotení	144
6.6	Monokryštály charakterizované röntgenoštruktúrnou analýzou	146
6.7	Prezentácia výsledkov	153

Zoznam použitých skratiek

[¹⁵]aneN ₅	1,4,7,10,13-pentaazacyklopentadekán
¹ H-NMR	vodíková nukleárna magnetická rezonancia
¹³ C-NMR	uhlíková nukleárna magnetická rezonancia
¹⁷ O-NMR	kyslíková nukleárna magnetická rezonancia
³¹ P-NMR	fosforová nukleárna magnetická rezonancia
AAZTA	6-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepin-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina
ACN	acetonitril
ANS	amóniová soľ 8-anilíno-1-naftalénsulfónovej kyseliny
AV ČR	Akadémia vied Českej republiky
BMS	objemová magnetická susceptibilita (Bulk Magnetic Susceptibility)
BnBr	benzylbromid
BSA	hovádzí sérový albumín (Bovine Serum Albumin)
CT	počítačová tomografia (Computed Tomography)
cyklám	1,4,8,11-tetraazacyklotetradekán
cyklén	1,4,7,10-tetraazacyklododekán
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlórmetán
DCU	dicyklohexylmočovina
DD	dipól-dipólový
denat.	denaturovaný
DIPEA	diisopropyl(ethyl)amín
DIS	dyspróziom indukovaný posun (Dysprosium Induced Shift)
DMF	N,N-dimethylformamid
DO ₂ A	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,7-dioctová kyselina
DO ₃ A	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7-trioctová kyselina
DO ₃ A-ADME	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1-[2-(dimethylamino)ethyl]-4,7,10-trioctová kyselina
DO ₃ A-AE	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1-[2-(amino)ethyl]-4,7,10-trioctová kyselina
DO ₃ A-AME	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1-[2-(methylamino)ethyl]-4,7,10-trioctová kyselina
DO ₃ AP ^R	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1-[methyl(alkyl)fosfínová]-4,7,10-trioctová kyselina
DO ₃ AP ^{ABn}	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1-[(4-aminobenzyl)(methyl)fosfínová]-4,7,10-trioctová kyselina
DO ₃ A-SA	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1-[(4-methoxy)fenylsulfónamidoethyl]-4,7,10-trioctová kyselina
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DOTA-4AMP	tetrakis{(dihydroxy)fosforyl}methylamid} kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctovej
DOTAM-gly	tetrakis[(karboxymethyl)amid] kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctovej
DOTMA	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetrakis(2-methyloctová) kyselina
DOTP	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetrakis(methylfosfónová) kyselina
DSa	dansylamid
DSg	N-dansylglycín
DTMA	tetrakis(methylamid) kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctovej
DTPA	diethyléntriámín-N,N,N',N'',N'''-pentaoctová kyselina
DTPA-BMA	N,N''-bis(methylamid) kyseliny diethyléntriámín-N,N,N',N'',N'''-pentaoctovej
DTPA-BMEA	N,N''-bis(methoxyethylamid) kyseliny diethyléntriámín-N,N,N',N'',N'''-pentaoctovej
DTPAM	pentakis(methylamid) kyseliny diethyléntriámín-N,N,N',N'',N'''-pentaoctovej
DTTA	diethyléntriámín-N,N,N',N''-tetraoctová kyselina
DTTAP	diethyléntriámín-N'-methylfosfónová-N,N,N'',N'''-tetraoctová kyselina
EA	elementárna analýza (Elemental Analysis)
EDTA	ethyléndiámín-N,N,N',N''-tetraoctová kyselina
EOB-DTPA	3-[(4-ethoxy)benzyl]diethyléntriámín-N,N,N',N'',N'''-pentaoctová kyselina
ENDOR	elektrónová nukleárna dvojité rezonancia (Electron Nuclear Double Resonance)
EPTPA	ethylénpropyléntriámín-N,N,N',N'',N'''-pentaoctová kyselina
ekv.	ekvivalent
ESI	ionizácia elektrosprejom (Electrospray Ionization)
FFC	Fast-Field Cycling
fMRI	funkčné magnetické rezonančné zobrazovanie (Functional Magnetic Resonance Imaging)
HOPO	hydroxypyridinonát
HMDS	hexametyldisilazán ((Me ₃ Si) ₂ NH)
HSA	ľudský sérový albumín (Human Serum Albumin)
IKEM	Inštitút klinickej a experimentálnej medicíny v Prahe
IPAV	zmes isopropanolu, koncentrovaného vodného roztoku amoniaku a destilovanej vody v pomere ¹ PrOH : NH ₃ : H ₂ O

¹ PrOH	propán-2-ol, isopropanol
IS	vnútorná sféra (Inner Sphere)
IT	pasca na ióny (Ion Trap)
LAH	lithialuminiuhydrid (Li[AlH ₄])
LD ₅₀	letálna dávka pre 50 % populácie
LIS	lanthanoidom indukovaný posun (Lanthanide Induced Shift)
MIP	projekcia maximálnej intenzity (Maximum Intensity Projection)
MR	magnetická rezonancia, magnetické rezonančné
MRA	magnetická rezonančná angiografia (Magnetic Resonance Angiography)
MRI	magnetické rezonančné zobrazovanie (Magnetic Resonance Imaging)
MRS	magnetická rezonančná spektroskopia (Magnetic Resonance Spectroscopy)
MS	hmotová spektrometria (Mass Spectrometry)
MTR	pomer prenosu magnetizácie (Magnetization Transfer Ratio)
NMR	nukleárna magnetická rezonancia (Nuclear Magnetic Resonance)
NMRD	nukleárna magnetická rezonančná disperzia (Nuclear Magnetic Resonance Dispersion)
NOTA	1,4,7-triazacyklononán-1,4,7-trioctová kyselina
NSF	nefrogénna systémová fibróza
OECD	Organisation for Economics Co-operation and Development
OS	vonkajšia sféra (Outer Sphere)
PARACEST	paramagnetický chemicko-výmenný prenos saturácie (PARAMagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer)
PBS	fyziológický fosfátový pufo (Phosphate Buffered Saline)
PET	pozitronová emisná tomografia (Positron Emission Tomography)
PRE	navýšenie protónovej relaxácie (Proton Relaxation Enhancement)
PfF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
PTFE	polytetrafluóroethylén
RF	rádiofrekvenčný
RT	laboratórna teplota (Room Temperature)
RTG	röntgen
RVO	rotačná vákuová odparka
SA	štvorcová antiprizma (Square Antiprism)
SBM	Solomon-Bloembergen-Morgan
SC	skalárny
SPECT	jednofotónová emisná počítačová tomografia (Single-Photon Emission Computed Tomography)
SS	druhá sféra (Second Sphere)
SSC	fyziológický pufo citrátu sodného (Saline-Sodium Citrate)
TACD	1,4,7-triazacyklodekán
TACT	1,4,7,10-tetraazacyklotridekán
TACU	1,4,8-triazacykloundekán
TACN	1,4,7-triazacyklononán
¹ Bu ₃ DO ₃ A	tris(terc-butylester) kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7-trioctovej
TFA	trifluóroctová kyselina
THF	tetrahydrofurán
TLC	tenkovrstvová chromatografia (Thin Layer Chromatography)
TREN	tris(2-aminoethyl)amín
TMS	tetramethylsilán
TMSCl	trimethylsilylchlorid
TOL	toluén
TSA	skrúžená štvorcová antiprizma (Twisted Square Antiprism)
XRA	röntgenová angiografia (X-Ray Angiography)
XRD	röntgenoštruktúrne analytické difrakcie, röntgenoštruktúrne analytické údaje (X-ray Diffraction)
ZFS	štiepenie pri nulovom poli (Zero-Field-Splitting)



$$r_1 = \frac{R_1}{[Gd]} = \frac{T_1^{-1}}{[Gd]}$$

r_1 je relaxivita, R_1 je pozdĺžna relaxácia, $[Gd]$ je koncentrácia Gd^{3+} komplexu, T_1 je pozdĺžny relaxačný čas

1.1 Nukleárna magnetická tomografia

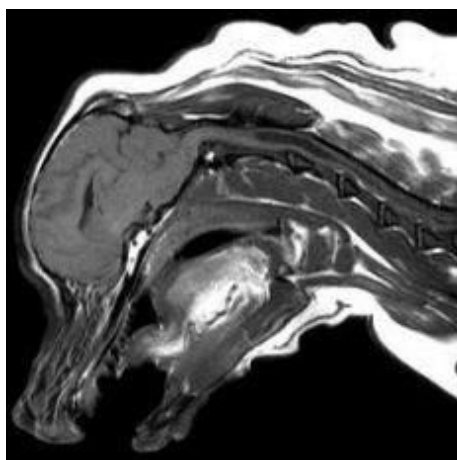
1.1.1 Diagnostická metóda a jej princípy

Dnešnou jednou z najvyužívanejších diagnostických metód je (nukleárna) magnetická tomografia (angl. (nuclear) Magnetic Resonance Imaging = MRI; pre emotívnosť, ktorú výraz „nuclear“ vyvoláva, sa od 80. rokov v spojení nepoužíva). Počet tomografov v nemocniciach a vyšetrení za posledné roky (tabuľka 1 (1)) rapídne vzrastá a vyšetrenie na tomto prístroji býva bežnou súčasťou diferenciálnej diagnózy alebo cieleného zobrazenia časti tela. Magnetický tomograf už nie je len vybavením všeobecných kliník, ale i veterinárnych staníc (obrázok 1 (2)). Široké uplatnenie má okrem živočíšnej ríše (3) i v botanike, resp. odvetví pomológie, kde môže byť využitý k sledovaniu kvality dodávaných potravín (4) (obrázok 2 (5)). Ďalšou obmenou magnetickej tomografie je fMRI (funkčné MR zobrazovanie), ktoré sníma encefalickú aktivitu. V nemocniciach je toho využívané pri neurochirurgickom vyšetrení alebo komerčne ako detektor ľži (6).

Tabuľka 1 (1)

Trendy v oblasti magnetickej tomografie

	Rok	Slovenská republika	Česká republika	USA
Počet MR skenerov na milión obyvateľov	2009	6,1	5,7	–
	2010	6,9	6,3	31,5
	2011	7,0	6,9	–
	2012	6,3	7,0	34,5
Počet MR vyšetrení na milión obyvateľov	2009	29,9	32,3	95,8
	2010	33,5	33,6	97,6
	2011	34,7	39,0	102,7
	2012	40,9	43,2	104,8

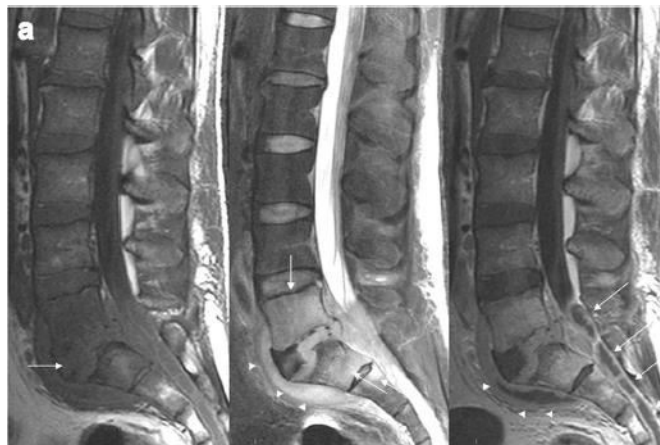


Obrázok 1 – MR snímok hlavy psa (2)



Obrázok 2 – MR snímok banánu (5)

Nespornými výhodami magnetickej tomografie je jej neinvazívnosť, použitie nízkoenergetického neionizujúceho žiarenia (energeticky v oblasti rádiových vln) a že nie je nutné aplikovať pacientovi mimotelové látky. Základný MR snímok predmetu postačuje (pri vhodnom nastavení tomografu) k presnému vykresleniu vnútra (obrázok 3 (7)). Získaný dvojfarebný (čiernobiely) obrázok zobrazuje určitú vlastnosť sledovaných jadier, ktorá závisí od mnohých parametrov (diskutované nižšie).



Obrázok 3 – sagitálny MR snímok pacienta s infekciou *M. tuberculosis*, biele šípky vyznačujú patologické tkanivo, prevzané z (7)

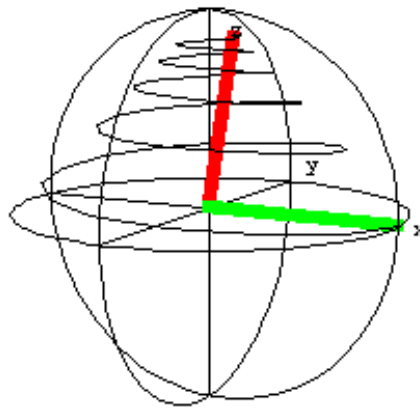
Po vložení snímaného objektu do tomografu je predmet vystavený silnému magnetickému poľu ($B = 0,5-7,0$ T, pre porovnanie magn. pole zeme má $B = 45 \pm 6$ μ T v horizontálnom smere (8)), ktoré ovplyvňuje jadrový magnetický moment NMR aktívnych nuklidov (t.j. s nenulovým jadrovým spinom: ^1H , ^{13}C , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P a i.). Vektory magnetizácie týchto nuklidov začnú vykonávať tzv. Larmorov precesný pohyb okolo vektoru magnetizácie M (= vektorový súčet všetkých vektorov magnetických moment daného nuklidu), ktorý je rovnobežný s vektorom magnetickej indukcie magnetu tomografu. Sú možné dva krajné prípady orientácie vektoru magnetizácie, a to buď v smere vektoru magn. indukcie, alebo proti. V magnetickom poli o nízkej intenzite (B rovné jednotkám T) sú tieto dve energetické hladiny takmer rovnako populované (rovnica [1]). Energetický rozdiel medzi týmito dvoma stavmi je veľmi malý (rovnica [2]) a odpovedá energii žiarenia, podľa Planckovho zákona, v oblasti MHz (odvoditeľné z pravej strany rovnice [2]).

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad [1]$$

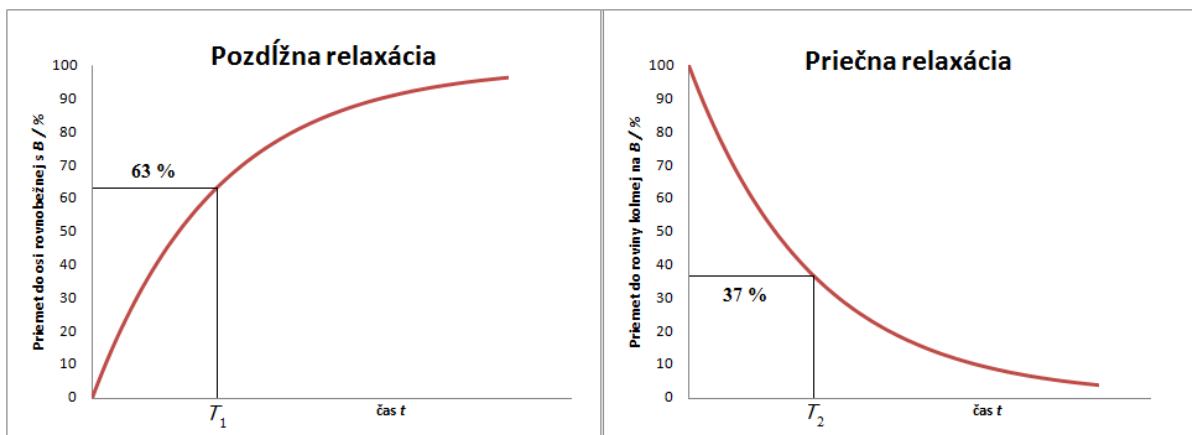
$$\Delta E = -\gamma_N \frac{h}{2\pi} B = -g_N \frac{q_N}{2m_N} \frac{h}{2\pi} B = -g_N \beta_N B = h\nu \quad [2]$$

N_2 prislúcha populácii o vyššej a N_1 populácii o nižšej energii, ΔE je energetický rozdiel spôsobený prítomnosťou magnetického poľa, k_B je Boltzmannova konštanta, T je termodynamická teplota, γ_N je gyromagnetický pomer daného 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, β_N je nukleárny magnetón a ν je frekvencia elektromagnetického pulzu.

Po aplikovaní krátkeho silného pulzu o presne danej energii, odpovedajúcej energetickému rozdielu hladín, nastáva vychýlenie (sklápanie) vektoru magnetizácie v smere kolmom na os vektoru vonkajšej magnetickej indukcie. Tento pulz pokrýva širšiu oblasť rezonančných frekvencií, aby excitoval jadrá všetkých nuklidov daného typu nezávisle na ich chemickom okolí. Po odstránení excitačného žiarenia nastáva relaxácia vektoru magnetizácie do rovnovážnej polohy (obrázok 4 (g)). Rýchlosť (doba), akou sa vráti, je zachytená externým prijímačom a analyzovaná. Jedným z výsledkov experimentu je mapa (2D, 3D) veľkosti parametrov rýchlosti (relaxačné časy T_1 a T_2 – obrázok 5) v závislosti na ich lokalizácii v skenovanom objekte, t.j. MR snímok (obrázok 3).



Obrázok 4 – relaxácia vektoru magnetického momentu jadra (červená čiara) po excitačnom 90° pulze (zelená čiara); vektor magnetizácie je priemetom vektoru magnetického momentu jadra do osi z (g)



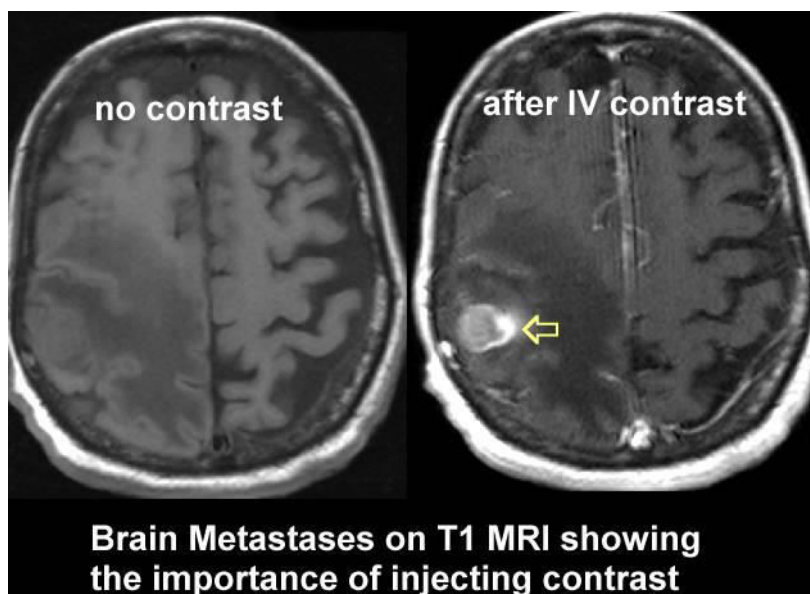
Obrázok 5 – grafické znázornenie T_1 (obnovenie vektoru magnetizácie v ose z) a T_2 (vymiznutie vektoru magnetizácie v roviny xy, resp. rozfázovanie vektorov magnetických momentov jadier)

Takmer výlučne sú sledované NMR aktívne nuklidy vodíku ^1H molekúl vody. V závislosti na chemických podmienkach sledovaných atómov (pH, T , pohyblivosť, iónová sila a i.) sú odlišné i relaxačné časy (tabuľka 2 (10)). Najkratšie relaxačné časy T_1 a najdlhšie časy T_2 dosahuje tukové tkanivo pre jeho presnú definovosť, malú pohyblivosť a menšie zastúpenie molekúl vody. Naopak svaly a mozgová hmota sú tvorené až zo 75 % vodou (tukové tkanivo len z 10 %), ktorá je dostatočne pohyblivá a relaxuje pomaly.

Tabuľka 2 (10)

Relaxačné časy v rôznych tkanivách			
Tkanivo	$T_1(0,5 T) / s$	$T_1(1,5 T) / s$	T_2 / ms
Priečne pruhované svalstvo	0,55±0,10	0,87±0,16	47±13
Srdcový sval	0,58±0,09	0,87±0,14	57±16
Pečeň	0,33±0,07	0,50±0,11	43±14
Oblíčka	0,50±0,13	0,65±0,18	58±14
Slezina	0,54±0,10	0,78±0,15	62±27
Tukové tkanivo	0,21±0,06	0,26±0,07	84±36
Šedá mozgová kôra	0,66±0,11	0,92±0,16	101±13
Biela mozgová kôra	0,54±0,09	0,79±0,13	92±22

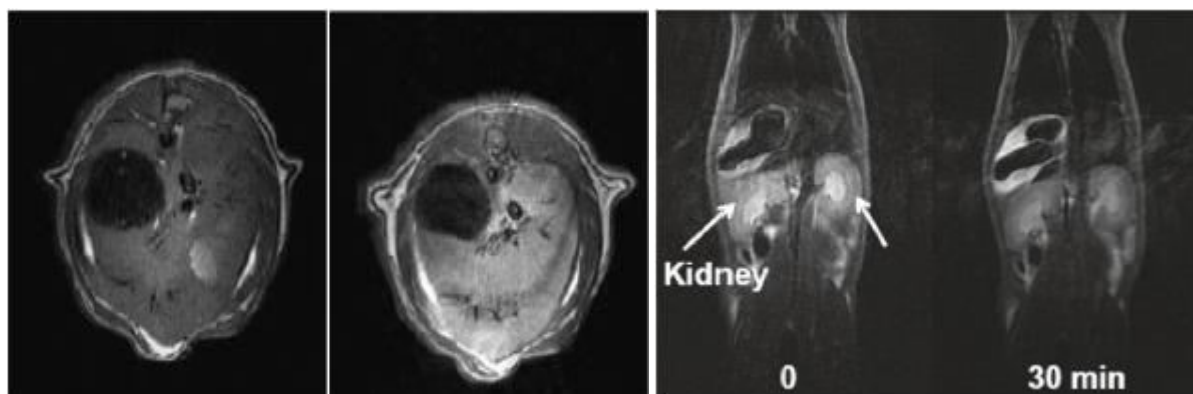
Nevýhodou získaného snímku je nízka rozlišovacia schopnosť a nemožnosť zobrazit' drobné detaily, akými môžu byť malé lézie alebo iné abnormality. Tieto podrobnosti môžu zaniknúť v MR snímku i nedostatočným zvýraznením. Cielovým ovplyvnením relaxačných časov (často ich skrátením) určitej oblasti je možné doceliť výraznú zmenu jej relaxačných parametrov oproti okolnému prostrediu, čím sa miesto na MR snímku zvýrazní (obrázok 6 (11)).



Obrázok 6 – MR snímky metastázy v mozgovom tkanive, vľavo pred intravenóznym podaním T_1 -kontrastnej látky, vpravo po podaní, prevzané z (11)

1.1.2 Kontrastná látka

Pre získanie výraznejšieho kontrastu snímku je potrebné aplikovať pacientovi pred vyšetrením kontrastnú látku. Každá z mnohých používaných diagnostických metód, akými sú napr. MR, PET, SPECT a CT, môže zvýšiť kontrast snímku podaním určitej kontrastnej látky. Pre MR, kontakt účinnej zložky v podanom medikamente s pozorovaným nuklidom ovplyvní vo výsledku relaxačný čas nuklidu. Podľa ovplyvnenia typu relaxačného času sú rozlišované kontrastné látky T_1 (založené na báze Gd^{3+}) a T_2 (založené na báze nanočastíc). Kým T_1 -kontrastné látky sú lekármi preferované, pretože poskytujú pozitívny kontrast (zvýraznenie), T_2 -kontrastné látky skracujú relaxačný čas T_2 , čo sa prejaví na MR snímku ako negatívny kontrast (stmavenie). Dnes až 40 % diagnostických MR snímok (12) je ovplyvnených s intravenózne podaným kontrastom. Príkladom sú MR snímky po podaní rôznych typov kontrastných látok vo vývoji na obrázku 7.



Obrázok 7 – vľavo axiálne MR snímky pečene myši pred a po podaní špecifického Gd^{3+} komplexu odvodeného od DTPA so postrannou skupinou $C_{16}H_{33}$ (13), vpravo koronárne MR snímky (0. a 30. min) na 3 T magnetickom tomografe po podaní Dy_2O_3 nanočastíc myši (14)

Veľkou výhodou magnetickej tomografie je práve jej dobrá rozlišovacia schopnosť (úroveň mm^3), ale má veľmi nízku citlivosť, ktorá musí byť vyvážená množstvom podanej kontrastnej látky. Pre zdravého jedinca to predstavuje 0,1 mmol na kg (nešpecifická kontrastná látka (15)). Preto podaná dávka kontrastnej látky musí byť netoxická, biologicky neaktívna a ľahko vylúčiteľná (ideálne renálne – filtrovanie cez obličky).

Skrátenie T_1 protónov molekúl H_2O je dosahované paramagnetických iónom, ktorý musí byť v blízkosti danej molekuly (H_2O je často koordinovaná). Paramagnetické centrum obsahuje voľné nespárené elektróny, ktoré spin-spinovou interakciou interagujú s blízkymi atómami. Ak by hodnota magnetického momentu atómu bola závislá len na počte nepárových elektrónov, tak „najparamagnetickejší“ by bol trivalentný kationt gadolína so 7 nepárovými elektrónmi v 4f orbitáloch (t.j. maximum). Avšak vďaka relativistickým príspevkom v Russell–Saundersovom popísaní momentov elektrónov je magnetický moment gadolinitého kationtu o 25 % menší ako u kationtu dysprózitého alebo holmitého (16). Kontrastné látky typu T_1 sú v drvivej väčšine založené na gadolinitých komplexoch. Dôvodom je závislosť relaxácie na mnoha premenných, popísaná tzv. SBM

(Solomon-Bloembergen-Morgan, autori) teórie relaxácie, neskôr upravenou pre $S = 7/2$ (17), z ktorých najväčší príspevok z celkového súčtu prislúcha elektrónovej relaxácii paramagnetika (T_{1e} , popis rovníc je uvedený ďalej). Gadolinitý kation má základnú elektrónovú štruktúru $^8S_{7/2}$ – totálne symetrický stav, ktorý má za následok rádoovo pomalšiu elektrónovú relaxáciu (oproti zmienenému trojmocnému dyspróziu a trojmocnému holmiu o 2–4 rády). Prehľad spomenutých parametrov lanthanitých katiónov je znázornený v tabuľke 3 (18) (19).

Tabuľka 3 (18) (19)

Základné vlastnosti niektorých Ln^{3+}

Ln^{3+}	4f-elektróny	Atómové číslo (Z)	Základný stav	μ_{eff} / μ_B	$T_{1e}(298 K) / s$
Eu ³⁺	6	63	7F_0	3,40–3,51	10^{-13} – 10^{-12}
Gd ³⁺	7	64	$^8S_{7/2}$	7,94	10^{-10} – 10^{-9}
Tb ³⁺	8	65	7F_6	9,70	10^{-13} – 10^{-12}
Dy ³⁺	9	66	$^6H_{15/2}$	10,60	10^{-13} – 10^{-12}
Ho ³⁺	10	67	5I_8	10,60	10^{-13} – 10^{-12}
Er ³⁺	11	68	$^4I_{15/2}$	9,60	10^{-13} – 10^{-12}
Tm ³⁺	12	69	3H_6	7,60	10^{-13} – 10^{-12}
Yb ³⁺	13	70	$^2F_{7/2}$	4,50	10^{-13} – 10^{-12}

Nevýhodou gadolinité katiónu je jeho vysoká toxicita ($LD_{50}(Gd^{3+}, \text{myš, intravenózne}) = 0,35 \text{ mmol/kg}$ (20)) a pri podávanej dávke $0,1 \text{ mmol/kg}$ to predstavuje cca $1,20 \text{ g Gd}^{3+}$ na jedno vyšetrenie. Jeho toxicita plynie vďaka podobnosti s vápenatými a zinočnatými katiónmi ($r(Gd^{3+}) = 108 \text{ ppm}$, $r(Ca^{2+}) = 114 \text{ ppm}$, $r(Zn^{2+}) = 110 \text{ ppm}$ (21)) a voľné Gd^{3+} sa ukladá do kostí ako ťažký kov. Akútna otrava sa prejavuje kŕčmi, ataxiou, hypokalcémiou a zinkúriou. Ďalším prejavom chronickej otravy s Gd^{3+} je choroba nefrogénna systémová fibróza (NSF, viď ďalej).

Kruciálnym aspektom T_1 -kontrastných látok MR je znížiť relaxačný čas T_1 protónov molekúl vody najmä cez a počas koordinácie. Vytvorením gadolinitého komplexu s polydentátnym ligandom (okta- a menej) sa často zachová schopnosť centrálneho atómu koordinovať molekulu vody a zároveň sa niekoľkonásobne zníži toxicita ($LD_{50}(\text{Dotarem}^{\circledR}, \text{myš, intravenózne}) = 10,2 \text{ mmol/kg}$, zvýšenie o cca $30\times$ oproti $LD_{50}(Gd^{3+})$ (20)). Cielovým motívom ligandu T_1 -kontrastnej látky môže byť ovplyvnené nielen relaxačné parametre (viď ďalej), ale aj možná biodistribúcia (táto práca), princíp „on/off“ (senzory vápenatých katiónov (22)) alebo vytvorenie tzv. „smart“ kontrastných látok (aktivácia určitou splnenou podmienkou *in vivo*, napríklad aktivitou enzýmu v tumore (23)).

Prehľad súčasne klinicky používaných T_1 -kontrastných látok a ich základné relaxačné a fyziologicko-aplikačné parametre sú uvedené v prílohe (dávka, osmomolalita a i.). Dve, resp. tri, kontrastné látky sú špecifického charakteru (majú zníženú odporúčanú dávku pred MR vyšetrením). V prílohe je taktiež uvedená podrobnejšia charakterizácia T_1 -kontrastnej látky Ablavar[®].

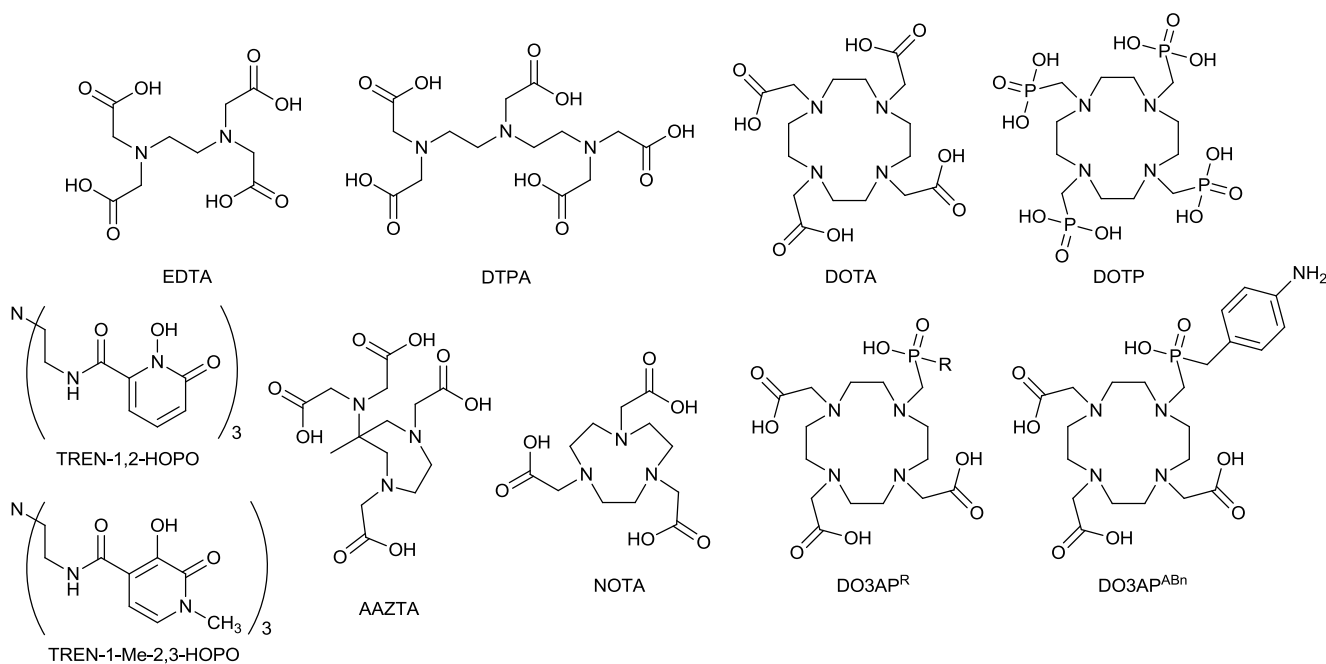
1.2 T_1 -kontrastná látka

1.2.1 Ligand

Základnou vlastnosťou ligandu T_1 -kontrastnej látky by malo byť vytvorenie stabilného a inertného komplexu *in vivo*, t.j. neschopnosť uvolnenia toxického gadolinitého katiónu do tela jedinca. Gd^{3+} ako malá a výrazne nabitá častica (pri pH > 5,5 hydrolyzuje molekulu H_2O a vytvára hydroxokomplexy (24)) preferuje „tvrdé“ donorové atómy typu O^- (anióny kyslíkatých kyselín) a taktiež O (alkoholy a karbonyly – obzvlášť amidy), avšak značnú afinitu má aj k elektrónovému páru dusíku (amíny).

Stabilita a inertnosť komplexu je okrem typu donorových atómov ligandu ovplyvnená aj ďalšími efektami, akými sú napríklad chelatačný efekt polydentátneho ligandu alebo efekt makrocyclu. Pri dekoordinovaní jedného donorového atómu ligandu je polydentátny ligand koordinovaný k centrálnemu atómu ďalšími koordinačnými väzbami a je pravdepodobnejšie, že sa dekoordinovaný centrálny atóm, resp. funkčná skupina, koordinuje späť než by difundovala v roztoku v prípade monodentátneho ligandu. Efekt makrocyclu, ktorý zahŕňa i chelatačný efekt, má za výhodu nižšiu flexibilitu dekoordinovaného donorového atómu, t.j. nemožnosť koordinácie 2 častíc v rámci jedného makrocyclu. Tento efekt sa prejavuje u makrocyclov s 9 a viacerými atómami v kruhu.

Kombináciou spomenutých vlastností boli vytvorené ligandy odvodené od polyaminokarboxylátov určené pre komplexáciu gadolinitého komplexu. Ich odolnosť *in vivo* by mala byť značná a použitie bezpečné (vynímajúc ligand EDTA a NOTA). Motívy ligandov sú uvedené na obrázku 8.



Obrázok 8 – bežné motívy polyaminokarboxylátových ligandov T_1 -kontrastných látok

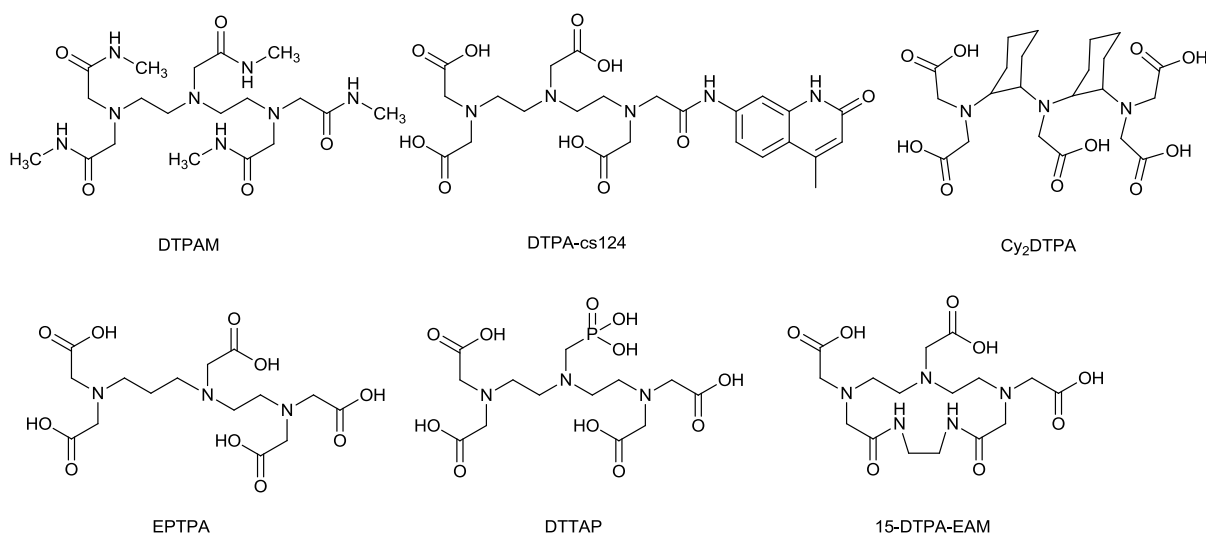
1.2.1.1 Lineárne cheláty

Prvým úspešným chelatantom Gd^{3+} bola EDTA (obrázok 8). Avšak nízka odolnosť (kinetická i termodynamická (25)) mala za následok ukončenie výskumu na *in vitro* modeloch. Predĺžením EDTA, resp. zamenením jedného acetátu za ethyl-2-amino-*N,N*-diacetát, vznikol ligand DTPA dodnes používaný v T_1 -MR v medicamente Magnevist[®]. Päť záporne nabitých acetátových skupín a tri amínové dusíky vytvoria s Gd^{3+} oktaedratný komplex schopný koordinovať jednu molekulu vody. Jeho nevýhody (menšia odolnosť *in vivo* oproti komplexom makrocyclov) boli vo vtedajšej dobe oproti lacnej produkcii zanedbateľné.

Modifikáciou skeletu DTPA, napríklad zámenou jedného karboxylátu za sekundárny amid so substituentom alebo za kyselinu fosforu alebo zamenená alifatická spojka, ethylén, dusíkových atómov za inú skupinu, je možné vytvoriť mnoho rôznych ligandov pre T_1 -kontrastné látky (obrázok 9 a príloha). Cez amidovú (fosfínovú) funkčnú skupinu môže byť kovalentne viazaná skupina ovplyvňujúca biodistribúciu, „targeting“ alebo priamo ovplyvňujúca relaxačné vlastnosti centrálného atómu.

Zvláštnou skupinou sú nové ligandy odvodené od TREN (tris(2-aminoethyl)amín) a HOPO (hydroxypyridinonát), napríklad TREN-1,2-HOPO (obrázok 8), ktorých gadolinité komplexy koordinujú až dve molekuly. Kinetická inertnosť a termodynamická stabilita týchto tripodných komplexov je výrazná i pri použití *in vivo*, avšak komplexy tohto typu ligandu nie sú príliš dobre rozpustné vo vode (26).

Relatívne nový ligand AAZTA (6-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepin-*N,N',N'',N'''*-tetraoctová kyselina (27), na obrázku 8) je možné klasifikovať ako prechod medzi lineárnymi rozvetvenými a makrocyclickými ligandmi. Kinetická inertnosť i termodynamická stabilita lanthanoiditého komplexu je dostatočná (porovnateľná s Ln^{3+} komplexami od ligandu DTPA) a počet priamo koordinovaných vôd odpovedá dvom molekulám, ktoré sú dokonca koordinované negeminálne.



Obrázok 9 – (lineárne) rozvetvené polyaminokarboxyláty odvodené od ligandu DTPA

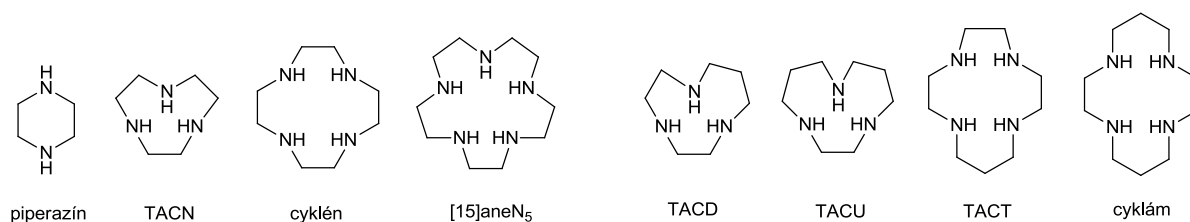
1.2.1.2 Makrocyclické polyaminokarboxyláty

Najširšie využitie známych makrocyclov majú polyazamakrocycly – alifatické makrocycly s izolovanými atómami N. Najkratšia stabilná alifatická spojka dvoch N atómov je ethylén. Podľa zväčšujúceho sa počtu N,N' -ethylénových jednotiek uzavretých v cykle sú známe ligandy piperazín (1,4-diazacyklohexán), TACN (1,4,7-triazacyklononán), cyklén (1,4,7,10-tetraazacyklododekán) a [15]aneN₅ (1,4,7,10,13-pentaazacyklopentadekán). Zámenou niektorých ethylénových spojiek za 1,3-propylénové vzniknú ligandy akými sú TACD (1,4,7-triazacyklodekán), TACU (1,4,7-triazacykloundekán), TACT (1,4,7,11-tetraazacyklotridekán) a cyklám (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekán). Spomenuté ligandy sú znázornené na obrázku 10.

Kým piperazín vytvára príliš malú kavitu a nenašiel uplatnenie v tvorbe ligandov pre kontrastné látky (taktiež jeho komplexy nevykazujú makrocyclický efekt), TACN má ideálne vlastnosti pre koordináciu malých trojmocných katiónov, akými sú hlinité alebo galité katióny. Obzvlášť rádioaktívny izotop $^{68}\text{Ga}^{3+}$ komplexovaný v derivátoch ligandu NOTA (t.j. TACN, kde amínové skupiny majú naviazané acetátové funkčné skupiny, obrázok 8) je potencionálnou PET kontrastnou látkou (28). Ligand [15]aneN₅ vytvára až príliš veľkú kavitu (pentadentátny ligand pre Ni^{2+} (29)) a pre vytvorenie kineticky stabilných T_1 -kontrastných látok je nevhodný.

Kavitu s najvhodnejším rozmerom pre koordináciu trojmocných lanthanoidov má ligand cyklén. Afinita dusíkových donorových atómov k tvrdým Ln^{3+} katiónov je stredne silná, a preto skelet cyklénu musí byť ďalej modifikovaný. Naviazaním acetátov na každú amino skupinu vznikol ligand DOTA (obrázok 8) hojne používaný v diagnostike pomocou MR. Dnes je soľ tohto Gd^{3+} komplexu predávaná s obchodným názvom Dotarem[®] (viď príloha). Jej termodynamická i kinetická odolnosť je značná a dodnes je „porovnávacím štandardom“ pre T_1 -kontrastné látky obsahujúce makrocyclus. Jedinou nevýhodou je dosahovaná nízka relaxivita r_{1p} . Ako bolo zmienené u ligandu DTPA, zámenou acetátu za amid je možné vytvoriť množstvo rôznorodých ligandov s rozličnými vlastnosťami. Problém so znížením termodynamickej stability a zároveň vylepšenie relaxačných parametrov je možné docieľiť zámenou jedného acetátu za fosfinát alebo fosfonát (DO_3AP^R , kde R = substituent alebo OH, obrázok 8).

Ďalšie spomenuté ligandy TACD, TACU, TACT a cyklám majú kavity príliš rozmerné pre lanthanoidité katióny (majú s ním a jeho derivátmi veľmi nízku termodynamickú stabilitu). No ligand cyklám má široké uplatnenie v PET kontrastných látkach odvodených od komplexov s izotopmi Cu. Termodynamicky sú tieto komplexy veľmi stabilné ($\log \beta_{\text{CuL}} = 27,2$ (30)). Okrem použitia týchto komplexov v PET vyšetrení je možné docieľiť selektívnu izoláciu rádioaktívnych izotopov Cu z generátorov pomocou modifikovaných cyklámových derivátov (31).



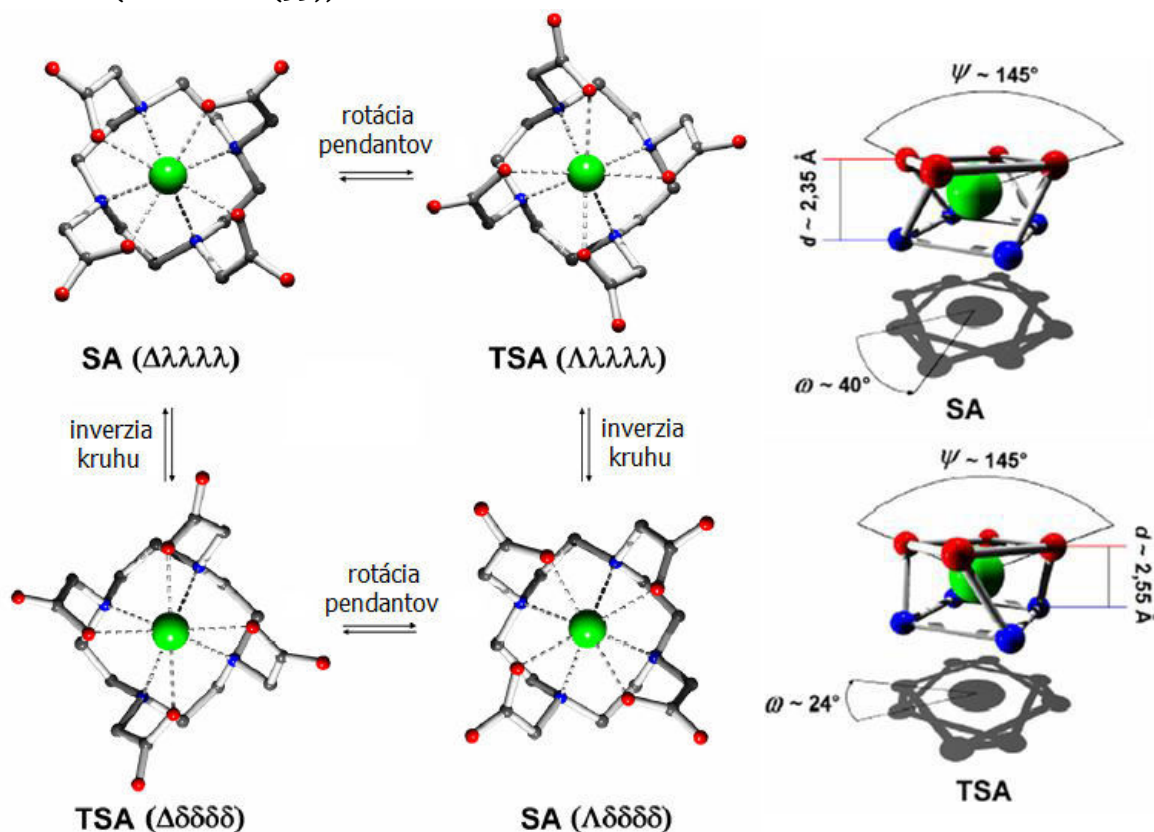
Obrázok 10 – makrocyclické polyaza-ligandy

1.2.1.2.1 Izoméria Ln³⁺ komplexov odvodených od ligandu DOTA

Komplexy trojmočných lanthanoidov s ligandmi typu DOTA (a s ligandami odvodenými od nich, napríklad DO₃AP^R a DOTP) vykazujú izomériu v roztoku. Po zachytení lanthanoidného katiónu acetátovými (alebo fosfinátovými, fosfonátovými) pendantnými skupinami (prvý rýchly krok komplexácie Ln³⁺ bol detekovaný spektrofotometricky, ¹H-NMR i luminiscenčne (32)) nastáva pomalý proces – komplexovaný katión zostúpi do kavity makrocyklu, kde je dodatočne koordinovaný dusíkovými atómami.

Vzhľadom ku geometrii natočenia pendantných skupín oproti rovine makrocyklu je možné vytvoriť dve rôzne častice. Štyri donorové atómy makrocyklu a štyri donorové atómy pendantných skupín vytvárajú oktaedratne koordináčne okolie centrálnemu atómu. Po vytvorení komplexu s týmto ligandom je koordinovaná voda v 9. koordináčnom mieste lanthanoidu, ktoré sa v tomto prípade nachádza nad rovinou kyslíkových donorových atómov.

V závislosti na natočenia rovín N₄ (makrocyklus) a O₄ (pendantné kyseliny) vznikajú 2 typy izomérie – Δ (rovina O₄ otočená doľava oproti rovine N₄ pri pohľade na ligand v smere koordinovanej vody) a Λ (O₄ otočené doprava oproti N₄). Druhý typ izomérie vzniká na pendantnom ramene vytvárajúci pátčlenný chelatačný cyklus s Ln³⁺. V závislosti na veľkosti torzného uhla chelatačných kruhov φ sú rozlíšené 2 typy. Typ δ sa od typu λ líši konformačným postavením relatívne rigidného makrocyklu. Po inverzii makrocyklu sa postavenie δ zmení na λ a naopak. Z hľadiska veľkosti Gibbsovej energie sú stabilné konformácie Λ(λλλλ), Δ(δδδδ), Λ(δδδδ) a Δ(λλλλ), ktoré vytvárajú dve dvojice diastereoizomérov (obrázok 11 (33)).



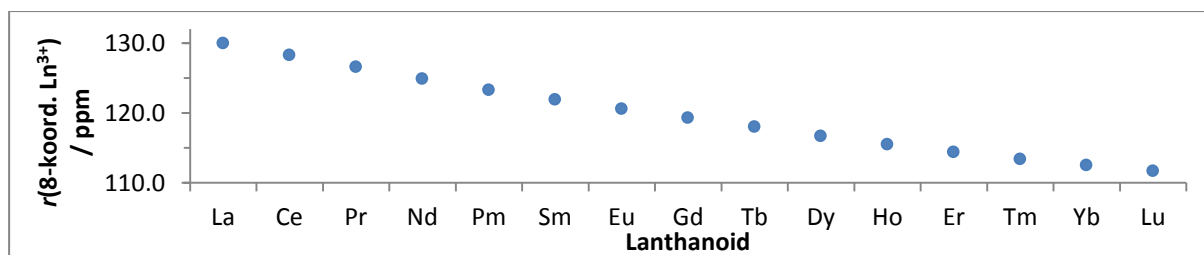
Obrázok 11 – izoméry SA a TSA komplexov odvodených od ligandov typu DOTA (33)

Izomér SA (z angl. *S*quare *A*ntiprism, izoméria $\Lambda(\delta\delta\delta\delta)$, $\Delta(\lambda\lambda\lambda\lambda)$) vykazuje pootočenú roviny N_4 oproti rovine O_4 ideálne o 45° (uhol φ). Vzdialenosť rovín donorových atómov je cca 2,35 Å. Ak je vytvorená kavita dostatočne otvorená, čo je charakterizované uhlom ω ($O_1-Ln^{3+}-O_3$, tzv. „opening angle“; vždy ten najmenší, ak sú uhly medzi O_1 a O_3 a O_2 a O_4 rôzne, ako napr. u Ln^{3+} komplexov od ligandu DO3AP), centrálny atóm môže koordinovať vodu (z röntgenových štruktúr bolo zistené, že v pevnom stave je limitná hodnota $\omega > 135^\circ$ pre koordináciu H_2O k Ln^{3+} (33)).

Druhý izomér, TSA (z angl. *T*wisted *S*quare *A*ntiprism, izoméria $\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)$, $\Delta(\delta\delta\delta\delta)$), má pootočenú rovín donorových atómov ideálne $22,5^\circ$ (polovica z φ_{SA}). Pri nemennosti dĺžky kovalentných väzieb pendatných skupín je vytvorená dutina, kde je koordinovaný centrálny atóm, nutne rozmernejšia, a to o cca 0,2 Å. Koordinačné okolie je flexibilnejšie a koordinovaná molekula vody dokáže byť vypudená rýchlejšie (10–100× (33)), ak sa neuplatňujú iné efekty ako elektrostatický alebo hydrofóbny, ktoré majú väčšiu váhu pri rýchlosti výmeny koordinovanej H_2O u izoméru SA). Pre koordináciu molekuly vody do deviatej koordinačnej polohy platí ten istý princíp, ktorý bol spomenutý u izoméru SA ($\omega > 135^\circ$).

Zámena jednej acetátovej skupiny ligandu DOTA za kyselinu fosforu (pre fosfinát ligand DO3AP^R, pre fosfonát DO3AP) spôsobí zvýšený výskyt izoméru TSA kvôli väčšej objemnosti fosforového atómu. Ak je blízko kavity protonizovateľná funkčná skupina, jej náboj výrazne vplýva na preferenčné usporiadanie. Blízky záporný náboj funkčnej skupiny pravdepodobne zapríčini slabú elektrostatickú interakciu s kladne nabitým centrálnym atómom, a tým je zvýšené percentuálne zastúpenie izoméru SA (viď Ln^{3+} komplexy od ligandu DO3AP (34)).

Vďaka lanthanoidovej kontrakcii (znižovanie iónového polomeru Ln^{3+} v perióde pre silnejšiu vnútornú elektrostatickú interakciu 4f elektrónov s jadrom, obrázok 12) sa mení objemnosť lanthanoiditého katiónu, a tým nutná koordinačná vzdialenosť donorových atómov. Kým u veľkých Ln^{3+} , akými sú La^{3+} , Ce^{3+} a Pr^{3+} , je takmer výlučne v roztoku prítomný izomér TSA, s postupným zmenšovaním iónového polomeru sa donorové atómy pri koordinácii približujú viac do kavity, čo sa prejaví populáciou izoméru SA. Avšak približe v druhej tretine lanthanoidovej série (Dy, Ho, Er) nastáva zmena koordinačného čísla Ln^{3+} z 9 na 8. Tým prestáva byť pre Ln^{3+} výhodnejší izomér SA a je tvorený opäť izomér TSA', ktorý avšak nekoordinuje vodu (značené apostroфом za TSA). Tento prechod vlastností je dobre pozorovateľný na röntgenových kryštálových štruktúrach Ln^{3+} komplexov s ligandmi odvodenými od ligandu DOTA, čo však nemusí korešpondovať so štruktúrou v roztoku (populácia izomérov TSA a TSA' (35)).



Obrázok 12 – zmena iónového polomeru oktakoordinovaných Ln^{3+} v sérii

1.2.2 Termodynamická stabilita a kinetická inertnosť

Najpodstatnejšou vlastnosťou aplikovanej látky do tela pacienta je jej neškodnosť voči organizmu. Toxicita voľného Gd^{3+} je markatná, a preto pri intravenóznom podaní jeho komplexu (t.j. T_1 -kontrastnej látky) musí byť zamedzené jeho uvoľneniu.

Mierou stability komplexu ako takého je termodynamická konštanta stability vyjadrovaná ako logaritmus veličiny K (rovnica [3]). Avšak pri fyziologických podmienkach je presnejšie uvádzať podmienenú konštantu stability K^* (rovnica [4] (36)), ktorá zahŕňa i rôzne protonizované formy ligandu a jeho komplexy s vnútrotelovými iónmi ako Ca^{2+} , Zn^{2+} a Cu^{2+} , s ktorými tvorí stabilné komplexy (tabuľka 4).

$$K = \frac{[[M(L)]^{x-y}]}{[M^{x+}]_t [L^{y-}]_t} \quad [3]$$

$$K^* = \frac{[[M(L)]^{x-y}]_t}{[M^{x+}]_t [L^{y-}]_t} \quad [4]$$

K je termodynamická konštanta, M je centrálny atóm, L je ligand, K^* je podmienená termodynamická konštanta a index „t“ značí totálne množstvo určitej látky ($[M]_t = [M] + [M(L_1)] + [M(L_2)] + \dots$; pre $[L]$ i jeho rôzne protonizované formy)

Tabuľka 4

Termodynamické konštanty stability komplexov s Gd^{3+} a endogénnymi katiónmi

Ligand (L)	log K				Ref.
	Gd(L)	Ca(L)	Zn(L)	Cu(L)	
EDTA	17,4	10,9	16,7	18,8	(24)
DTPA	22,5	10,8	18,6	21,5	(24)
DTPA-BMA	16,9	7,2	12,0	13,0	(37)
DOTAM	13,5	10,1	13,7	14,6	(38)
AAZTA	20,2	–	–	–	(39)
TREN-1-Me-3,2-HOPO	20,3	7,6	13,1	–	(40)
DOTA	24,7	16,4	18,7	22,7	(41)
DO ₃ AP ^{ABn}	24,0	–	–	–	(42)
DOTP	28,8	11,1	24,8	25,4	(43)

Ako už bolo zmienené vyššie, termodynamicky sú stabilnejšie komplexy makrocyclických chelátov so zvýšeným zastúpením záporne nabitých skupín („tvrdé“ donorové atómy O^- u karboxylátu, fosfonátu, fosfinátu a pod.) oproti rozvetveným ligandom a mäkkému nenabitému O atómu karbonylu u amidov. Popísané efekty sú veľmi dobre pozorovateľné na termodynamických údajoch komplexov ligandov určených pre T_1 -kontrastné látky – od najmenších hodnôt log K pre málo dentátne ligandy (menej ako 8; 6 pre EDTA), nenabité donorové atómy (amidy, DTPA-BMA) so vzrastajúcimi hodnotami pre čisto kyslíkové donorové atómy (typ TREN–HOPO), „semi-makrocyclické“ ligandy (zvýšená rigidita donorových skupín,

AAZTA), makrocyclické ligandy (s kavitou vhodnej veľkosti pre Ln^{3+} , t.j. cyklénové, DOTA a $\text{DO}_3\text{AP}^{\text{R}}$) a dvojnásobne záporne nabité zvyšky kyslíkatých kyselín (fosfonáty, DOTP).

Kinetické hľadisko inertnosti komplexov zohľadňuje uvoľnenie centrálného atómu iným kovom (transmetalácia), ligandom (transchelácia) alebo protónom v kyslom prostredí (dekomplexácia). Pre relatívne vysoké zastúpenie kationov kovov v krvnom riečisku (44) je transmetalácia endogénnymi iónmi kovov skúmaným parametrom syntetizovaných ligandov T_1 -kontrastných látok. Lineárne rozvetvené ligandy sú schopné transmetalácie oveľa rýchlejšie než cyklénové makrocyclické ligandy (tabuľka 5 (45)), ktorých kavita je výhodná práve pre Ln^{3+} , a sú značne kineticky labilné i pre voľné Fe^{3+} (46).

Tabuľka 5 (45)

Odolnosť a polčasy rozpadu komplexov niektorých Gd^{3+} komplexov

Ligand (L)	log K	log K*	$T_{1/2}$ (pH = 1)	Analýza po 15 min zrážania GdPO_4 vo fosfátovom pufrí [Gd(L)] a [M^{2+}] = 25 mM	
				Cu(L)	Zn(L)
DTPA	22,1	17,7	10 min.	25%	21%
DTPA-BMA	16,9	14,9	30 s	35%	25%
DOTA	25,8	18,8	1 mesiac	< 1 %	< 1 %

Pred cca 10 rokmi sa v amerických nemocniciach náhle objavila choroba NSF (nefrogénna systémová fibróza (47)). K jej príznakom patrilo lokálne stvrdenie kože (obrázok 13 (48)), bolesť kĺbov až zlyhanie pľúc, pečene a srdca. Až po 10 rokoch od „vypuknutia“ bola zistená spoločná vlastnosť pacientov a teda aj príčina – všetci podstúpili vyšetrenie na magnetickom tomografii po aplikácii kontrastnej látky Omniscan[®] a mali poškodené obličky (zníženú renálnu filtráciu). Vďaka tomu kontrastná látka kolovala v krvnom riečisku dostatočne dlhý čas potrebný pre disociáciu gadolinitého komplexu, a tým spôsobovala chronickú otravu voľným Gd^{3+} . Odvtedy je kladený vyšší dôraz na odolnosť komplexu *in vivo*.



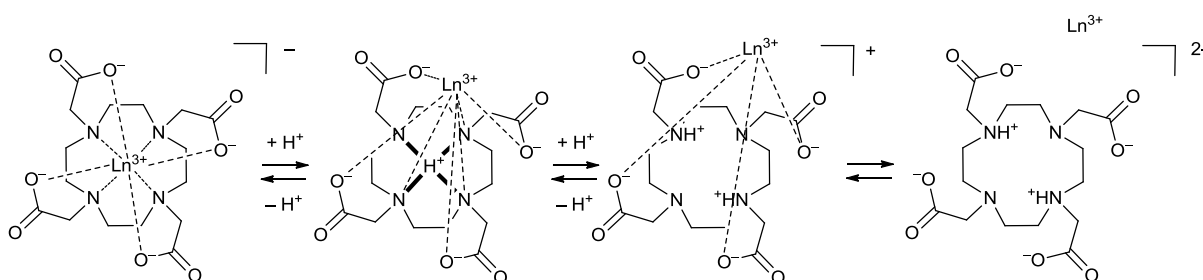
Obrázok 13 – pacient s NSF (48)

Transchelatačná schopnosť ligandov prítomných *in vivo* je nízka (karboxyláty, aminokyseliny, oxaláty, fosfáty a pod. – často nie sú viac ako bidentátne), avšak u Gd^{3+} komplexov lineárnych rozvetvených ligandov (DTPA) bola pozorovaná (21). Vysokú mieru odolnosti komplexov makrocyclických ligandov je možné vysvetliť zložitým mechanizmom dekomplexácie (popísaný je nižšie).

Uvoľnenie centrálného atómu v prostredí s nízkou hodnotou pH (často uvádzané pre pH = 1 v 0,1 M HCl alebo HClO_4) prebieha cez protonizáciu a dekoordináciu donorových atómov. V prostredí *in vivo* prichádza T_1 -kontrastná látka do styku s nízkou hodnotou pH

v glomerulách obličiek (pH cca 4,5) a so zníženou v nádorových bunkách (pH rovné 5,6–7,4 (49)). Protón je zachytený záporne nabitou funkčnou skupinou a prenesený na najbázickejší atóm v molekule. Tým je u polyaminokarboxylátov atóm dusíku amino skupiny. V prípade Gd^{3+} komplexov s lineárnymi rozvetvenými ligandami je tento presun protónu jednoduchý a rýchly, a preto sú komplexy týchto ligandov v prostredí o nízkom pH relatívne málo stabilné (tabuľka 5). „Semi-makrocyclické“ komplexy ligandu AAZTA a ligandov odvodených od TREN-HOPO vykazujú väčšiu kinetickú inertnosť. V prípade ligandu AAZTA je zvýšená stabilita pripisovaná práve rigiditou časti chelátu (27). Ligand TREN-HOPO je koordinovaný k Ln^{3+} len kyslíkovými donorovými atómami, ktoré sú menej bázické ako amíny.

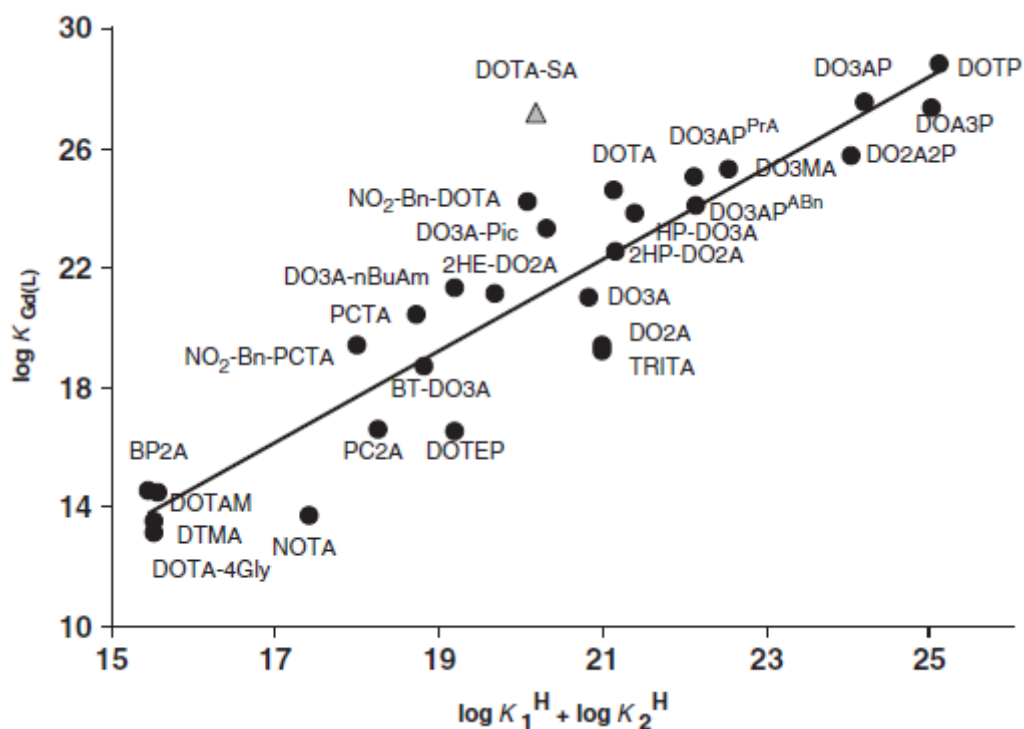
Najinertnejšie voči dekomplexácii v kyslom prostredí sú ligandy odvodené od ligandu DOTA (tabuľka 5). Pozorovaná skutočnosť sa vysvetľuje netriviálnym mechanizmom uvoľnenia centrálného atómu. Po zachytení protónu karboxylátom komplexu $[Gd(dota)]^-$ je presun H^+ iónu na amino skupinu makrocyclu spojený s disociáciou väzby $Ln-N$. Nasledovne H^+ protonizovanej amino skupiny je rovnomerne zdieľaný ostatnými amino skupinami makrocyclu (zníženie jeho potencionálneho efektu) a nastáva oslabenie koordinačných schopností donorových atómov N makrocyclu. Nasleduje záchyt ďalšieho protónu karboxylátom s jeho nutným pootočením v priestore a prenesením na ďalšiu amino skupinu sčasti protonizovaného makrocyclu (prítomná mierna elektrostatická repulzia). Dva H^+ ióny sa lokalizujú na dvoch protiľahlých amino skupinách a centrálny atóm je uvoľnený z kavity – avšak stále ostáva koordinovaný karboxylátmi. Až po ich protonizácii je, často toxický, centrálny atóm uvoľnený. Všetky jednotlivé kroky sú samozrejme vratné a tvorba komplexu prebieha rovnakým mechanizmom od konca (bez nutného presunu H^+ vrámci ligandu). Preto sú Ln^{3+} komplexy makrocyclických ligandov DOTA (s možnou výmenou acetátu za fosfinát alebo fosfonát) vysoko kineticky inertné a taktiež je ich netriviálne syntetizovať (nutné pH = 4 – 5 pre deprotonizáciu karboxylátov a nevyzrážanie Ln^{3+} vo forme hydroxido špecii). Popísaný mechanizmus je znázornený na obrázku 14.



Obrázok 14 – rozpad komplexu $[Gd(dota)]^-$ zapríčinený H^+ kationóm (nie sú zobrazené koordinované molekuly vody k Ln^{3+})

Ďalšie možné zvýšenie kinetickej inertnosti Ln^{3+} komplexov makrocyclických ligandov je cez zapríčinenie nemožnosti vytvorenia intermediátu, kde je jeden H^+ zdieľaný amino skupinami makrocyclu. Podobného princípu bolo využité u derivátoch ligandov „cross-bridge“ cyklámu, ktorého veľkosť kavity nie je vhodná pre Ln^{3+} , no kinetická inertnosť voči dekomplexácii s H^+ je pozoruhodná (50).

Modifikáciou bazicity N amino skupín makrocyklu je možné doceliť zvýšenie termodynamickej stability. Čím je amino skupina bázičejšia, tým má väčšiu afinitu k tvrdým akceptorovým atómom (Ln^{3+}). Zníženie bazicity bolo dosiahnuté naviazanou pendantnou skupinou, resp. substituovaním acetátu za nukleofílnjšie deriváty fosforových kyselín. Z potenciometrických titrácií ligandov makrocyklov boli zistené konštanty pK_A dvoch najviac bázičných amino skupín makrocyklu a boli porovnané s konštatou stability ich Gd^{3+} komplexu (obrázok 15 (51)). Získaná lineárna závislosť odpovedala popísanému javu.

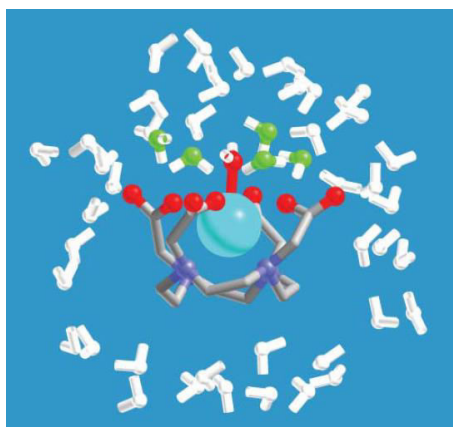


Obrázok 15 – závislosť pozorovanej konštanty stability Gd–L na „bázičnosti makrocyklu“, prevzaté z (51)

Termodynamicky najstabilnejším Gd^{3+} komplexom a kineticky vysoko inertným je komplex odvodený od ligandu DOTP (obrázok 8 a tabuľka 4). Jeho optimálne parametre odolnosti v prostredí *in vivo* sú znehodnotené neschopnosťou centrálnemu atómu koordinovať molekulu H_2O (vysoká sterická fosfónových skupín). Avšak jeho relaxivita dosahuje hodnôt klinicky používanej kontrastnej látky Dotarem®. Popis relaxačných závislostí SBM teóriou naznačuje, že hodnotu $r_{1\rho}$ komplexu primárne tvoria molekuly vody (vôd) veľmi blízke centrálnemu atómu, t.j. v druhej sfére.

1.3 Zjednodušená SBM teória

Celková pozorovaná relaxácia vody R_1 je zložená z diamagnetického príspevku R_{1d} (fyzikálnochemické parametre roztoku) a paramagnetického príspevku R_{1p} (ovplyvnený paramagnetickou kontrastnou látkou). Čiastkové príspevky paramagnetickej relaxácie možno rozdeliť do 3 príspevkov vzhľadom k povahe molekúl vody ku T_1 -kontrastnej látke: relaxácia vnútornej sféry (IS, z angl. Iner Sphere), druhej sféry (SS, z angl. Second Sphere) a vonkajšej sféry (OS, z angl. Outer Sphere). Rozdiel týchto príspevkov spočíva v polohe a orientácii molekúl vody. Molekula vody vnútornej sféry je priamo koordinová k paramagnetickému iónu a je teda najbližšie k centrálnemu atómu, molekuly druhej sféry sú lokalizované blízko centrálnemu atómu pri hydrofílnych skupinách komplexu (viazané vodíkovými väzbami, atómy ^1H sú orientované ku komplexu, obrázok 16 (52)) a vonkajšia sféra patrí hydratačnému obalu komplexu.



Obrázok 16 – znázornenie molekúl vôd vo vnútornej (červená), druhej (zelená) a vonkajšej (biela) sfére komplexu $[\text{Gd}(\text{dota})]^-$ (52)

Relaxačné časy T_1 a T_2 vnútornej sféry sú popísané nasledujúcimi rovnicami [5] a [6] (53).

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)^{\text{IS}} = \frac{cq}{55,5 T_{1m} + \tau_M} = P_m \frac{1}{T_{1m} + \tau_M} \quad [5]$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)^{\text{IS}} = \frac{P_m T_{2m}^{-2} + \tau_M^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega^2}{\tau_M (\tau_M^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega^2} \quad [6]$$

c je molálna koncentrácia, q je počet priamo koordinovaných vôd k centrálnemu atómu, P_m je molárna frakcia viazaných vôd, τ_M je doba zotrvania molekuly vody vo vnútornej sfére, T_{1m} a T_{2m} sú pozdĺžne a priečne ^1H relaxačné časy a $\Delta\omega$ je rozdiel chemických posunov viazanej molekuly vody k centrálnemu atómu a voľných H_2O .

Relaxácia viazanej molekuly vody prebieha dipól-dipólovým mechanizmom (DD) alebo skalárnym (SC) mechanizmom. Kým DD mechanizmus spočíva v interakcii jadrového spinu a elektrónového spinu (spolu s výmenou viazanej molekuly vody, resp. jej protónov), SC mechanizmus spočíva čisto v relaxácii elektrónového spinu (a výmeny viazanej vody). Spomenuté pozdĺžne (T_1) a priečne (T_2) ^1H relaxačné časy majú práve 2 príspevky DD a SC relaxačných mechanizmov a sú popísané rovnicami [7]–[11] (53).

$$\frac{1}{T_{im}} = \frac{1}{T_i^{DD}} + \frac{1}{T_i^{SC}} \quad [7]$$

$$\frac{1}{T_1^{DD}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma^2 g^2 \mu_B^2}{r_{Gd-H}^6} S(S+1) \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left[7 \frac{\tau_{c2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{c2}^2} + 3 \frac{\tau_{c1}}{1 + \omega_I^2 \tau_{c1}^2} \right] \quad [8]$$

$$\frac{1}{T_1^{SC}} = \frac{2S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \left(\frac{\tau_{e2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{e2}^2} \right) \quad [9]$$

$$\frac{1}{T_2^{DD}} = \frac{1}{15} \frac{\gamma^2 g^2 \mu_B^2}{r_{Gd-H}^6} S(S+1) \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left[13 \frac{\tau_{c2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{c2}^2} + 3 \frac{\tau_{c1}}{1 + \omega_I^2 \tau_{c1}^2} + 4\tau_{c1} \right] \quad [10]$$

$$\frac{1}{T_2^{SC}} = \frac{1}{15} \left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \left(\frac{\tau_{e2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{e2}^2} + \tau_{e1} \right) \quad [11]$$

$i = 1$ alebo 2

γ je jadrový gyromagnetický pomer, g je elektrónový g-faktor, μ_B je Bohrov magnetón, r_{Gd-H} je vzdialenosť elektrónového spinu centrálného atómu od protónu 1H , S je spin, μ_0 magnetický moment, τ_c je korelačný čas, ω_I a ω_S sú jadrové a elektrónové Larmorove frekvencie a A/\hbar je hyperjemná (skalárna, SC) konštanta elektrónového spinu centrálného atómu a protónového spinu koordinovanej molekuly vody.

Prevrátená hodnota korelačného času τ_{ci} pozostáva zo súčtu prevrátených hodnôt rotačného korelačného času τ_R (taktiež $\tau_R = 1 / (6 \times D_R)$, D_R je rotačný difúzny koeficient), času elektrónovej relaxácie T_{ie} a doby zotrvania molekuly vo vnútornej sfére τ_M a obdobne prevrátená hodnota τ_{ei} je súčtom prevrátených hodnôt T_{ie} a τ_M (rovnica [12] a [13] (53)).

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_M} \quad [12]$$

$$\frac{1}{\tau_{ei}} = \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_M} \quad [13]$$

Prehľad rovníc je zjednodušený a platí len za určitých podmienok, medzi ktoré platí, že i elektrónový spinový systém je hlavne výsledkom Zeemanovho javu (zjednodušene, rozštep energetických hladín orbitálov vplyvom magnetického poľa). Posledný set rovníc [14]–[16] (53) popisuje elektrónovú relaxáciu v zmysle javu „zero-field-splitting“ (ZFS, popis rozštepú spinových hladín aj bez prítomnosti magnetického poľa).

$$\left(\frac{1}{T_{1e}}\right)^{ZFS} = 2C \left(\frac{1}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad [14]$$

$$\left(\frac{1}{T_{2e}}\right)^{ZFS} = \left(\frac{5}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{2}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} + 3 \right) \quad [15]$$

$$C = \frac{1}{50} \Delta^2 \tau_v \{4S(S+1) - 3\} \quad [16]$$

S je spin centrálného atómu, Δ^2 je kvadratická hodnota fluktuácie ZFS a τ_v je korelačný čas modulácie ZFS.

Zo spomenutých rovníc je najdôležitejšie všimnúť si premenných, ktoré priamo ovplyvňujú relaxačný čas protónov molekuly vody (tabuľka 6). Ďalšia podkapitola sa podrobnejšie zaoberá každou z nich a ich cieľným modifikovaním.

Tabuľka 6

Relaxačné parametre ovplyvňujúce R_{1p}

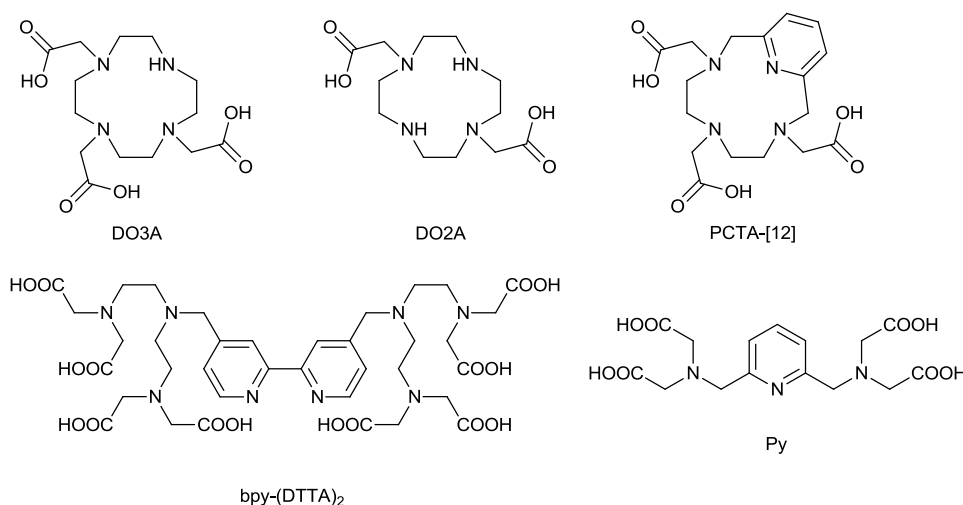
q	počet priamo koordinovaných vôd
τ_M	čas zotrvania vody koordinovanej
τ_R	rotačný korelačný čas komplexu
r_{Gd-H}	vzdialenosť elektrónového spinu Gd^{3+} od protónu 1H
T_{1e}	čas elektrónovej relaxácie
Δ^2	kvadrát fluktuácie ZFS
τ_v	korelačný čas modulácie ZFS

1.3.1 Parametre ovplyvňujúce relaxivitu

1.3.1.1 Počet priamo koordinovaných vôd (q)

Počet priamo koordinovaných vôd k centrálnemu atómu, parameter q , lineárne korešponduje s pozorovanou relaxáciou protónov molekúl vody R_{1p} (rovnica [5]). Klinicky používané gadolinité kontrastné látky koordinujú len jednu molekulu vody. Gadolinitý kation má (často) 9 koordinačných miest – na osem sa koordinujú donorové atómy ligandu a posledné voľné býva v roztoku okupované molekulou vody.

Odstránením jednej koordinačnej väzby ligandu, t.j. donorového atómu, vzniká ďalšie miesto pre koordináciu H_2O . Touto myšlienkou bola vytvorená rada ligandov na obrázku 16. Relaxivita ich Gd^{3+} komplexov je skutočne vyššia, no nedosahuje dvojnásobných hodnôt *in vivo* oproti Gd^{3+} komplexom s $q = 1$. Príčinou je bidentátna koordinácia endogénnych aniónov akými sú HPO_4^{2-} , HCO_3^- a CO_3^{2-} . Po ich koordinácii sa relaxácia H_2O prakticky znižuje na nulu. Navyše odolnosť týchto komplexov (*in vitro* / *in vivo*) sa znižuje až niekoľkokrátovo.



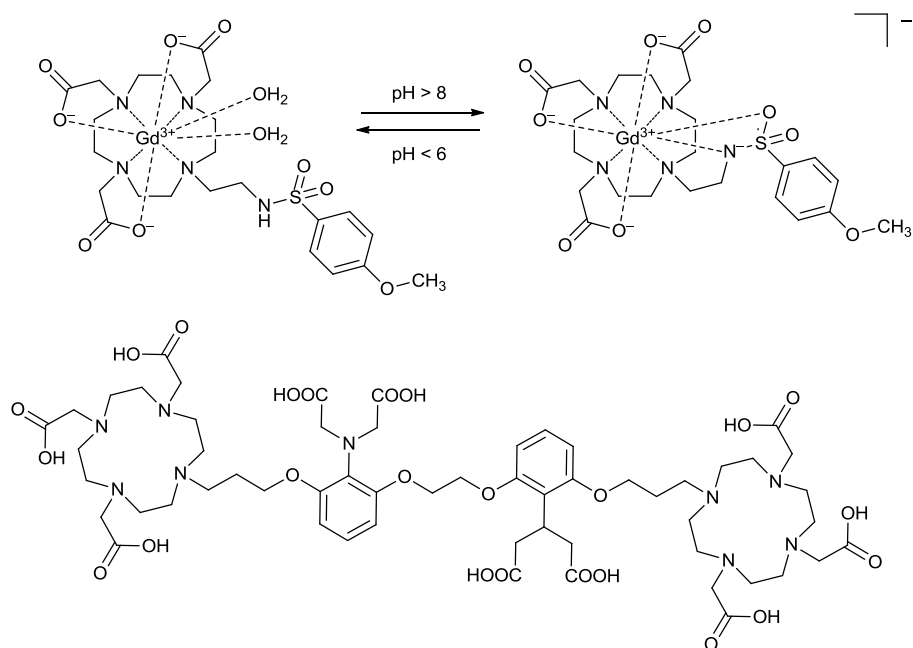
Obrázok 16 – ligandy, ktorých Gd^{3+} komplexy majú $q > 1$

Riešením súčasnej koordinácie viacerých molekúl vody ku Gd^{3+} by bola negeminálna koordinácia (nie „vedľa seba“), a tým by bola odstránená možnosť koordinácie endogénnych ligandov bidentátne. Tohto princípu využívajú komplexy ligandov TREN-HOPO ($q_{negemin} = 2$ (54)). Spomenutá nízka rozpustnosť a mierna kinetická labilita komplexov nie je príliš motivačná pre ich detailnejší výzkum.

Molekuly vody vonkajšej sféry tvoria hydratačný obal hydrofílnej častice. Po ich dostatočnom priblížení k centrálnemu atómu (napríklad vodíkovými väzbami ku skupinám ligandu) je možné znížiť hodnotu vzdialenosti r_{Gd-H} tak, aby sa na protónoch H_2O prejavovali relaxačné vlastnosti Gd^{3+} . K celkovej pozorovanej relaxácii H_2O výrazne prispieva aj druhá sféra (až do 30–50 %). Príkladom je gadolínový komplex od ligandu DOTP (obrázok 8), ktorý už bol diskutovaný vyššie.

Zmenu veľkosti hodnoty q využívajú aj pH rezponzívne kontrastné látky, ktoré obsahujú špecifickú skupinu. Pri určitej hodnote pH je donorový atóm tejto skupiny protonizovaný a nemá koordinačné schopnosti, no po zvýšení hodnoty pH nastáva postupná deprotonizácia a koordinácia k centrálnemu atómu, napríklad na miesto koordinácie molekuly vody (obrázok 17). Tým je relaxivita komplexu podstatne znížená (55).

Časť tzv. „smart“ (múdрых) T_1 -kontrastných látok má vo vode nízku relaxivitu, no pri fyziologických podmienkach *in vivo* niekoľkonásobne vyššiu. Dôvodom je zmena počtu koordinovaných molekúl vôd k centrálnemu atómu zapríčinené preferovanou väzbou niektorých donorových atómov funkčných skupín k inému katiónu kovu (napr. Ca^{2+} , obrázok 17 (56)). Obrovskou nevýhodou tohto typu kontrastných látok je „vychytávanie“ určitých biogénnych iónov z prostredia, čo zapríčiní lokálny deficit s možnými patologickými poruchami až s následkom smrti.

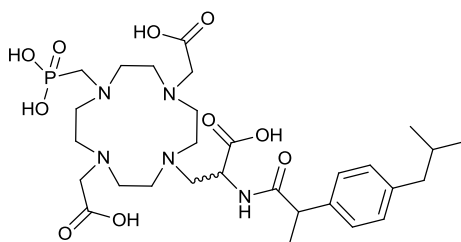


Obrázok 17 – princíp jednej pH-senzitívnej T_1 -kontrastnej látky $Gd[(do3a-SA)]$ (55) (hore) a ligand vaperatého T_1 -MR senzoru (56) (dolu)

1.3.1.2 Rezidentný čas koordinovanej molekuly vody (τ_M)

Koordináciou „excitovanej“ (vonkajším pulzom) molekuly vody k paramagnetiku sa urýchli jej prechod na základnú hladinu. Ak relaxovaná molekula vody zotrúva príliš dlho koordinovaná, potenciálna schopnosť paramagnetika relaxovať ďalšie molekuly vody nie je úplne využitá. Práve tak je možno charakterizovať súčasne používané klinické T_1 -kontrastné látky. Urýchlením výmeny koordinovanej vody (znížením času τ_M) je možné zvýšiť relaxivitu až niekoľkonásobne. Avšak extrémne rýchla výmena H_2O , t.j. príliš rýchla dekoordinácia, môže byť rýchlejšia ako samotná relaxácia protónov koordinovanej H_2O , no tá zatiaľ nebola pozorovaná. Rýchlosť výmeny priamo k centrálnemu atómu koordinovanej molekuly vody ($k_{ex} = 1 / \tau_M$) je závislá na parametroch ligandu i roztoku.

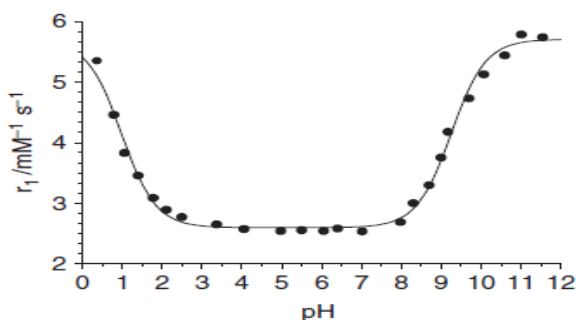
Jedným z prístupov zrýchlenia výmeny priamo koordinovanej vody je zvýšenie jej labilnosti, t.j. Gd^{3+} komplex má v roztoku priemernú hodnotu $q < 1$. Príkladom je ligand na obrázku 18, (57) ktorého Gd^{3+} komplex má hodnotu q rovnú 0,15. Tým je jeho veľkosť τ_M znížená až o jeden rád ($\tau_M = 2,4 \pm 0,9$ ns) oproti očakávanej hodnote. Pre porovnanie, komplex $[Gd(dota)]^-$ má rezidentný čas $\tau_M = 244$ ns (58).



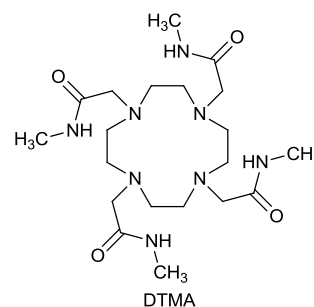
Obrázok 18 – ligand, ktorého Gd^{3+} komplex má extrémne rýchlu výmenu koord. vody (57)

U komplexov makrocyclických ligandov izoméria SA a TSA značne ovplyvňuje hodnotu τ_M . Flexibilnejší izomér TSA poskytuje viac priestoru pre centrálny atóm a ten dokáže lokálnym pohybom vypudiť koordinovanú vodu až 10–100× rýchlejšie ako izomér SA (dutina izoméru SA je o $d \sim 0,2$ Å menšia oproti dutine izoméru TSA).

Vlastný roztok T_1 -kontrastnej látky niekedy mení pozorovanú relaxáciu H_2O najmä pri extrémnych („nefyziologických“) hodnotách pH – pod 2 a nad 8. Vďaka preskokom protónov („proton hopping“) medzi početnými nabitými časticami pri týchto hodnotách pH je relaxácia vektorov magnetizácie 1H značne urýchlená. Relaxivita gadolinitého komplexu môže zdánlivo nelogicky narásť a pozorovaná skutočnosť vyplýva práve z pH roztoku (obrázok 19 a 20 (58)).



Obrázok 19 – závislosť r_{1p} komplexu $[Gd(DTMA)]^{3+}$ na pH (58)

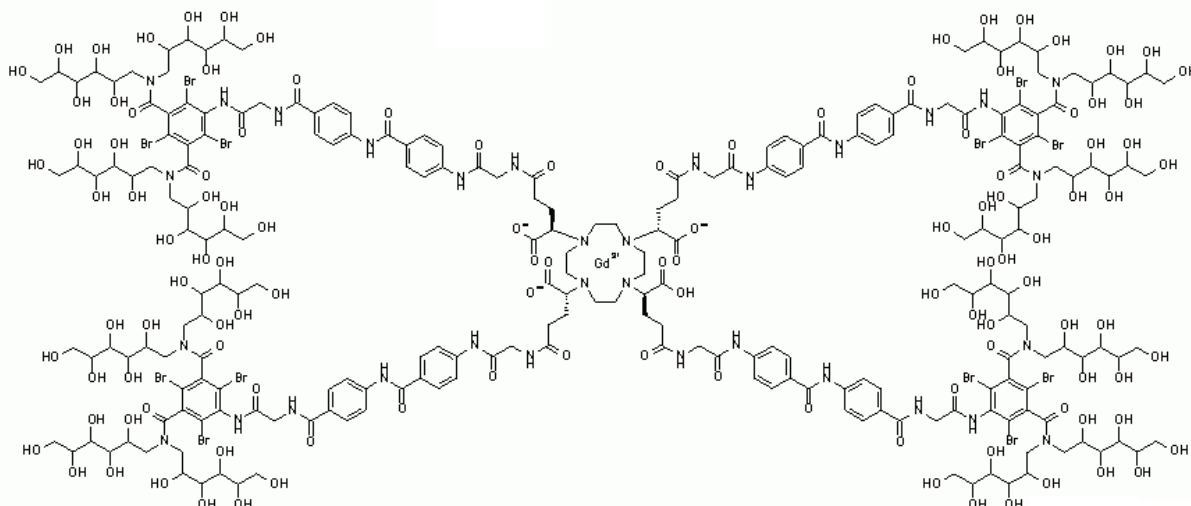


Obrázok 20 – ligand DTMA

1.3.1.3 Rotačný korelačný čas komplexu (τ_R)

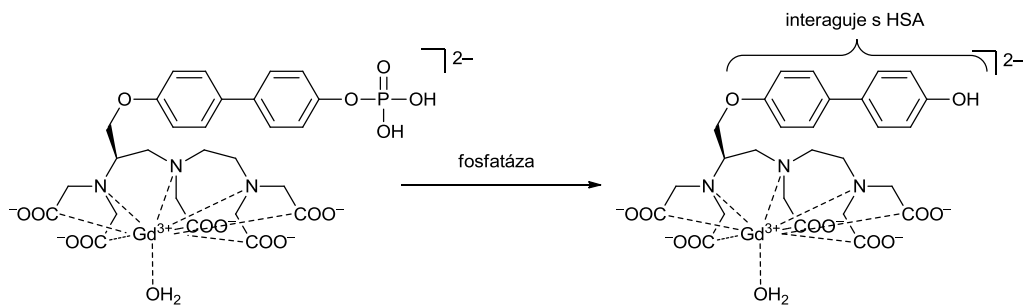
Súčasne klinicky používané T_1 -kontrastné látky majú čas τ_R krátky – tzv. „molecular tumbling“ (lokálny osný pohyb molekuly) komplexu je výrazný. Riešením by bolo zvýšiť viskozitu prostredia, čím by sa relaxivita gadolinitého komplexu naozaj zvýšila, no v prostredí *in vivo* to nie je možné urobiť.

Najjednoduchším znížením pohybu komplexu je zvýšiť jeho molekulárnu hmotnosť. Navýšenie M_r je dosiahnuteľné kovalentnou väzbou komplexu na objemnú makromolekulu (Vistarem[®] (59), obrázok 21) alebo nekovalentne k proteínu (Ablavar[®], v prílohe). Väzby na veľké makromolekuly, akými sú rôzne konjugáty (cyklodextríny (60)), micely a lipozómy (61), dendriméry (62) alebo proteíny (63), majú za následok zvýšenie času τ_R a pozorovanej relaxácie protónov H_2O . Exkrécia takýchto látok je náročná, preto je preferovaná reverzibilná interakcia, ktorá je za určitých podmienok silná (počas MR snímania) alebo minimálna (počas vylučovania).



Obrázok 21 – T_1 -kontrastná látka Vistarem[®] (P792) (59)

Pod princíp znižovania miery lokálneho pohybu patrí aj časť tzv. „smart“ (múdрых) T_1 -kontrastných látok. Tieto (najmä) gadolinité komplexy dosahujú nízkych hodnôt relaxív *in vivo*. Avšak za určitých podmienok, akými môže byť prítomnosť enzýmu, ktorý modifikuje ligand komplexu (obrázok 22 (64)), alebo prítomnosť určitého katiónu, ktorý je koordinovaný voľnými donorovými atómami funkčných skupín niekoľkých ligandov komplexu (vznik makrokomplexu; napríklad makrokomplex s Fe^{2+} a tromi gadolinítmymi komplexami bpy-(DTTA)₂ (65), ktorého ligand je na obrázku 16), je pozorovaná relaxácia protónov H_2O niekoľkonásobná.



Obrázok 22 – enzýmom aktivovaná T_1 -kontrastná látka (64)

1.3.1.4 Ostatné parametre

Najväčší príspevok do celkovej pozorovanej relaxácie určitého nuklidu tvorí veľkosť elektrónového relaxačného času T_{1e} centrálného atómu. Z toho dôvodu sú T_1 -kontrastné látky založené na gadolinitom katione (základný totálne symetrický stav $^8S_{7/2}$) a nie na dysprozitom alebo holmitom, ktoré majú cca 1,3-násobne väčšiu hodnotu magnetického momentu. Cieľene ovplyvniť hodnotu T_{1e} kontrastnej látky zatiaľ nie je možné, i keď blízkosť dvoch paramagnetických centier v rámci jedného komplexu by mohla tento čas teoreticky zmeniť – taktiež pravdepodobne by bol ovplyvnený kvadrát fluktuácie ZFS Δ^2 . Zvýšením celkovej symetrie komplexu T_1 -kontrastnej látky, akou je napríklad $[\text{Gd}(\text{dota})]^-$ (symetria C_4 , prítomný v medicíne Dotarem[®]), má za následok cieľené predĺženie času T_{1e} , ktorého zmena sa prejavuje v $^1\text{H-NMRD}$ profiloch (viď ďalej).

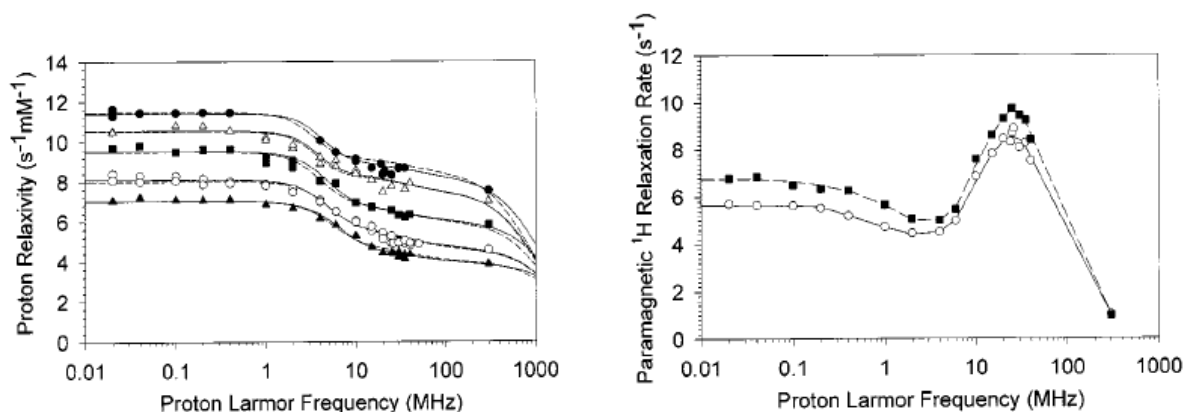
Vzdialenosť koordinovanej molekuly vody od centrálnemu atómu veľmi výrazne mení celkovú relaxivitu komplexu. Zmena vzdialenosti centrálnemu atómu a protónov koordinovanej molekuly vody, ktorá býva v rozmedzí 3,0–3,2 Å (66), o 0,1 Å vyústí do zmeny relaxivity o 20 %. Pri priblížení o 0,2 Å dokonca r_{1p} vzrastie o 50 % (66). Teoreticky sa dá modifikovať dĺžku $r_{\text{Gd-H}}$ nasledovne. Zmeniť dĺžku koordinačnej väzby možno zvýraznením preferencie centrálnemu atómu pre kyslíkové donorové atómy. Avšak koordináciou slabých donorových atómov ligandu (S, P, N) je oslabený vznik komplexu (zníženie termodynamickej stability a kinetickej inertnosti) a taktiež je spomalená výmena koordinovanej molekuly vody. Druhou možnosťou je reorientovať protóny koordinovanej molekuly vody, ktoré bežne smerujú od centrálnemu atómu, k paramagnetiku (napríklad vodíkovými väzbami), no tým by sa deformovala koordinačná väzba a taktiež orbitály kyslíkového atómu.

1.3.2 Získanie relaxačných parametrov T_1 -kontrastnej látky

1.3.2.1 ^1H -NMRD a ^{17}O -NMR

SBM teória popisuje pozorovanú relaxáciu protónov molekuly H_2O . Paramagnetický príspevok R_{1p} je závislý od mnoha parametrov, ktoré sú zväčša teplotne závislé, a intenzity magnetického poľa B . Získanie údajov R_{1p} pri rôznych magnetických poliach a teplotách prebieha ^1H -NMRD (z angl. proton Nuclear Magnetic Resonance Dispersion) meraním. Súčasné NMR spektrometre je možné zostrojiť a na nich naladiť stabilné magnetické pole odpovedajúce ^1H Larmorovej frekvencii od 20 MHz (0,023 T) po, zatiaľ len teoreticky, približne 2000 MHz (zatiaľ najsilnejší supravodivý Nb_3Sn magnet, $B = 45$ T (67)). Relaxačné údaje komplexov v magnetickom poli pod 20 MHz sú zaujímavé pre ich maximálny príspevok DD korelačného času (elektrónové relaxačné parametre). Tak nízke stabilné magnetické polia sú dosiahnuteľné relaxometrom s FFC (z angl. Fast-Field Cycling), ktoré pre laboratórne účely boli zostrojené len pred cca 20 rokmi (predáva ich talianska firma STELAR (68)).

Zo štandardného ^1H -NMRD profilu T_1 -kontrastnej látky (závislosť pozorovanej r_{1p} alebo R_{1p} na Larmorovej frekvencii pozorovaného jadra – pre ^1H H_2O , obrázok 23 (69)) je možné pozorovať 3 odlišné časti. Od frekvencie 0,01 MHz do 3–4 MHz je lineárna oblasť, ktorá je závislá najmä na veľkosti elektrónových relaxačných parametrov. Od frekvencie 3–4 MHz do 20 MHz nastáva pokles pozorovanej hodnoty R_{1p} a od 20 MHz je tvar krivky dominantne závislý na veľkosti rotačného korelačného času τ_R meranej látky. Vznik lokálneho maxima od frekvencie 20 MHz do cca 100 MHz spôsobí predĺžený čas τ_R . Toto maximum môže byť, pri optimalizovanej veľkosti parametru τ_R , aj globálne. Od frekvencie 100 MHz nahor sú zmeny relaxačných parametrov vo výsledku málo závislé na veľkosti pozorovanej hodnoty R_{1p} .



Obrázok 23 – štandardný ^1H -NMRD profil T_1 -kontrastnej látky ($[\text{Gd}(\text{MS}-325)]^{3-}$ bez prítomnosti HSA, vľavo) a špecifickej ($[\text{Gd}(\text{MS}-325)]^{3-}$ s prítomnosťou HSA, vpravo) pri rôznych teplotách, prevzaté z (69)

Počet priamo koordinovaných vôd k centrálnemu atómu (q) sa prejaví v ^1H -NMRD profile ako lineárna korelácia hodnoty q s R_{1p} (podľa rovnice [5]). Táto zmena hodnoty q je najvýraznejšia pri nízkych hodnotách Larmorovej frekvencie.

Parameter τ_M nie je jednoduché vyčítať z $^1\text{H-NMRD}$ profilu T_1 -kontrastnej látky. Analýza teplotne (alebo tlakovo) závislých spektier $^{17}\text{O-NMR}$ danej látky, ktorých rýchlosť výmeny priamo koordinovanej H_2O najvýraznejšie ovplyvňuje, dopĺňa $^1\text{H-NMRD}$ profily. Popis tvaru signálu H_2^{17}O (poloha a pološírka) s prítomnosťou paramagnetika podľa rovníc [17]–[21] (70) v kombinácii so SBM rovnicami je možné vo výsledku získať všetky relaxačné parametre. Vysoká náročnosť stanovovania 8–12 relaxačných parametrov naraz je riešená fixovaním vopred určených parametrov ako $r_{\text{Gd-H}}$ (rovné 3,0–3,2 Å), q (z tvaru $^{17}\text{O-NMR}$ signálu komplexu a iných meraní) a E_v (aktivačná energia).

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2A}} \right] = \frac{1}{\tau_M} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_M^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega^2}{(\tau_M^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega^2} + \frac{1}{T_{2OS}} \quad [17]$$

$$\frac{1}{T_{2m}} \cong \frac{1}{T_{2SC}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 \left(\tau_{e1} + \frac{\tau_{e2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{e2}^2} \right) \cong \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 \tau_{e1} \quad [18]$$

$$\Delta\omega_r = \frac{1}{P_m} (\omega - \omega_A) = \left(\frac{1}{\tau_M} \right)^2 \frac{\Delta\omega}{(\tau_M^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega^2} + \Delta\omega_{OS} \quad [19]$$

$$\Delta\omega = \frac{g_L \mu_B S(S+1) B}{3 k_B T} \left(\frac{A}{\hbar} \right) \quad [20]$$

$$k_{\text{ex}} = \frac{1}{\tau_M} = \frac{k_B T}{h} e^{\left(\frac{\Delta S^*}{R} - \frac{\Delta H^*}{RT} \right)} = \frac{k_{\text{ex}}^{298} T}{298,15} e^{\left[\frac{\Delta H^*}{R} \left(\frac{1}{298,15} - \frac{1}{T} \right) \right]} \quad [21]$$

T_{2r} je redukovaný priečný relaxačný čas, T_2 je priečný relaxačný čas paramagnetika, T_{2A} je relaxačný čas referencie, T_{2m} relaxačný čas koordinovanej vody a T_{2OS} relaxačný čas OS vody, čas τ_{ei} je definovaný rovnicou [13], $\Delta\omega_r$ je redukovaný $^{17}\text{O-NMR}$ chemický posun, ω je $^{17}\text{O-NMR}$ chemický posun paramagnetika, ω_A je $^{17}\text{O-NMR}$ chemický posun referencie, g_L je izotropický Landého g-faktor, $\Delta\omega_{OS}$ je príspevok OS vody k $^{17}\text{O-NMR}$ chemickému posunu, ΔS^* a ΔH^* je entropia a enthalpia aktivácie výmenného procesu a k_{ex}^{298} je rýchlosť výmeny koordinovanej vody pri $T = 298,15$ K.

1.3.2.2 Počet priamo koordinovaných vôd (q)

Pre vysokú schopnosť Gd^{3+} katiónu relaxovať a rozširovať signály v 1H -NMR spektroskopii a neideálne energetické stavy orbitálov je analýza hodnoty q komplexu zúžená len na tvar a polohu ^{17}O -NMR signálu priamo koordinovanej molekuly $H_2^{17}O$. Ďalšou metódou je pokročilá ENDOR (z angl. Electron Nuclear Double Resonance) spektroskopia, ktorá ešte nie je veľmi rozšírená a používaná. Zistiť hodnotu $q(Gd-L)$ je možné nepriamo, a to pre analogické komplexy „susedných“ iónov lanthanoidov Eu^{3+} , Tb^{3+} a Dy^{3+} .

1.3.2.2.1 Luminiscenčné merania Eu^{3+} a Tb^{3+} komplexov

Keďže rýchlosť výmeny koordinovanej vody na Ln^{3+} komplexoch T_1 -kontrastných látkach je rýchlejšia, než sú elektrónové relaxácie, je možné sledovať priemer oboch foriem častíc (izoméry SA a TSA, možné s rôznym parametrom q). Energetické hladiny Eu^{3+} a Tb^{3+} sú unikátne. Prvý excitovaný stav Eu^{3+} patrí hladine 5D_0 a relaxácia prebieha do energetických hladín $^7F_{0-6}$ (pre Tb^{3+} excitovaný stav prislúcha 5D_4 a relaxuje do hladín $^7F_{6-0}$).

Meraním excitačných a emisných spektier je získaná poloha a intezita excitačných a emisných pásov, ktoré odpovedajú jednotlivým prechodom. Prechody hypersenzitívne ($\Delta J = 2n$, $n = 0, 1, 2$; elektrónovo povolené) sú pomerne málo intenzívne pre vysoko symetrické komplexy, no magneticky dipolovo povolené ($\Delta J = 1$) sú rovnako intenzívne pre každý europitý komplex. Cielenu excitáciou a časovo závislým sledovaním emisie v určitom páse je vidieť exponenciálny pokles signálu. Ten je zapríčinený okrem štatistiky i čiastočným prenosom energie na koordinovanú molekulu vody (energeticky príbuzné hladiny 5D_0 Eu^{3+} a O–H vibrácie). Po zámene rozpúšťadla H_2O za D_2O je uskutočnený čiastočný prenos energie z 5D_0 Eu^{3+} na O–D vibráciu molekuly D_2O , ktorá je menej účinným „zhášačom“ ako vibrácia O–H molekuly H_2O . Obdobný princíp platí i pre komplexy Tb^{3+} (základná hladina je 7F_6 a excitovaná 5D_4).

Exponenciálne závislosti zhášania sú korelované rýchlostnou konštantou k_H , resp. k_D . Prevrátená hodnota rýchlostnej konštanty je rovná dobe života τ . Rozdiel rýchlostných konštánt priamo závisí na počte koordinovaných vôd k centrálnemu atómu (Eu^{3+} , Tb^{3+}). Mnoho autorov (tabuľka 7) skúmalo tieto závislosti a výsledkom sú 2 používané rovnice výpočtu hodnoty parametru q .

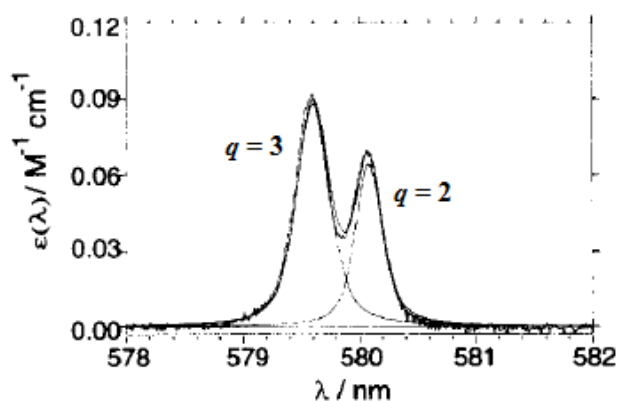
Tabuľka 7

Výpočet hodnoty q z luminiscenčných meraní

Rovnica	Chyba Δq	A		corr		Ref.
		Eu^{3+}	Tb^{3+}	Eu^{3+}	Tb^{3+}	
$q = A(k_H - k_D)$	0,50	1,05	4,20	–	–	(71)
$q = A(k_H - k_D - corr)$	0,25	1,20	5,00	0,25	0,06	(72)

1.3.2.2.2 Vysokorozlíšené UV-VIS meranie Eu^{3+} komplexov

Zakázaný absorpčný pás ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{D}_0$ europitých komplexov je jedinečný – nie je štiepaný inými prechodmi z energetických hladín J - J interakcie. Tento 0,5 nm široký (veľmi úzky, a teda je potrebné citlivé meranie s malým krokom) vyskytujúci sa $\lambda = 578\text{--}581$ nm odpovedá práve jednému typu koordinácie europitého iónu v roztoku. Keďže elektrónová excitácia je rýchlejšia ako výmena priamo koordinovanej vody, je možné metódou UV-VIS sledovať rôzne hydratované častice v roztoku (výsledkom luminiscenčných experimentov je zistená len priemerná hodnota q týchto Eu^{3+} komplexov). Pri zmene koordinačného čísla europitých komplexov je v absorpčnom spektre patrných viac signálov ($[\text{Eu}(\text{edta})]^-$, obrázok 24 (73)), ktorých $\Delta\lambda$ je cca 0,5–0,7 nm. Absorpčné pásy ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{D}_0$ rovnako hydratovaných ($q_{\text{SA}} = q_{\text{TSA}}$) izomérov SA a TSA Eu^{3+} komplexov makrocyclických ligandov sa líšia len o pár desiatín nm, čo sa prejaví len nesymetrickosťou pozorovaného signálu.



Obrázok 24 – vysokorozlíšené UV-VIS spektrum Eu^{3+} komplexu ligandu EDTA (298 K) (73)

Pozorovanie zdanlivo jedného signálu u Eu^{3+} komplexov makrocyclických derivátov naznačuje rovnocennú vnútornú hydratačnú sféru prítomných SA a TSA izomérov. Pri bližšom skúmaní absorpčného signálu spomenutého komplexu ligandu je možné jeho dekonvolúciou (rozložením) získať oba signály odpovedajúce obom zastúpeným izomérom. Signál jednej častice je nutné dekonvolúovať kombináciou rovnice [22] (t.j. tvar gaussovského priebehu funkcie) a [23] (t.j. tvar lorentzovského priebehu funkcie) (73). Pozorovaný signál je napokon súčtom všetkých prispievajúcich častíc v danej oblasti vlnočty.

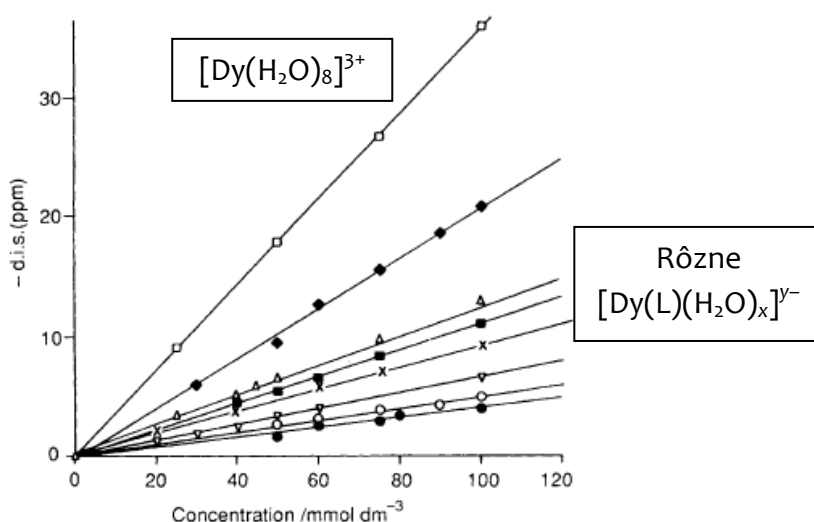
$$I(\nu)_{\text{GAUSS}} = q \left[\frac{1}{\Delta_i} \left(\frac{4 \ln 2}{\pi} \right)^{1/2} \exp \left\{ - \left(\frac{2 \ln 2 (\nu - \nu_{\text{max},i})}{\Delta_i} \right)^2 \right\} \right] \quad [22]$$

$$I(\nu)_{\text{LORENTZ}} = (1 - q) \left[\frac{2}{\Delta_i \pi} \frac{1}{1 + \left(\frac{2[\nu - \nu_{\text{max},i}]}{\Delta_i} \right)^2} \right] \quad [23]$$

$I(\nu)$ je intenzita signálu v hodnote vlnočty ν , q je pomer tvaru signálu odpovedajúceho gausiánu a lorentziánu, Δ je normalizovaná pološírka signálu, index „max“ odpovedá polohe maxima signálu a index „i“ značí poradové číslo signálu.

1.3.2.2.3 ^{17}O -NMR DIS – „Dysprosium Induced Shift“

Vďaka prítomnosti paramagnetika v meranom roztoku NMR spektroskopiou je chemický posun závislý na koncentrácii paramagnetika. Pre Dy^{3+} (aj pre Gd^{3+}) je chemický posun zapríčinený dominantne kontaktným príspevkom (nad 85 %). Voľné Dy^{3+} sa v mierne okyslenom vodnom roztoku ($\text{pH} < 4,5$) nachádza takmer výlučne ako oktaqua kation. Kombináciou uvedených vlastností je možné navrhnuť experiment, ktorý určí počet priamo koordinovaných vôd ku kationu dysprózie, a je závislý len na koncentrácii Dy^{3+} . Pretože donorový atóm vody priamo koordinovaný k Ln^{3+} je O, k stanoveniu je využívaná ^{17}O -NMR spektroskopia (izotop ^{16}O má jadrový spin rovný nule). Pre nízke zastúpenie izotopu ^{17}O (0,04 %) býva voda vo vzorke obohatená s H_2^{17}O . Z pomeru smerníc závislosti chemického posunu ^{17}O $[\text{Dy}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$ na koncentrácii aquakomplexu a totožnej koncentračnej závislosti pre $[\text{Dy}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_x]^{y-}$ je možné určiť „ x “ (t.j. hodnotu parametru q (74), chyba je cca 0,3; obrázok 25).



Obrázok 25 – závislosť chemického posunu ^{17}O H_2O na koncentrácii $\text{Dy}(\text{L})$ (74)

1.3.2.2.4 Hodnota A / \hbar a ENDOR spektroskopia

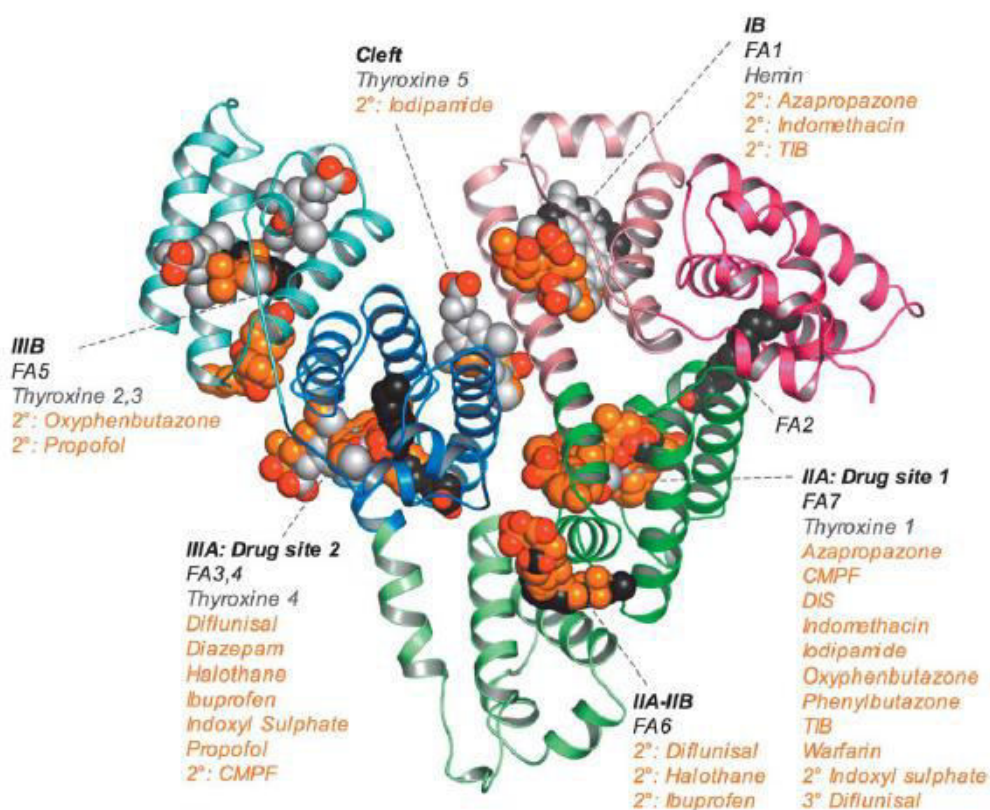
Hodnota podielu A / \hbar , získaná fitovaním ^1H -NMRD profilov a ^{17}O -NMR teplotných závislostí, je závislá na SC kontakte paramagnetika s koordinovanou vodou. Ak je táto konštanta výrazne odlišná od hodnôt podobných komplexov (pre komplexy podobné DOTA je $A / \hbar = (-3,8 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ rad s}^{-1}$ (75)), je vhodné predpokladať inú hodnotu parametru q .

Najnovšia metóda zistenia veľkosti hodnoty q zahŕňa ENDOR spektroskopiou. Toto náročné stanovenie obsahuje meranie komplexu v zamrznutom vodnom roztoku ($T < 8 \text{ K}$) o fyziologickej koncentrácii pri konštantnom magnetickom poli (rozštiepenie hladín jadra) ožarovaním určitou rádiovou frekvenciou (ovplyvnenie hladín elektrónov, názorné na princípoch EPR spektroskopie). Pre nízky počet vhodných spektroskopov a vyškolených osôb k tejto problematike je charakterizácia látok touto metódou zatiaľ skôr vzácna. Výsledkom správneho merania a výpočtov je určenie hodnoty q s relatívne malou chybou.

1.4 Vybrané špeciálne atribúty MR kontrastných látok

1.4.1 Interakcia s ľudským sérovým albumínom

Najzastúpenejšou bielkovinou v krvnom riečisku je sérový albumín (HSA, z angl. Human Serum Albumin). Jeho úlohou je udržiavať osmotický tlak, stálu hodnotu pH a taktiež prenáša niektoré hormóny a mastné kyseliny. Dospelý jedinec má v krvi približne 0,5–0,8 mM roztok (čo odpovedá cca 4±1 hmotnostným %). Táto makromolekula ($M_r \sim 67$ kDa) srdcovitého tvaru obsahuje dve hlavné hydrofóbne dutiny (IIA – miesto 1 a IIIA – miesto 2; ďalšie minoritne využívané miesta sú znázornené na obrázku 26 (76)), do ktorých sa môžu nekovalentne a reverzibilne naviazať hydrofóbne časti molekúl. Mnoho bežne používaných medikamentov využíva tejto interakcie, a tým je predĺžený ich polčas vylučovania (tabuľka 8 (77)).



Obrázok 26 – HSA s vyznačenými hydrofóbnymi miestami, prevzaté z (76)

Návrhom ligandu T_1 -kontrastnej látky s postranou hydrofóbnou skupinou a jej efektívnou interakciou s kavitou HSA je docielené majoritné zastúpenie komplexu v krvi po aplikácii do tela pacienta. MR snímky tým zobrazujú cievy pacienta (spolu s renálnou vylučovacou cestou) – MRA (z angl. Magnetic Resonance Angiography). Alternatívou k tejto metóde je XRA (z angl. X-Ray Angiography), ktorá zahŕňa injekčnú aplikáciu kontrastnej látky (jódovej povahy) cez katéter priamo do snímaného miesta. Tým existuje nenulová šanca vážneho poškodenia cievy, vnútorného krvácania a zlyhania obličiek z aplikovania kontrastnej látky s možným následkom smrti.

Tabuľka 8 (77)

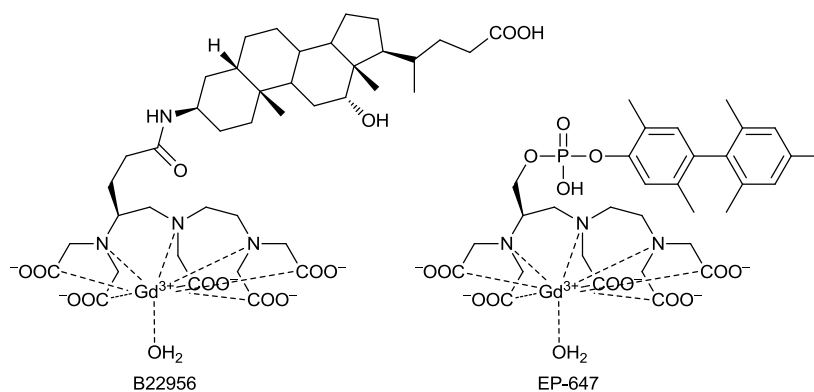
Hydrofóbná interakcia niektorých ďalších liekov s HSA

Medikament	Terapeutická trieda	Väzba k HSA	
		Miesto 1	Miesto 2
Carbadox	Antibiotikum	–	slabá
Diclofenac	Nesteroidné antiflogistikum	silná	silná
Efavirenz	Antivirotikum	–	silná
Furosemide	Diuretikum	silná	–
Glimepiride	Antidiabetikum	silná	–
L-thyroxine	Hormón štítnej žľazy	silná	slabá
Miconazole	Antiparazitikum	–	silná
Nefazodone	Antidepresívum	–	silná
Phenylbutazone	Nesteroidné antiflogistikum	silná	–
Sulfasalazine	Antiflogistikum	silná	silná
Tamoxifen	Hormonálna chemoterapia	–	silná
Tetracycline	Tetracyklín, antacid	silná	–

Vytvorením aduktu Gd^{3+} komplexu s HSA je relatívna hmotnosť (M_r) kontrastnej látky niekoľkonásobne navýšená, čím sa jej lokálna pohyblivosť drasticky zníži. Predĺženie času τ_R má za následok mnohonásobné zvýšenie pozorovanej R_{1p} (r_{1p} komplexu) v oblasti magnetického poľa o intenzite 0,5 až 1,5 T (viď princíp látky Ablavar[®] a obrázok 23).

Medzi prvými T_1 -kontrastnými látkami viažucimi sa k HSA boli dnes komerčne využívané medikamenty Multihance[®] a Eovist[®] (viď príloha). Ich benzyloxymetylová, resp. ethoxybenzylová, skupina je schopná slabej intekcie s hydrofóbnou kavitou, čím sa mierne zvýši relaxivita komplexu (o desiatky percent), a tým je potrebné množstvo aplikovanej kontrastnej látky znížené (viď príloha). Zlepšenie pevnosti a preferencie viazania sa k HSA bolo docielené u T_1 -kontrastnej látky Ablavar[®] (kedysi predávané pod názvom Vasovist[®], viď príloha). Tento derivát DTPA s postrannou 4,4-difenylycyklohexylesterovou skupinou je *in vivo* naviazaný z 80–90 % k podmiestu IIIA HSA (78) a relaxivita komplexu je zvýšená až 5-násobne (stanovené *in vivo* (79)). Avšak táto hydrofóbná interakcia u látky Ablavar[®] je natoľko pevná (afinitná (termodynamická) konštanta $K_{af} = 80 \mu M$ (80)), že komplex je (renálne) vylučovaný len veľmi pomaly. V čase rozšírenia choroby NSF a zistenia jej príčiny (dlhá cirkulácia T_1 -kontrastnej látky *in vivo*) bol schvaľovací proces klinického použitia medikamentu Ablavar[®] v Európe pozastavený (doteraz neobnovený). No v USA je stále hojne používaný.

Od úplnej charakterizácie látky Ablavar[®] bolo syntetizovaných množstvo T_1 -kontrastných látok, ktoré cieľili k spevneniu hydrofóbnnej interakcie s HSA so zachovaním odolnosti (termodynamickej a kinetickej) pôvodného typu ligandu, od ktorého boli odvodené (DTPA, obrázok 27). Niektoré boli zaradené až do klinických štúdií, no ich financovanie bolo pred rokmi pozastavené (Gd^{3+} komplex od ligandu B22956).



Obrázok 27 – komplexy, ktoré majú veľkú afinitu k hydrofóbnym miestam HSA

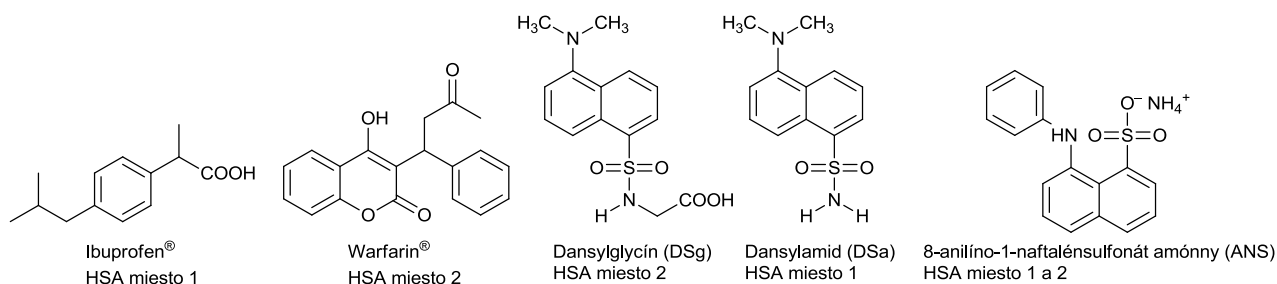
Taktiež bola vytvorená skupina „smart“ T_1 -kontrastných látok, ktoré sa po podaní *in vivo* správajú ako „bežné“ T_1 -kontrastné látky. Po reakcii katalyzovanej určitým špecifickým enzýmom nastáva modifikácia časti komplexu medikamentu. Príkladom je už spomenutý komplex, ktorý podlieha zmene znázornenej na obrázku 22. Po odštiepení fosfátovej skupiny fosfatázou vykazuje silnú interakciu s HSA, a tým je pozorované irreverzibilné zvýšenie relaxivity v mieste reakcie. Časovo rozlíšené snímanie MR snímok zachytí túto reakciu, resp. zmenu R_1 protónov H_2O . Metodológia môže byť využitá k sledovaniu enzymatickej aktivity *in vivo*.

K presnému určeniu miestu interakcie hydrofóbnej skupiny s HSA je využívaná (okrem röntgenoštruktúrálnej analýzy monokryštálu aduktu) metóda kompetitívnej inhibície pozorovanej fluorescenčným spektrometrom. Po naviazaní niektorých fluorescenčných látok do kavity HSA nastáva posun ich emisného maxima (príklady na obrázku 28). Kompetíciou o toto definované miesto je pozorovaná fluorescencia znížená o určitý násobok, ktorý je závislý na rovnovážnej konštante asociácie vzniku komplexu zúčastnených látok. Konštanta asociácie (prevrátená hodnota konštanty disociácie) je primárne získaná snímaním poklesu autofluorescencie aminokyselinových zvyškov (najmä tryptofán) pri kavitách po prídavku pri nich viazanej látky. Analýzou získaných dát Scatchardovým vynesiením (alebo pokročilejšími akými sú Benesi-Hildebrand, Encinas-Lissi, dvojitém logaritmickým a pod. (81)) sa získa nielen konštanta K_{af} , ale i počet miest n , do ktorých sa pridávaná látka viaže (resp. jej časť). Meraním fluorescencie roztoku pri rôznych teplotách je možné podľa van Hoffovej rovnice [24] a [25] získať termodynamické parametre interakcie.

$$\ln K_{af} = -\frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{R} \quad [24]$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad [25]$$

R je univerzálna plynová konštanta a G^* je aktivačná Gibbsova energia.



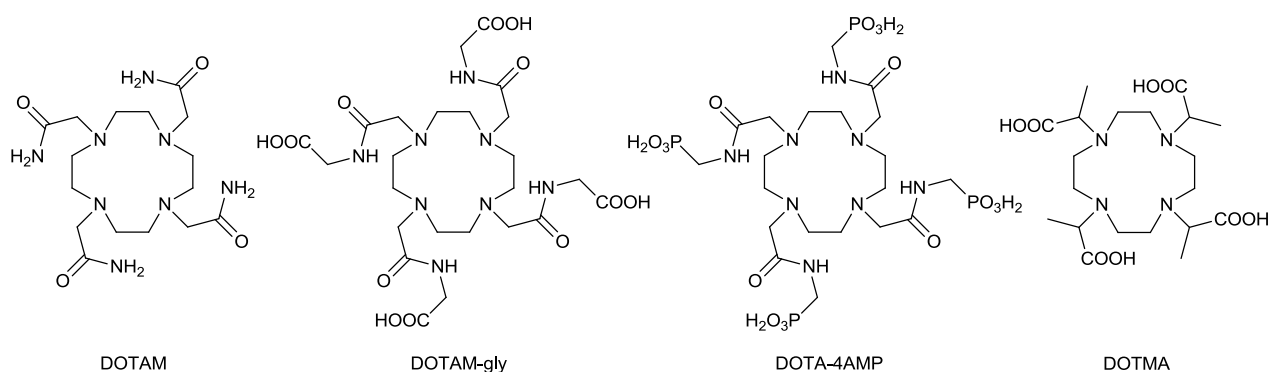
Obrázok 28 – fluorescenčné látky viažuce sa k určitému miestu HSA

1.4.2 pH a teplotné sondy

Publikácií ohľadom pH senzoričných vlastností malých (M_r do cca 1500) T_1 -kontrastných látok je málo (20 výsledkov vyhľadávania v SciFinder[®] dňa 3.4. 2015 po zadaní kľúčových slov: „gadolinium, MRI, pH dependency“). Zmena pozorovanej relaxácie protónov H_2O v závislosti na pH je dosiahnuteľná cez modifikáciu relaxačných parametrov. Najjednoduchší návrh pH senzoričného ligandu T_1 -kontrastnej látky je v zavedení funkčnej skupiny s protonizovateľným donorovým atómom blízkej k centrálnemu kovu. Ak hodnota pK_A koreluje s fyziologickým pH, nastáva čiastočná protonizácia donorového atómu a ten nie je schopný koordinácie (príklad na obrázku 15). Po jeho deprotonizácii je koordinovaný a pri vhodnom návrhu štruktúry ligandu, namiesto molekuly H_2O . Zmena parametru ρ najvýraznejšie vplýva na pozorovanú relaxivitu v magnetickom poli o indukcii pod 0,5 T (Larmorova frekvencia cca 20 MHz).

Alternatívnu k pH senzitiívnej veľkosti parametru ρ je výrazná zmena iného relaxačného parametru s hodnotou pH. Čas τ_M je neľahké zmeniť – musí nastať reverzibilná modifikácia ligandu so zmenou pH, aby koordinovaná voda bola rýchlejšie, resp. pomalšie, vymieňaná za inú. Dosiahnuteľné je to cez elektrostatickú interakciu s nábojom blízkych pH senzitiívnych skupín (NH_2/NH_3^+ , $COOH/COO^-$) alebo priblížením hydrofóbnej časti molekuly ligandu cez, napríklad, vodíkové väzby. Obdobne popísané javy platia pre zmenu τ_R . Ak je komplex ligandu schopný v určitom rozmedzí pH asociovať s inými molekulami, jeho relatívna M_r sa navýši, τ_R predĺži a v oblasti magnetického poľa o indukcii 0,5 až 1,5 T (Larmorova frekvencia cca 20 až 60 MHz) nastáva prudké zvýšenie (až mnohonásobné) relaxivity komplexu (príklad na obrázku 20).

Iný princíp pH senzoričných vlastností využívajú kontrastné látky založené na PARACEST (z angl. PARAMagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer) efekte. Ak pozorovaný PARACEST signál je pH senzitiívny, t.j. rýchlosť výmeny daných vymeniteľných protónov závisí na hodnote pH, v diferencných spektrách (bez a so saturáciou signálu) je zmena intenzity signálu H_2O patrná. Príkladom je $[Yb(\text{dotam-gly})]^{3+}$ (obrázok 29 (82)), ktorého protóny amidických funkčných skupín sú rôzne rýchlo vymeniteľné v závislosti na veľkosti pH. Už i samotný komplex Ln^{3+} s ligandom DOTAM má pH závislý PARACEST signál, no za zmienku stojí značná toxicita spomenutej kontrastnej látky. Nielen že komplexy ligandu DOTAM majú veľmi nízku kinetickú inertnosť a nízku termodynamickú stabilitu, ale majú aj kladný náboj 3+ (možný vstup do vnútra buniek).



Obrázok 29 – ligandy niektorých pH- a T -senzorov založené na ich komplexoch s Ln^{3+} (82)

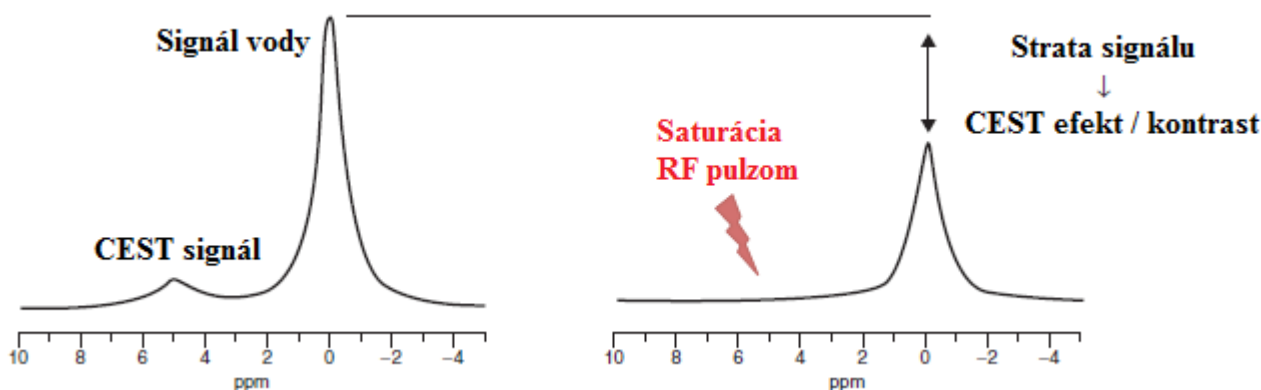
Zaujímavú zmenu relaxačných vlastností so zmenou veľkosti pH má Gd^{3+} komplex ligandu DOTA-4AMP (obrázok 29). Jeho profil závislosti pozorovanej relaxácie $R_{1\rho}$ na hodnote pH má 2 minimá a lokálne maximum u $pH = 6$ (83). Pozoruhodné správanie je vysvetľované rôzne protonizovanými formami komplexu a lokálnymi zmenami štruktúry.

Návrh kontrastnej látky s teplotne závislou relaxivitou o vysokej citlivosti ($0,1\text{ }^{\circ}C$ v rámci rozpätia cca $10\text{ }^{\circ}C$ prítomných *in vivo*) nie je ľahké zostrojiť. Samotná relaxivita $r_{1\rho}$ $T_{1\rho}$ kontrastnej je síce teplotne závislá, no nie tak citlivo. Avšak chemický posun niektorých signálov v 1H -NMR spektrách kontrastných látok je značný so zmenou teploty. Toho je možné využiť v metóde MRS (z angl. Magnetic Resonance Spectroscopy), kde je namiesto signálu H_2O sledované a snímané iné jadro (1H , ale i ^{31}P a i.).

Slubnými T -sondami sú Ln^{3+} komplexy ligandov odvodených od ligandu DOTA, ktoré majú viacero chemicky ekvivalentných protónov. Po vytvorení komplexov s paramagnetikom s veľkou hodnotou magnetického momentu μ_{eff} (Tb^{3+} až Tm^{3+}), tieto signály dosiahnu vysoko odlišných hodnôt Larmorových frekvencií (v 1H -NMR spektre sú oddelené až desiatkami ppm). Príkladom je Yb^{3+} komplex ligandu DOTMA (obrázok 25), ktorého rozdiel chemických posunov axiálnych protónov od pendentných acetátových CH signálov vykazuje lineárny priebeh so zmenou teploty (merané *in vitro* (84)).

1.4.3 PARACEST magnetická tomografia

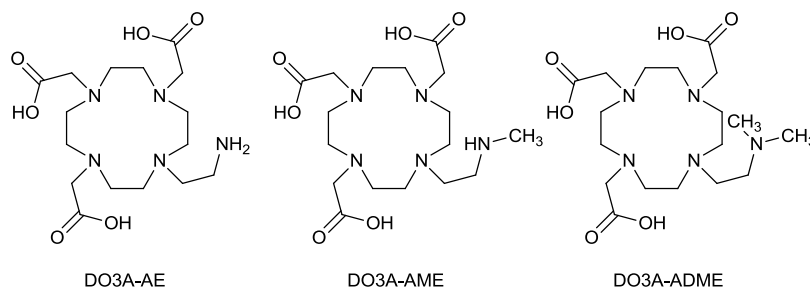
MR snímok vykresľuje rôzne veľké relaxivity protónov molekúl vody objektu. Skrátením T_1 relaxačných časov 1H H_2O sa miesto zvýrazní. Doteraz popisovaným prístupom prebiehalo toto skrátenie relaxačného času cez koordináciu molekuly vody k paramagnetickému atómu, čím sa 1H dostanú do blízkeho okolia paramagnetika. PARACEST kontrastné látky využívajú iného princípu. Cieľenou saturáciou určitého signálu, ktorý je schopný vymieňať vodíkové kationy (NH_x^+ , OH , $CONH_x$ a i.; $x = 1, 2, 3$) s okolitým rozpúšťadlom (H_2O), je tento signál nielen potlačený z „ 1H -NMR spektra“, ale aj signál vody, ktorý si sčasti vymenil protóny so saturovaným signálom. Rozdielom získaných MR spektier (bez cielenej saturácie signálu a s ňou, obrázok 30 (85)) vzniká PARACEST snímok.



Obrázok 30 – princíp magnetickej rezonancie využívajúcej (PARA)CEST efekt (85)

PARACEST kontrastné látky sa oproti T_1 -kontrastným látkam líšia, okrem nutnej prítomnosti skupiny (skupín) s vymeniteľnými protónmi, vo voliteľnosti koordinácie H_2O k centrálnemu atómu. Aby MR snímok zachytil túto popísanú výmenu protónov, rýchlosť výmeny musí byť v danom prostredí (charakterizovaným s T , pH, I ,...) optimálna.

V literatúre sú zmienené najmä PARACEST kontrastné látky odvodené od ligandov s amidovými funkčnými skupinami (deriváty DOTAM na obrázku 29 – PARACEST signál poskytujú CONH skupiny a koordinovaná voda, pretože Ln^{3+} komplex má nízku hodnotu parametru τ_M (82)) alebo s donorovými atómami s vymeniteľnými protónmi (príklady ligandov Ln^{3+} komplexov sú na obrázku 31 (86) – NH_x skupina sa koordinuje k Ln^{3+} ; $x = 1, 2$).



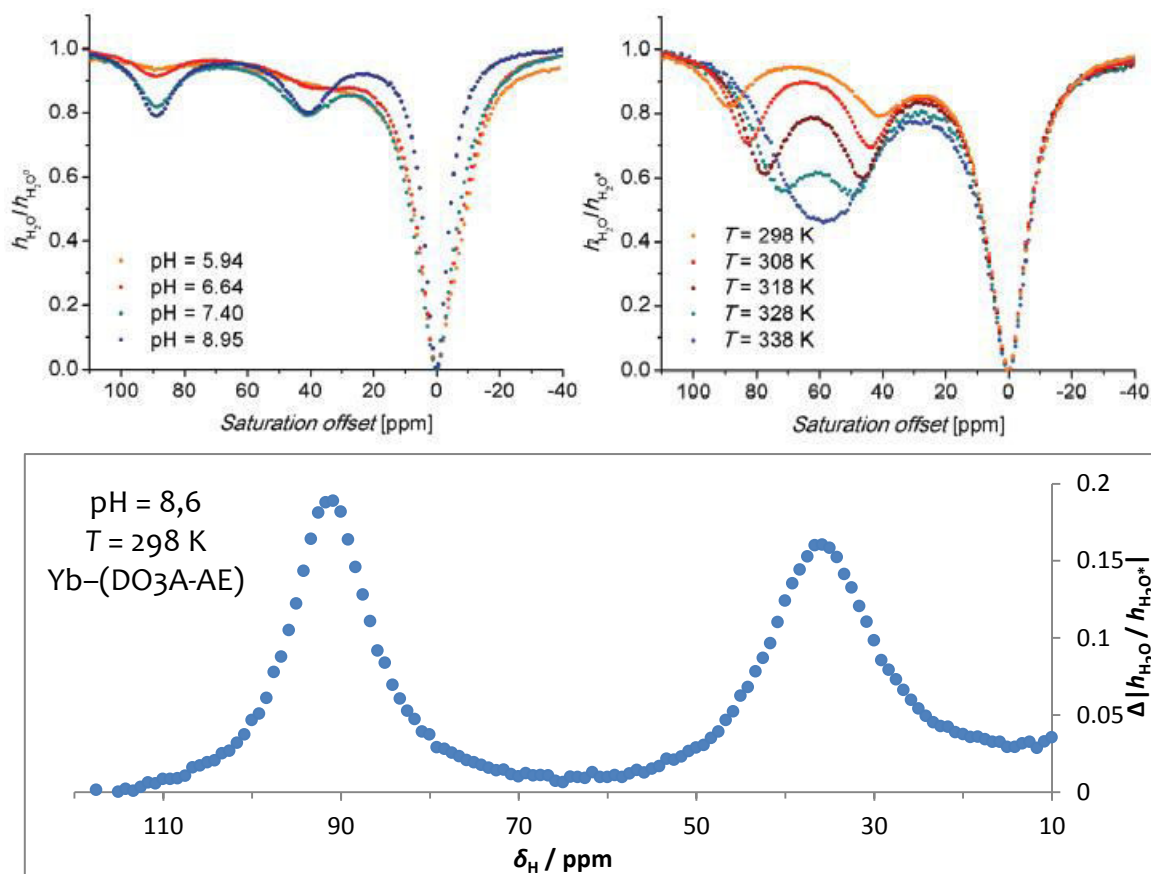
Obrázok 31 – ligandy, ktorých Ln^{3+} komplexy poskytujú signál s PARACEST efektom (86)

Ďalšou podmienkou použiteľnosti PARACEST kontrastnej látky je rozdiel chemických posunov signálu H_2O a signálu vymeniteľných protónov. Pri ich vzájomnej príbuznosti Larmorových frekvencií je pri saturácii odstránený aj pozorovaný signál H_2O . Pre docelenie výraznej zmeny hodnoty chemického posunu určitej funkčnej skupiny je ideálne vytvoriť komplex s najsilnejšími paramagnetikmi (dosahujú maximálnych hodnôt magnetických momentov μ_{eff}). Tými sú lanthanité katióny od Eu^{3+} , poprípade Gd^{3+} (nehodný pre rýchlu relaxáciu a výrazné rozširovanie signálov), po Yb^{3+} (tabuľka 3).

Intenzita signálu s PARACEST efektom je závislá na parametroch akými sú pH a T (zmena rýchlosti výmeny protónov s H_2O), koncentrácia komplexu (ovplyvňuje navyšenie intenzity a pološírky signálu rozpúšťadla), iónová sila (možná interakcia s komplexom) a i .

Vyjadrovanie „efektívnosti“ PARACEST kontrastnej látky prebieha cez tzv. Z-spektrá (obrázok 32), ktoré znázorňujú závislosť poklesu intenzity signálu H_2O na mieste saturácie o určitom chemickom posune δ_H . Pri saturácii signálu s vymeniteľnými protónmi (signál s (PARA)CEST efektom) alebo rozpúšťadla nastáva pokles zo 100% hodnoty intenzity signálu H_2O .

Občas zo Z-spektier nie je patrná zmena, resp. maximum poklesu (dôvodom sú široké signály alebo pozorovaný signál je prekrytý so signálom H_2O), preto je zavedené tzv. MTR vyhodnotenie (z angl. Magnetization Transfer Ratio). Zjednodušene povedané, percentuálny pokles (t.j. napríklad 10%-ný, opačná miera závislosti ako u Z-spektier) je vyjadrený ako rozdiel hodnôt dvoch saturačných miest symetrických od seba voči $\delta(H_2O) = 0$ ppm. To znamená, že premenná „y“ je rovná rozdielu hodnôt poklesu signálu H_2O v mieste saturácie s chemickým posunom (rezonančnou frekvenciou) $+\delta$ a $-\delta$ (alebo laicky: „ľavá strana od signálu H_2O mínus pravá“). Tento rozdiel býva vyjadrovaný v absolútnej hodnote (obrázok 32).



Obrázok 32 – Z-spektrá pH (vľavo hore) a teplotne (vpravo hore) závislých signálov s PARACEST efektom pendantného amínu Yb³⁺ komplexu ligandu DO3A-AE (obrázok 31, prevzaté z (86)) a MTR vyhodnotenie (dolu)

Nespornou výhodou PARACEST kontrastných látok je nezávislosť na intenzite magnetického poľa oproti T₁-kontrastným látkam. Toto nové odvetvie MR zobrazovania je vedené k molekulárnemu zobrazovaniu, kde je vyžadovaná zvýšená presnosť MR.

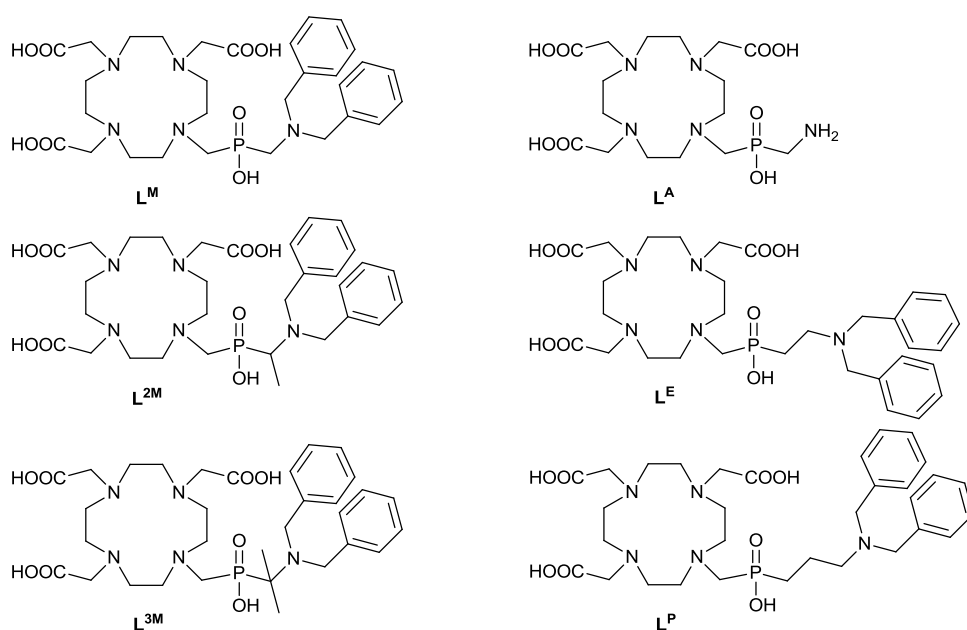
2. Cieľ diplomovej práce

Táto práca nadväzuje na bakalársku prácu, kde bola popísaná príprava ligandu L^M a jeho charakterizácia spolu s prípravou a základnou charakterizáciou komplexov s kľúčovými lanthanoidovými kationmi (Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} a Yb^{3+}). Bolo zistené, že gadolinitý komplex látky L^M , ktorý koordinuje jednu molekulu vody, interaguje so sérovým albumínom (t.j. T_1 -kontrastná látka pre MRA), čím sa zvýši jeho relaxivita, a táto vlastnosť je závislá na pH.

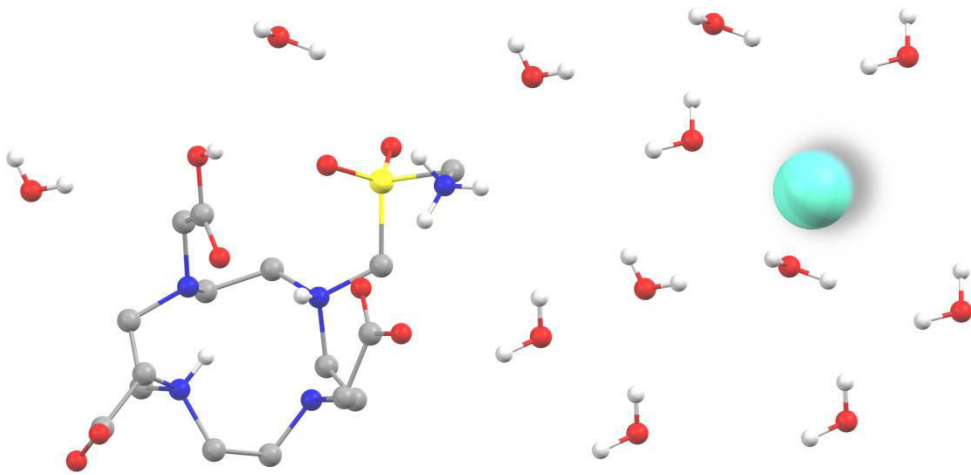
Zároveň bolo dokázané *in vivo*, že kontrastná látka sa nezdržiava v tele tak dlho ako kontrastná látka Ablavar[®], no jej exkrekčný čas je predĺžený (oproti bežným kontrastným látkam, akou je napríklad Dotarem[®]). Zistená hodnota pK_A pendantnej amino skupiny gadolinitého komplexu látky L^M nebola ideálna pre získanie optimálneho správania sa tejto kontrastnej látky *in vivo*. Preto boli navrhnuté modifikácie pendantnej skupiny, ktoré by mali zmeniť len acidobázickú vlastnosť pendantnej amino skupiny.

Podstatou tejto práce bolo:

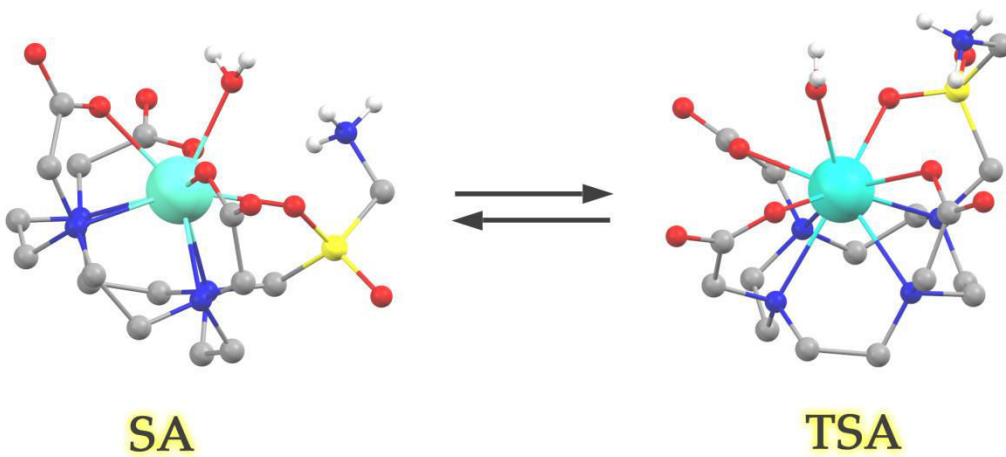
- Úplne zdokumentovať hydrofóbnu interakciu látky $Gd-L^M$ so sérovým albumínom, kvantifikovať relaxačné parametre, dokončiť charakterizácie lanthanoidových komplexov ligandu L^M a pokračovať v experimentoch *in vivo*.
- Pripraviť a charakterizovať ligand s primárnou amino skupinou (látku L^A), ktorý vznikol odstránením benzylových skupín látky L^M . Po vytvorení komplexov látky L^A s lanthanoidmi preskúmať základné charakterizačné vlastnosti a preskúmať jej Gd^{3+} komplex ako potencionálnu T_1 -kontrastnú látku. Následne pripravené Ln^{3+} komplexy ligandu L^A vyhodnotiť ich vhodnosť ako pH-senzory a ako ^{31}P -MRS kontrastné látky a taktiež preskúmať možný PARACEST efekt prítomnej primárnej amino skupiny.
- Navrhnuté ligandy (L^{2M} , L^{3M} , L^E a L^P – obrázok 33) odvodené od látky L^M synteticky pripraviť a charakterizovať, resp. porovnať hodnoty pK_A pendantných amino skupín medzi sebou.



Obrázok 33 – plánované ligandy počas vypracovávania diplomovej práce



3. Experimentálna časť



3.1 Použité chemikálie

Všetky základné **použité chemikálie** boli obdržané od komerčných zdrojov (rozpúšťadlá od firmy Lachema, hydráty chloridov lanthanoidov od Strem Chemicals, fluorescenčné látky od TCI Chemicals, ľudský sérový albumín od LEE Biosolutions a reakčné činidlá majoritne od Sigma Aldrich a Acros) a neboli nijak ďalej purifikované.

Ďalej upravované rozpúšťadlá boli pripravené nasledovne. Bezvodé alkoholy boli pripravené zahrievaním k varu s CaH_2 počas 15 min a následnou destiláciou za normálneho tlaku. Získaná frakcia mala konštantnú teplotu varu (odpovedajúcu publikovanej teplote varu alkoholu) a alkohol bol ďalej stacionárne sušený 4\AA molekulovými sitami. Absorpcia plynného chlorovodíku prebiehala pomocou bublačky z reakcie koncentrovanej kyseliny sírovej a salmiaku. Presné množstvo absorbovanej kyseliny nebolo stanovované, no približne sa pohybovala v rozmedzí 3–5 %. Bezvodý pyridín bol pripravený len stacionárnym sušením s pevným KOH. Bezvodý DCM bol 1 deň stacionárne sušený s P_2O_5 a následne predestilovaný za normálneho tlaku a uchovávaný pod Ar(g) . Čistená voda bola pripravená destiláciou destilovanej vody zo zriedeného roztoku KMnO_4 a filtrovaná cez aktívne uhlie do nádoby, ktorá bola predtým naložená v zriedenom vodnom roztoku NaOH a pred použitím niekoľkonásobne vypláchnutá destilovanou vodou.

Všetky **reakčné zmesi** boli zahrievané pomocou olejového kúpeľa, ktorý bol temperovaný duálnou magnetickou miešačkou a varičom s termostatom, a miešané pomocou teflónového magnetického miešadla prítomného v reakčnej zmesi.

3.2 Použité prístroje

Charakterizačné spektrá látok boli merané pomocou **NMR spektroskopie** na spektrometroch Varian VNMRS 300 (300 MHz), Varian VNMRS 400 (400 MHz) a Bruker Avance (III) 600 (600 MHz) dostupné na PĚF UK a Bruker Avance (III) 500 (500 MHz) dostupnom na Universitá del Piemonte Orientale „Amadeo Avogadro“ (Alessandria, Taliansko).

Chemické posuny boli referencované nasledovne:

- ^1H – pre vodné roztoky $\delta(^t\text{BuOH}) = 1,25$ ppm a pre nevodné $\delta(\text{TMS}) = 0,00$ ppm, externá inzerťová kyveta obsahovala 0,1% D_2O roztok $^t\text{BuOH}$
- ^{13}C – pre vodné roztoky $\delta(^t\text{BuOH}) = 30,3$ ppm a pre nevodné $\delta(\text{TMS}) = 0,0$ ppm, počas merania bol vždy zapnutý širokopásmový decoupling ^1H ($\{^1\text{H}\}$)
- ^{17}O – na referenčnú (samostatnú) kyvetu s H_2O ($\delta = 0,0$ ppm).
- ^{31}P – vždy s externou inzerťovou kyvetou s 85% vodným roztokom H_3PO_4 ($\delta = 0,0$ ppm), spektrá boli merané so zapnutým $\{^1\text{H}\}$, ak merané látky neobsahovali P–H väzbu

Získané spektrá látok boli analyzované v programe MestReNova a hodnoty interakčných konštant J boli z neho odčítané na jedno desatinné miesto (jednotky Hz).

Spektrogramy **hmotnostnej spektrometrie** (MS) boli namerané na prístroji Bruker ESQUIRE 3000 s metódou ionizácie ESI (elektrosprej) a IT (Ion Trap) detektorom, ktorý operoval v pozitívnom i negatívnom móde. Údaje boli získané Mgr. Janom Blahutom, Mgr. Ondrejom Zemkom alebo Bc. Marii Martiniskovou.

Metódou **tenkovrstvej chromatografie** (TLC) boli analyzované roztoky látok pred a po chromatograficky delenej zmesi. Boli použité doštičky TLC Aluminium Oxide 60 F₂₅₄ Neutral od firmy Merck. Detekcia látok bola uskutočnená adsorbciou pár jódu v uzavretej prachovnici. Konkrétne expozičné údaje sú v syntetickej časti uvádzané v zátvorke ako „(typ sorbentu, typ detekcie, retenčný faktor látky R_f)“.

Elementárna analýza (EA) boli vykonaná na Ústave makromolekulárnej chémie AV ČR v Prahe na analyzátoch Perkin Elmer 2400. Obdržané výsledky analýz podielu CHN vo vzorke (rovná priemernej hodnote z 2–3 meraní) boli uvádzané v syntetickej časti ako „nameraná hodnota (teoretická hodnota)“. Údaje boli získané pracovníkmi tejto inštitúcie.

Röntgenoštruktúrna analýza (XRD) monokryštálov prebehla na prístroji ApexII CCD s plošným detektorom a za chladenia na 150 K pomocou tekutého dusíku. Údaje boli získané RNDr. Ivanou Císařovou, CSc. a štruktúry boli spresnené doc. RNDr. Janom Kotkom, Ph.D.

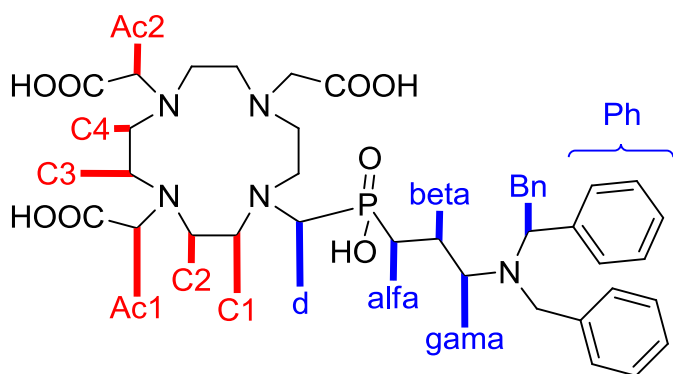
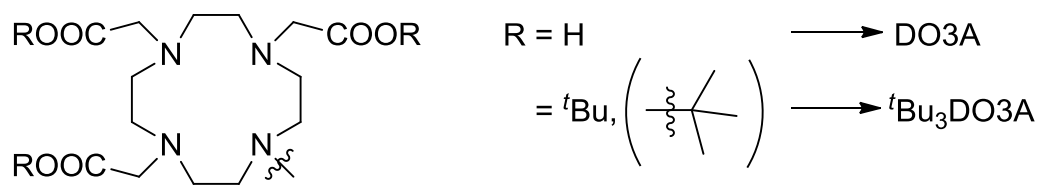
Luminiscenčné a fluorescenčné analýzy prebiehali na stroji Thermo Spectronic AMINCO Bowman[®] Series 2. Meranie prebiehalo pri laboratórnej teplote a boli použité kremenné fluorescenčné kyvety.

Vysokorozlíšenie UV-VIS spektrá boli namerané na spektrofotometre Agilent CARY 4000 UV-VIS. Rozsah merania bol $\lambda = 578\text{--}571\text{ nm}$ a krok $\Delta\lambda = 0,005\text{ nm}$. Teplota roztoku bola zabezpečená vnútorným Peltierovým článkom.

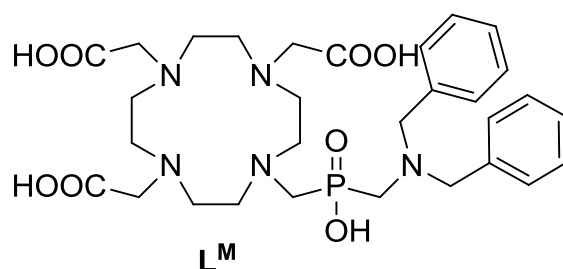
Pri **potenciometrických titráciach** bola použitá kombinovaná sklenená elektróda s argentochloridovou (Radiometer GK2401C), mikrolitrické byrety ($V_{\text{MAX}} = 2,5\text{ ml}$, $\Delta V = 1\ \mu\text{l}$), autotitrátor s faktorizovanými roztokmi (0,20116 M NMe₄OH a 0,02146 M HCl v 0,200 M NMe₄Cl). Meraným roztokom bola udržiavaná konštantná teplota $25,0 \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ termostatom, boli prebublávané prúdom argónu nasýteným parami použitého rozpúšťadla (0,1 M NMe₄Cl v H₂O) a neustále miešané magnetickým miešadlom. „Out-of-cell“ titrácie prebiehali zmiešaním určitého množstva roztoku ligandu, kovu a kyseliny / báze o známych koncentráciách. Po 3 týždňoch státia pri laboratórnej teplote bola učená vlastná titrácia. Údaje boli získané Mgr. Zuzanou Böhmovou.

Relaxometrické merania prebiehali na prístrojoch Stelar SMARtracer[®] a Stelar WP80 (meranie ¹H-NMRD profilov a relaxometrické inhibičné titrácie) pri teplote 10 °C, 25 °C a 37 °C. Oba prístroje sú dostupné na Universitá del Piemonte Orientale „Amadeo Avogadro“ (Alessandria, Taliansko). Presná koncentrácia Gd³⁺ komplexov bola zistená metódou BMS. Fitovanie relaxometrických parametrov bolo učené Prof. Maurom Bottom.

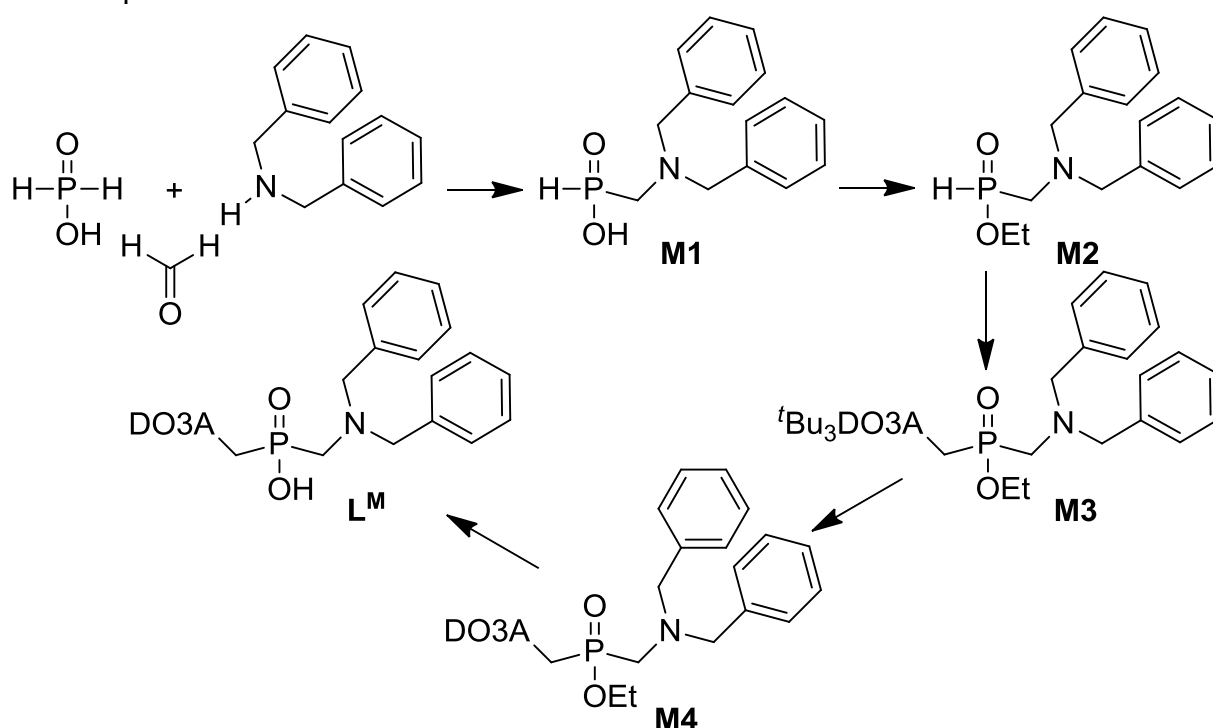
Ďalej sú používané nasledujúce skratky:



3.3 Syntéza látky L^M



Syntéza látky L^M bola popísaná v bakalárskej práci (87). Je veľmi podobná so syntézami látok L^E a L^P, ktorých postupy prípravy sú uvedené ďalej. Reakčné schéma prípravy látky L^M je uvedené pod textom.



Charakterizácia látky L^M:

¹H-NMR (D₂O, pD = 3,45 + 0,41): 3,02 (d, ²J_{HP} = 9,1 Hz, 2H, N-CH₂-P), 2,96–3,06 (bm, 2H, C4), 3,06–3,19 (bm, 4H, C1), 3,31–3,41 (bm, 6H, C2 + C3), 3,46 (d, ²J_{HP} = 7,2 Hz, 2H, P-CH₂-N-Bn), 3,42–3,55 (bm, 2H, C2), 3,49 (s, 2H, HOOC-CH₂-N), 3,59–3,70 (bm, 2H, C4), 3,91 (dd, J = 58,0 Hz, J = 15,8 Hz, 4H, (HOOC-CH₂-N)₂), 4,45 (s, 4H, N-CH₂-Ph), 7,47–7,60 (m, 10H, Ph)

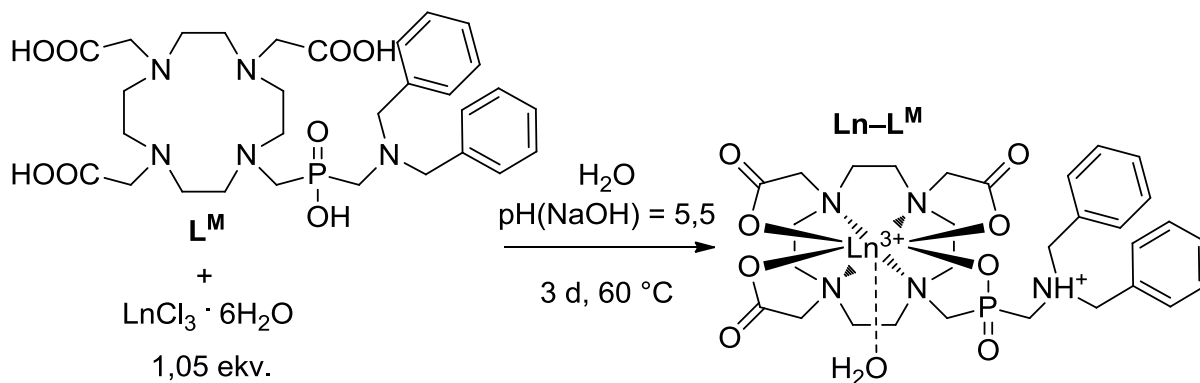
¹³C{¹H}-NMR (D₂O, pD = 3,45 + 0,41): 48,8 (d, J = 3,0 Hz, C4), 50,4 (d, J = 3,5 Hz, C1), 51,1 (C2), 52,2 (C3), 52,4 (d, ¹J_{CP} = 82,3 Hz, P-CH₂-N-Bn), 53,9 (d, ¹J_{CP} = 105,1 Hz, N-CH₂-P), 54,0 (d, J = 1,9 Hz, HOOC-CH₂-N), 57,8 ((HOOC-CH₂-N)₂), 58,6 (N-CH₂-Ph), 129,7 (Ph), 129,9 (Ph), 130,7 (Ph), 132,0 (Ph), 171,1 ((HOOC-CH₂-N)₂), 175,0 (HOOC-CH₂-N)

³¹P{¹H}-NMR (D₂O, pD = 3,45 + 0,41): 25,0 (s)

MS(+): 672,2 (672,3; [M+K]⁺), 694,2 (694,2; [M+Na+K-H]⁺), 710,2 (710,2; [M+2K-H]⁺)

MS(-): 670,0 (670,2; [M-2H+K]⁻), 708,0 (708,2; [M-3H+2K]⁻), 730,0 (730,2; [M-4H+2Na+K]⁻)

EA(L^M · 3H₂O): C 52,09 (52,39), H 7,15 (7,33), N 10,20 (10,18)



V 4ml vialke bolo rozpustených 75 mg (0,11 mmol) látky $\text{L}^{\text{M}} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a 1,05 ekv. $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Ln} = \text{Nd, Eu, Gd, Tb, Dy, Er}$ alebo Yb) v 2 ml H_2O . Hodnota pH roztoku (meraná pH elektródou) bola upravovaná 2,5% vodným roztokom NaOH na hodnotu cca 5,5. Po ustálení pH (30 min) bola reakčná zmes miešaná a zahrievaná na $60\text{ } ^\circ\text{C}$ počas 3 dní.

Následne boli rozpúšťadlá reakcie odstránené na RVO a odparok bol nanosený na kolónu s neutrálnym Al_2O_3 pre chromatografiu v mobilnej fáze $\text{IPAV} = 10 : 1 : 2$ ($V_{\text{M}} = 25$ ml). Kolóna bola premývaná mobilnou fázou pod tlakom z balónika a boli získané 7,5 ml frakcie. Komplex podľa TLC (alumina, I_2 , $R_f = 0,3$) obsahovali frakcie 18.–25. (28.) – roztoky boli zliate a rozpúšťadlá reakcie boli odparené na RVO. Lanthanité komplexy látky L^{M} boli získané vo forme žltastého oleja (60–80 mg).

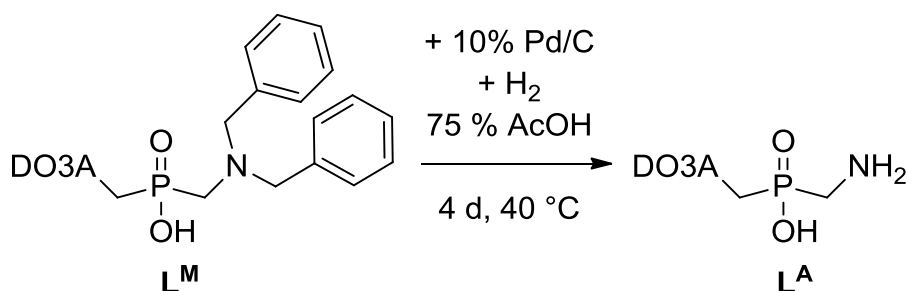
Monokryštály boli pripravené z vodných roztokov látok Eu- , Gd- a Tb-L^{M} prevrstvením s Me_2CO (do vytvorenia zákalu). Postup bol opakovaný do prípravy vhodného monokryštálu. Od látok Dy- , Er- a Yb-L^{M} bol monokryštál získaný pomalou difúziou pár Me_2CO do vodného roztoku látok (hodnota pH bolo rovná cca 10, bola upravená s vodným roztokom NaOH). Charakterizácia látok Ln-L^{M} je uvedená v tabuľke 9.

Tabuľka 9

Charakterizácia komplexov látky L^M (H₂O + externý inert, pH < 4,50)

Ln-L ^M	¹ H-NMR (H _{axial} , SA)	¹ H-NMR (H _{axial} , TSA)	³¹ P-NMR { ¹ H} (SA)	³¹ P-NMR { ¹ H} (TSA)	MS(+)	MS(-)
Nd ³⁺	-15, -18, -19, -21	-1, -3, -7, -9	4,3	3,1	772,7 (773,2; [M+H] ⁺)	770,6 (771,2; [M-H] ⁻)
Eu ³⁺	38, 35, 33, 28	20, 18, 12, 10	67,7	60,1	806,8 (806,2; [M+Na] ⁺)	782,7 (782,2; [M-H] ⁻)
Gd ³⁺	-	-	-	-	833,4 (833,2; [M+2Na-H] ⁺)	787,2 (787,2; [M-H] ⁻)
Tb ³⁺	266, 245, 230, 206	230, 206, 186, 163	408,5	354,2	790,8 (790,2; [M+H] ⁺)	788,7 (788,2; [M-H] ⁻)
Dy ³⁺	385, 373, 309, 294	264, 236, 231, 214	425,7	370,3	837,8 (838,2; [M+2Na-H] ⁺)	791,6 (791,2; [M-H] ⁻)
Er ³⁺	-127, -146, -159, -171	-97, -108, -127, -131	-67,9	-111,8	841,9 (842,2; [M+2Na-H] ⁺)	794,6 (795,2; [M-H] ⁻)
Yb ³⁺	175, 156, 156, 127	105, 100, 65, 63	-82,7	-46,1	804,9 (805,2; [M+H] ⁺)	802,7 (803,2; [M-H] ⁻)

3.4 Syntéza látky L^A



3,00 g (4,36 mmol) látky L^M · 3H₂O boli rozpustené v 250ml zábrusovej guľatej banke v 100 ml približne 75% vodného roztoku AcOH. Roztok bol počas 10 min prebublaný slabým prúdom argónu. K roztoku bolo pridaných 0,30 g Pd/C (10%) a následne bola banka s roztokom evakuovaná. Znižovanie tlaku trvalo približne 2 min. K evakuovanému roztoku bol nasadený balónik naplnený vodíkom a počas 2 dní bola reakčná nádoba miešaná magnetických miešadlom a zahrievaná na 40 °C. Po uplynutí doby bol doplnený do balónika vodík a reakcia pokračovala ďalšie 2 dni pri zahrievaní na 40 °C.

Následne bol roztok prefiltrovaný cez filtračný papier od Pd/C a roztok bol zahustený na RVO. Olej bol nanosený na kolónu s Dowex 50 (100 ml) a kolóna bola premytá približne 250 ml destilovanej vody. Produkt L^A bol eluovaný 5% vodným roztokom NH₃. Rozpúšťadlá eluovaného roztoku boli odparené na RVO. K pevnému odparku bolo pridaných cca 50 ml EtOH a pomocou ultrazvuku bola látka L^A triturovaná (približne 5 min, do vzniku prášku). Produkt bol odsatý na frite hrubosti S3 a sušený prídavkom Et₂O (približne 2 × 20 ml) a vzduchom. Matečné filtráty boli odparené na RVO a obdobne spracované s EtOH a ultrazvukom. Celkovo bolo získaných 2,51 g (95 %) látky L^A · ½NH₃ · 8H₂O vo forme bieleho prášku.

Pre účely potenciometrických titrácií a kryštalizácií bola látka L^A nanosená na kolónu Dowex 1, premytá s H₂O a eluovaná s 3% vodným roztokom HCl. Po odstránení rozpúšťadiel na RVO a triturácii ultrazvukom (5 min) po pridaní EtOH bola látka získaná vo forme bieleho prášku. Monokryštál látky L^A bol pripravený difúziou EtOH do vodného roztoku látky L^A vo forme hydrochloridu.

Charakterizácia látky L^A:

¹H-NMR (D₂O, pD = 5,04 + 0,41): 2,84–2,96 (bm, 2H, C4), 2,92 (d, ²J_{HP} = 12,7 Hz, 2H, N_C-CH₂-P), 2,96–3,01 (bm, 2H, C1), 3,01–3,09 (bm, 2H, C4), 3,18 (d, ²J_{HP} = 10,1 Hz, 2H, P-CH₂-NH₂), 3,29–3,36 (bm, 4H, C1 + C3), 3,30 (s, 2H, HOOC-CH₂-N), 3,36–3,43 (bm, 2H, C2), 3,43–3,51 (bm, 2H, C3), 3,72 (bm, 2H, C2), 3,89 (dd, J = 65,2 Hz, J = 16,0 Hz, 4H, (HOOC-CH₂-N)₂)

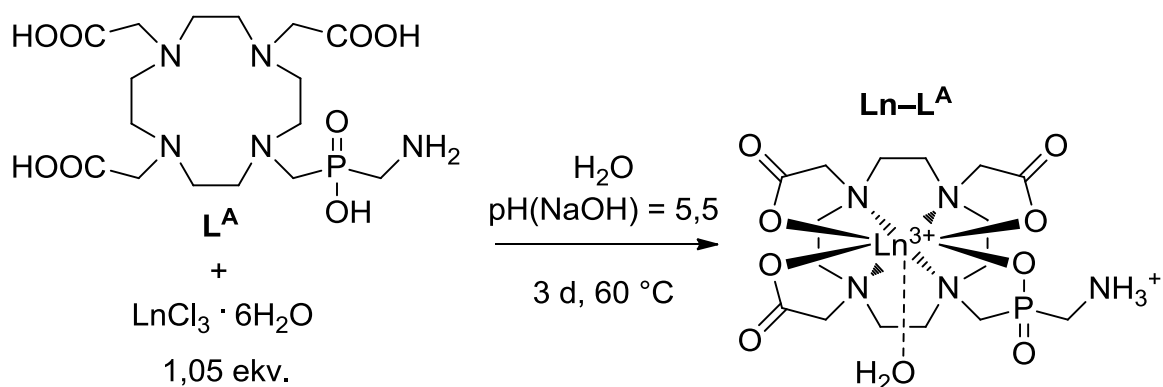
¹³C{¹H}-NMR (D₂O, pD = 5,04 + 0,41): 37,8 (d, ¹J_{CP} = 98,8 Hz, P-CH₂-NH₂), 48,9 (C4), 50,5 (d, ²J_{CP} = 8,4 Hz, C1), 50,9 (C2), 52,5 (C3), 53,0 (d, ¹J_{CP} = 108,2 Hz, N_C-CH₂-P), 56,0 ((HOOC-CH₂-N)₂), 57,8 (HOOC-CH₂-N), 171,2 ((HOOC-CH₂-N)₂), 178,4 (HOOC-CH₂-N)

³¹P{¹H}-NMR (D₂O, pD = 5,04 + 0,41): 28,0 (s)

MS(+): 453,9 (454,2; [M+H]⁺), 457,9 (476,2; [M+Na]⁺), 491,9 (492,2; [M+K]⁺)

MS(-): 451,7 (452,2; [M-H]⁻), 489,7 (490,2; [M-2H+K]⁻)

EA(L^A · ½NH₃ · 8H₂O): C 31,79 (31,69), H 8,23 (8,32), N 12,71 (12,83)



V 4ml vialke bolo rozpustených 70 mg (0,12 mmol) látky $\text{L}^{\text{A}} \cdot \frac{1}{2}\text{NH}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ a 1,05 ekv. $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ alebo $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Ln} = \text{Ce}, \text{Pr}, \text{Nd}, \text{Sm}, \text{Eu}, \text{Gd}, \text{Tb}, \text{Dy}, \text{Ho}, \text{Er}, \text{Tm}, \text{Yb}, \text{Lu}, \text{Y}$ alebo Sc) v 2 ml H_2O . Hodnota pH roztoku (meraná pH elektródou) bolo upravovaná 2,5% vodným roztokom NaOH na hodnotu cca 5,5. Po ustálení hodnoty pH (30 min) bola reakčná zmes miešaná a zahrievaná na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ počas 3 dní.

Následne boli rozpúšťadlá reakcie odstránené na RVO a odparok bol nanosený na kolónu s neutrálnym Al_2O_3 pre chromatografiu v mobilnej fáze $\text{IPAV} = 5 : 1 : 4$ ($V_{\text{M}} = 20 \text{ ml}$). Kolóna bola premývaná mobilnou fázou pod tlakom z balónika a boli získané 5 ml frakcie. Komplex podľa TLC (alumina, I_2 , $R_f = 0,6$) obsahovali frakcie 8.–13. (15.) – roztoky boli zliate a rozpúšťadlá reakcie boli odparené na RVO. Látky Ln-L^{A} boli získané vo forme oleja (žltého až na Pr – zelený a Ho a Er – rúžový) s hmotnosťou 45–60 mg.

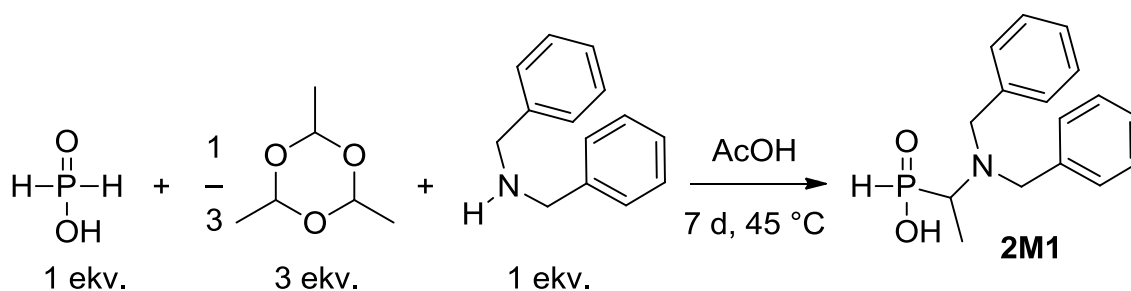
Monokryštály boli pripravené z vodných roztokov látok Ln-L^{A} difúziou pár EtOH (pre $\text{Ln} = \text{La}, \text{Ce}, \text{Pr}, \text{Nd}, \text{Sm}, \text{Eu}, \text{Gd}, \text{Tb}, \text{Dy}, \text{Ho}, \text{Er}$), THF ($\text{Ln} = \text{Tm}, \text{Yb}, \text{Y}, \text{Sc}$) alebo Me_2CO ($\text{Ln} = \text{Lu}$). Charakterizácia látok Ln-L^{A} je uvedená v tabuľke 10.

Tabuľka 10

Charakterizácia komplexov látky L^A (H₂O + externý inzert, pH < 6,00)

Ln-L ^A	¹ H-NMR (H _{axial} , SA)	¹ H-NMR (H _{axial} , TSA)	³¹ P-NMR { ¹ H} (SA)	³¹ P-NMR { ¹ H} (TSA)	MS(+)	MS(-)
La ³⁺	–	–	–	33,1	612,2 (612,1; [M+Na] ⁺)	588,0 (588,1; [M-H] ⁻)
Ce ³⁺	–	-3, -4, -9, -9	–	27,4	613,2 (613,1; [M+Na] ⁺)	589,1 (589,1; [M-H] ⁻)
Pr ³⁺	–	-15, -16, -26, -28	–	25,1	614,2 (614,2; [M+Na] ⁺)	590,0 (590,1; [M-H] ⁻)
Nd ³⁺	-17, -21, -21, -22	-3, -4, -9, -10	6,8	4,6	617,2 (617,1; [M+Na] ⁺)	591,1 (591,1; [M-H] ⁻)
Sm ³⁺	-1, -2, -3, -3	< 0	47,7	41,4	625,2 (625,1; [M+Na] ⁺)	601,1 (601,1; [M-H] ⁻)
Eu ³⁺	39, 37, 36, 30	21, 19, 13, 12	73,3	64,9	626,2 (626,1; [M+Na] ⁺)	602,0 (602,1; [M-H] ⁻)
Gd ³⁺	–	–	–	–	607,0 (607,1; [M+H] ⁺)	609,1 (609,2; [M-H] ⁻)
Tb ³⁺	354, 346, 219, 175	234, 204, 156, 136	424,4	319,2	632,2 (632,1; [M+Na] ⁺)	608,0 (608,1; [M-H] ⁻)
Dy ³⁺	379, 361, 288, 251	241, 226, 194, 182	443,4	342,0	637,2 (637,1; [M+Na] ⁺)	613,0 (613,1; [M-H] ⁻)
Ho ³⁺	-204, -239 -245, -263	-116, -127, -165, -191	237,4	182,1	638,2 (638,1; [M+Na] ⁺)	614,1 (614,1; [M-H] ⁻)
Er ³⁺	-98, -102, -141, -155	-77, -93, -121, -125	-64,3	-92,4	641,2 (641,1; [M+Na] ⁺)	617,0 (617,1; [M-H] ⁻)
Tm ³⁺	-344, -362, -373, -391	-245, -249, -284, -289	-245,0	-332,0	642,2 (642,1; [M+Na] ⁺)	618,1 (618,1; [M-H] ⁻)
Yb ³⁺	166, 153, 153, 125	110, 97, 71, 62	-75,2	-39,5	645,2 (645,1; [M+Na] ⁺)	623,1 (623,1; [M-H] ⁻)
Lu ³⁺	–	–	37,4	34,8	648,2 (648,1; [M+Na] ⁺)	624,1 (624,1; [M-H] ⁻)
Sc ³⁺	–	–	36,8	33,3	518,3 (518,1; [M+Na] ⁺)	494,1 (494,1; [M-H] ⁻)
Y ³⁺	–	–	37,0	35,1	561,9 (562,1; [M+Na] ⁺)	537,9 (538,1; [M-H] ⁻)

3.5 Syntéza látky L^{2M}



V 250ml guľatej banke bolo zmiešaných 10,04 g (0,051 mol) dibenzylamínu, 20,17 g (0,153 mol; 3 ekv.) paraldehydu, 6,73 g (0,051 mol; 1 ekv.) 50% vodného roztoku kyseliny fosfovej a približne 100 ml AcOH. Roztok bol miešaný magnetickým miešadlom a zahrievaný na 40 °C počas 1 dňa. Konverzia podľa ³¹P-NMR bola len 7%, preto teplota olejového kúpeľa bola nastavená na 45 °C a po 3 dňoch konverzia vzrástla na 50 % (bez prítomnosti fosfónovej kyseliny podľa ³¹P-NMR). Po ďalších 3 dňoch pri zahrievaní na 45 °C sa konverzia zmenila na 80 % a na ďalší deň už ostala nezmenená. Následne bolo k reakčnej zmesi pridaných 1,0 ml (cca 0,1 ekv.) dibenzylamínu a 2,6 ml (cca 0,4 ekv.) paraldehydu. Po 1 dni zahrievania na 45 °C sa konverzia zvýšila na 87 % (vzhľadom k H₃PO₂) a počas ďalších 2 dňoch sa už nezmenila.

Reakčná zmes bola zahustená na RVO a olej bol nanosený na kolónu s Dowex 50 (200 ml). Kolóna bola premytá s cca 500 ml destilovanej vody, 500 ml EtOH a znova s 500 ml destilovanej vody. Produkt bol eluovaný so zmesou konc. NH₃ : EtOH = 1 : 5. Eluovaný roztok bol zahustený na RVO a nanosený na kolónu s Dowex 1 (200 ml). Kolóna bola premytá s vodným roztokom EtOH (cca 50% vodným roztokom, 500 ml) a látka **2M1** bola eluovaná s 20% vodným roztokom AcOH. Po odparení na RVO bol produkt získaný vo forme žltého oleja, ktorý časom (rádovo týždne) stuhol. Bolo získaných 13,80 g žltobielej pevnej látky (2M1 · 2,5H₂O, 85 %).

Monokryštál látky **2M1** bol pripravený jej rozpustením vo vodnom roztoku adamantylamín hydrochloridu (cca 1 ekv. k látke **2M1**) za tepla. Po pomalom ochladení bol získaný vhodný monokryštál na röntgenoštruktúrálnu analýzu.

Charakterizácia látky **2M1**:

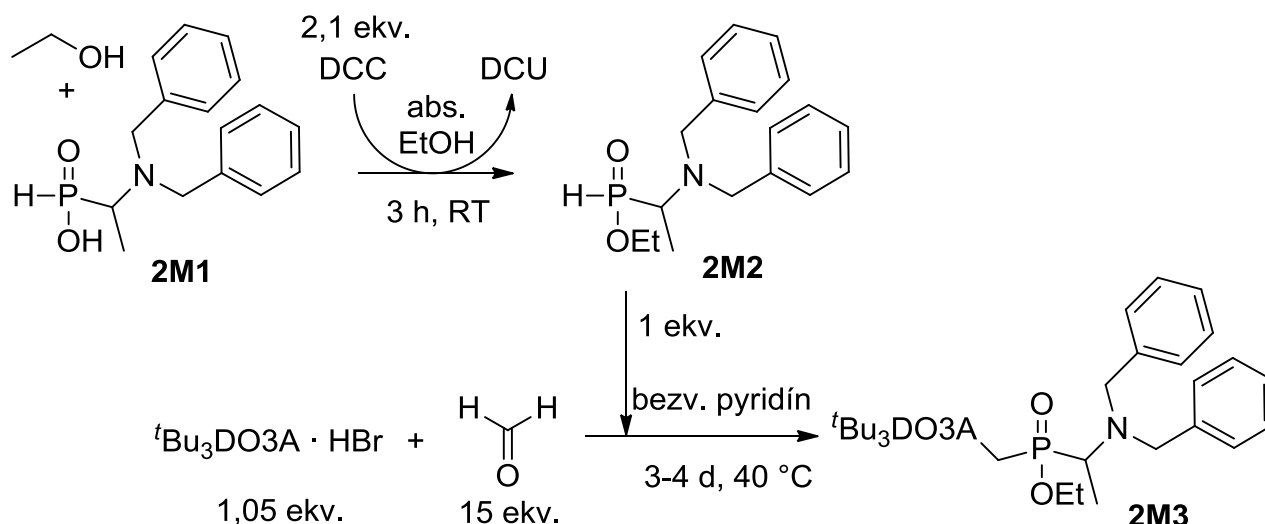
¹H-NMR (D₂O, pD = 1,09 + 0,41): 1,59 (dd, ³J_{HP} = 15,9 Hz, ³J_{HH} = 7,3 Hz, 3H, P-CH-CH₃), 3,37 (dq, ²J_{HP} = 12,9 Hz, ³J_{HH} = 7,4 Hz, ³J_{HH} = 1,5 Hz, 1H, P-CH-CH₃), 4,48 (s, 4H, N-CH₂-Ph), 7,03 (d, ¹J_{HP} = 514,2 Hz, 1H, H-P-CH), 7,44–7,55 (m, 10H, Ph)

¹³C{¹H}-NMR (D₂O, pD = 1,09 + 0,41): 8,2 (P-CH-CH₃), 56,5 (N-CH₂-Ph), 56,7 (d, ¹J_{CP} = 87,0 Hz, P-CH-CH₃), 129,8 (Ph), 130,0 (Ph), 130,9 (Ph), 131,7 (Ph)

³¹P-NMR (D₂O, pD = 1,09 + 0,41): 18,7 (dq, ¹J_{PH} = 514,2 Hz, ³J_{PH} = 15,9 Hz, ²J_{PH} = 12,9 Hz)

MS(-): 287,7 (288,1; [M-H]⁻)

EA(2M1 · 2,5H₂O): C 57,49 (57,48), H 7,90 (7,54), N 4,49 (4,19)



V 100ml guľatej banke bolo rozpustených 1,55 g (5,4 mmol) látky **2M1** a 2,25 g (11 mmol; 2,1 ekv.) DCC v cca 25 ml abs. EtOH. Po 3 hodinách miešanie pri RT bola konverzia podľa ^{31}P -NMR kvantitatívna. Roztok bol odparený na RVO pri teplote vodného kúpeľa 50 °C a odparok bol dispergovaný v cca 25 ml bezvodého pyridínu. Heterogénny roztok bol prefiltrovaný od vyzrážanej DCU cez 0,2 μm PTFE filter priamo do reakčnej zmesi obsahujúcej 3,70 g (6,2 mmol; 1,15 ekv.) látky $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ a 2,45 g (82 mmol; 15 ekv.) paraformaldehydu v 100ml guľatej banke. Reakčná zmes bola doliata bezvodým pyridínom až takmer po zábrus. Reakcia bola miešaná magnetickým miešadlom a prebiehala pri teplote olejového kúpeľa 40 °C počas 5 dní (podľa ^{31}P -NMR, kvantitatívna konverzia).

Následne bol roztok prefiltrovaný od nadbytočného paraformaldehydu cez fritu hrubosti S4 a filtrát bol zahustený na RVO do formy oleja, ktorý bol rozpustený v Et_2O (100 ml). Po 1 dni pri RT bol roztok prefiltrovaný od vylúčenej nezreagovej látky $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$. Filtrát obsahujúci látku **2M3** bol zahustený na RVO do formy hnedého oleja (nezvážený medziprodukt, podľa ^{31}P -NMR kvantitatívna konverzia).

Charakterizácia látky **2M2**:

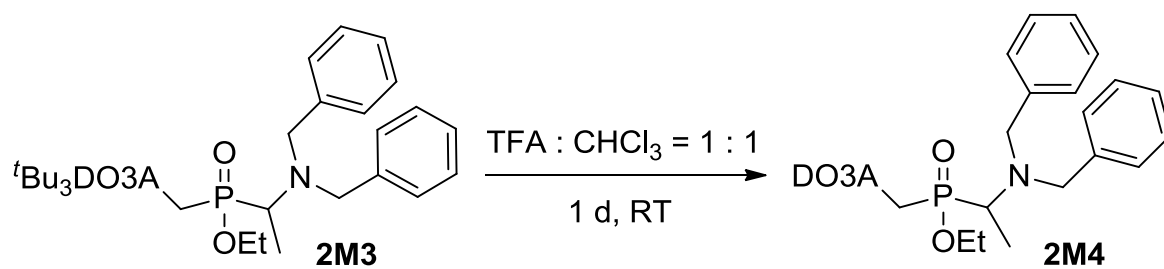
^{31}P -NMR (abs. EtOH): 39,1 (dm, $^1J_{\text{PH}} = 529,0$ Hz, 66 %), 43,5 (dm, $^1J_{\text{PH}} = 519,9$ Hz, 34 %)

MS(+): 338,9 (340,1; $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

Charakterizácia látky **2M3**:

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (bezdový pyridín): 50,7 (60 %), 52,6 (40 %)

MS(+): 844,2 (844,5; $[\text{M}+\text{H}]^+$), 866,5 (866,5; $[\text{M}+\text{Na}]^+$)



Olej obsahujúci látku **2M3** bol rozpustený v 50 ml zmesi TFA a CHCl_3 v pomere 1 : 1 a roztok bol miešaný s prítomnou sušiacou trubičkou s CaCl_2 cez noc pri RT. Následne boli rozpúšťadlá roztoku odparené pomocou RVO. K odparku bolo pridaných cca 10 ml TOL a znova boli rozpúšťadlá odparené. Bol získaný čierny olej obsahujúci látku **2M4** (nevážený medziprodukt, podľa ^{31}P -NMR kvantitatívna konverzia).

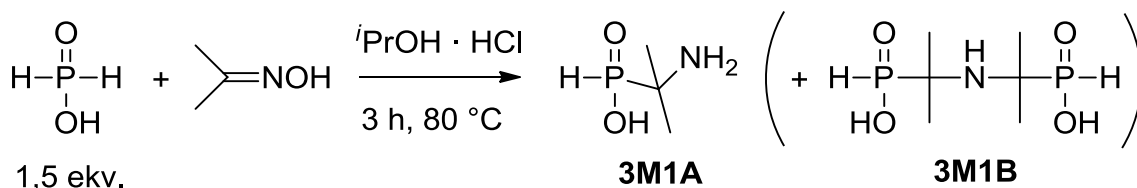
Charakterizácia látky **2M4**:

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (TFA : $\text{CHCl}_3 = 1 : 1$): 45,2 (56 %), 48,0 (44 %)

MS(+): 676,1 (676,3; $[\text{M}+\text{H}]^+$), 698,3 (698,3; $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

MS(-): 674,4 (674,3; $[\text{M}-\text{H}]^-$)

3.6 Syntéza látky L^{3M}



V 250ml guľatej banke bolo rozpustených 2,75 g (38 mmol) acetoxímu a 5,00 g (76 mmol, 2 ekv.) kryštalickej kyseliny fosforenej v 50 ml bezvodého isopropanolu s absorbovaným HCl (cca 2–5 % roztok). Reakcia bola miešaná a zahrievaná k varu (80 °C) pod spätným chladičom so sušiacou trubičkou s CaCl₂ počas 3 hodín.

Rozpúšťadlá reakcie boli odparené na RVO (teplota vodného kúpeľa bola 50 °C) a odparok bol nanesený na kolónu s Dowex 50 (150 ml). Kolóna bola premývaná s H₂O. Prvá kyslá frakcia (tekla s čelom) obsahovala kyseliny fosforu, druhá bola neutrálna (podľa pH papierika) a tretia s hodnotou pH pod 5 obsahovala produkt **3M1A** (eluované s H₂O po objeme cca 300 ml). Rozpúšťadlá poslednej frakcie boli odstránené na RVO a získaný pevný odparok bol triturovaný s 30 ml EtOH v ultrazvuku (5 min). Po odfiltrovaní pevného podielu, sušení dispergovaním v 25 ml Et₂O, jeho odsatím a presatím vzduchu (5 min) bolo získaných 3,45 g bielej kryštalickej látky. Podľa ¹H- a ³¹P-NMR sa pravdepodobne jednalo o zmes látky **3M1A** a **3M1B** v pomere cca 1 : 2. Celkový výtťažok reakcie bol 30 %.

Charakterizácia látky **3M1A**:

¹H-NMR (D₂O, pD = 2,73 + 0,41): 1,41 (d, ³J_{HP} = 13,6 Hz, 6H, P–C–CH₃), 6,95 (d, ¹J_{HP} = 543,0 Hz, 1H, H–P–C)

¹³C{¹H}-NMR (D₂O, pD = 2,73 + 0,41): 16,2 (P–C–CH₃), 61,0 (d, ¹J_{CP} = 94,3 Hz, P–C–CH₃)

³¹P-NMR (D₂O, pD = 2,73 + 0,41): 22,4 (dsep, ¹J_{PH} = 543,0 Hz, ³J_{PH} = 13,9 Hz)

MS(+): 123,6 (123,1; [M+H]⁺)

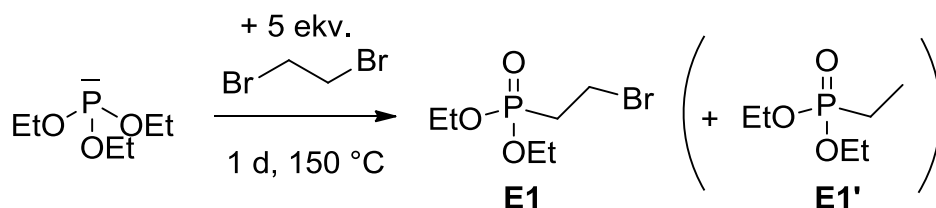
Charakterizácia látky **3M1B**:

¹H-NMR (D₂O, pD = 2,73 + 0,41): 1,41 (d, ³J_{HP} = 13,6 Hz, 6H, P–C–CH₃), 6,86 (d, ¹J_{HP} = 526,1 Hz, 1H, H–P–C)

¹³C{¹H}-NMR (D₂O, pD = 2,73 + 0,41): 19,7 (P–C–CH₃), 52,7(d, ¹J_{CP} = 97,1 Hz, P–C–CH₃)

³¹P-NMR (D₂O, pD = 2,73 + 0,41): 25,4 (dsep, ¹J_{PH} = 526,2 Hz, ³J_{PH} = 13,7 Hz)

3.7 Syntéza látky L^E



Postup bol zreprodukováný podľa literatúry (88).

Do 250ml guľatej banky s refluxujúcimi (180 °C) 18,0 ml triethylfosfitu (0,10 mol) bolo pridaných injekciou cez spätných chladič 43,0 ml dibromoméšanu (0,50 mol; 5 ekv.). Teplota olejového kúpeľa bola znížená na 150 °C a zmes bola silno refluxovaná a miešaná magnetickým miešadlom počas 1 dňa.

Následne bol spätných chladič vymenený za zostupný a reakčná zmes bola destilovaná za zníženého tlaku (cca 15 mm Hg). Frakcie s teplotou varu (znížený tlak) do 80 °C obsahovali nezreagované reaktanty a boli týmto regenerované. Zachytené frakcie s teplotou varu (znížený tlak) nad 80 °C obsahovali látku **E1** (75 %) a bočné produkty ako triethylfosfát (3 %) a látku **E1'** (22 %). Celková konverzia reakcie bola 78 % a bolo získaných 17,47 g čírej pohyblivej kvapaliny, čo predstavuje výtťažok látky **E1** rovný 68 %.

Charakterizácia látky **E1**:

¹H-NMR (CDCl₃): 1,34 (t, ³J_{HH} = 7,1 Hz, 6H, O-CH₂-CH₃), 2,32-2,50 (m, 2H, P-CH₂-CH₂-Br), 3,48-3,59 (m, 2H, P-CH₂-CH₂-Br), 4,04-4,21 (m, 4H, O-CH₂-CH₃)

¹³C{¹H}-NMR (CDCl₃): 16,5 (O-CH₂-CH₃), 23,8 (P-CH₂-CH₂-Br), 30,8 (d, ¹J_{CP} = 134,6 Hz, P-CH₂-CH₂-Br), 62,1 (d, ²J_{CP} = 6,1 Hz, O-CH₂-CH₃)

³¹P{¹H}-NMR (CDCl₃): 26,3 (s)

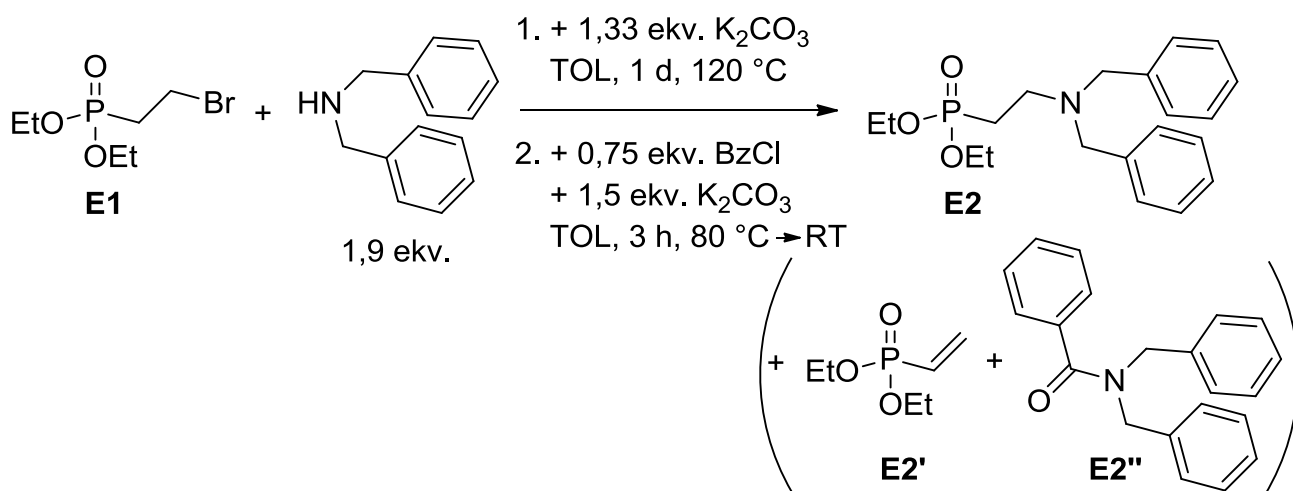
MS(+): 267,0 + 269,2 (267,0 + 269,0; [M+Na]⁺)

Charakterizácia látky **E1'**:

¹H-NMR (CDCl₃): 1,16 (dt, ³J_{HP} = 19,9 Hz, ³J_{HH} = 7,7 Hz, 3H, P-CH₂-CH₃), 1,33 (t, ³J_{HH} = 7,1 Hz, 6H, O-CH₂-CH₃), 1,74 (dq, ²J_{HP} = 18,0 Hz, ³J_{HH} = 7,7 Hz, 2H, P-CH₂-CH₃), 4,04-4,21 (m, 4H, O-CH₂-CH₃)

¹³C{¹H}-NMR (CDCl₃): 6,6 (d, ²J_{CP} = 6,3 Hz, P-CH₂-CH₃) 16,4 (O-CH₂-CH₃), 18,9 (d, ¹J_{CP} = 142,7 Hz, P-CH₂-CH₃), 61,4 (d, ²J_{CP} = 5,8 Hz, O-CH₂-CH₃)

³¹P{¹H}-NMR (CDCl₃): 34,3 (s)



V 100ml slzovitej banke bolo zmiešaných 6,00 g (20 mmol látky **E1**) oleja obsahujúcu látku **E1** (z predchádzajúcej syntézy), 7,50 g dibenzylamínu (38 mmol, 1,9 ekv. k látke **E1** v pridanom čírom oleji), 3,70 g uhličitanu draselného (27 mmol; 1,33 ekv.) a 50 ml TOL. Heterogénna zmes bola miešaná a refluxovaná (s prítomnou sušiacou trubičkou naplnenou s CaCl_2) pri 120 °C počas 1 dňa (konverzia podľa ^{31}P -NMR 71 %). Následne bolo k zmesi pridané 4,15 g K_2CO_3 (30 mmol) a po ochladení reakčnej zmesi na cca 80 °C 3,4 ml (29 mmol, 0,75 ekv. k použitému dibenzylamínu) benzoyl chloridu.

Po pomalom ochladení na RT počas 30 min bola zmes prefiltrovaná cez fritu hrubosti S3. Filtrát bol zahustený na RVO. K oleju bolo pridaných cca 25 ml bezvodého $\text{MeOH} \cdot \text{HCl}$ a rozpušťačlá boli odparené na RVO. K odparku bolo pridaných 50 ml Et_2O a roztok bol znova zahustený na RVO. Po pridaných ďalších 50 ml Et_2O bola vylúčená zrazenina triturovaná pomocou ultrazvuku (5 min). Produkt **E2** bol odsatý na frite hrubosti S3 vo forme bieleho prášku. Bolo získaných 3,40 g látky **E2** · HCl (43 %).

Monokryštál látky **E2** bol získaných difúziou pár Et_2O do chloroformového roztoku látky **E2** do jedného dňa.

Charakterizácia látky **E2**:

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): 1,28 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,9$ Hz, 6H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 2,42–2,51 (m, 2H, P- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3,35–3,40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 4,05–4,13 (m, 4H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4,48 (s, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7,48–7,68 (m, 10H, Ph)

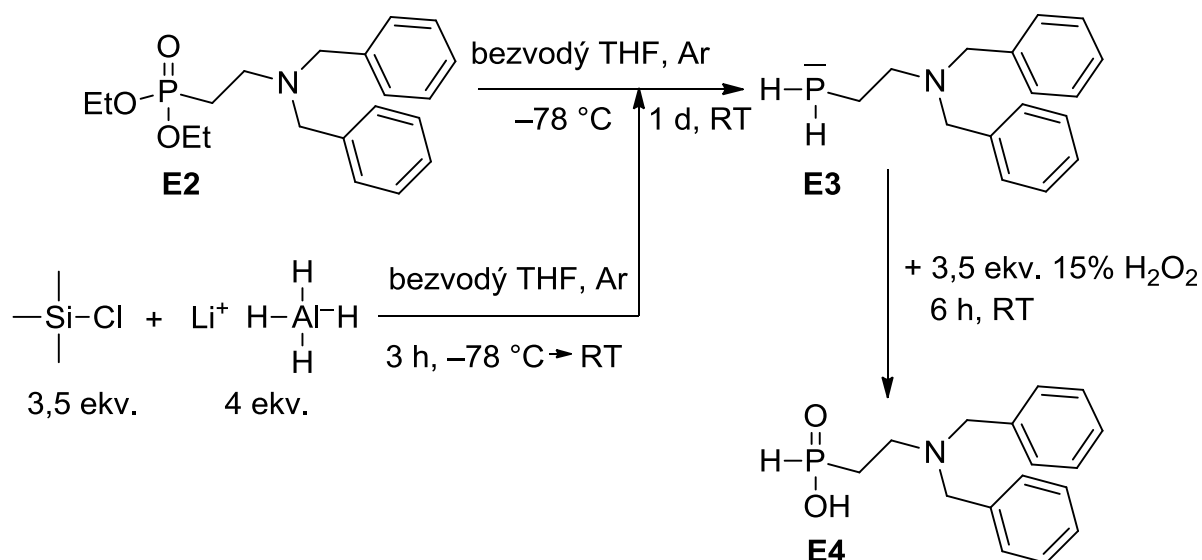
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1,14 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,1$ Hz, 6H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 2,21–2,63 (m, 2H, P- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3,07–3,19 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 3,94 (dq, $^3J_{\text{HP}} = 7,9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7,1$ Hz, 4H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4,17 (ddd, $J = 46,2$ Hz, $J = 13,3$ Hz, $J = 4,8$ Hz, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7,34–7,69 (m, 10H, Ph)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CD_3OD): 15,8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5,4$ Hz, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 20,4 (d, $^1J_{\text{CP}} = 140,4$ Hz, P- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 46,6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 57,4 (N- $\text{CH}_2\text{-P}$), 63,3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6,0$ Hz, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 129,6 (Ph), 129,8 (Ph), 130,6 (Ph), 131,5 (Ph)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3): 25,1 (s)

MS(+): 362,4 (362,2; $[\text{M}+\text{H}]^+$)

EA(**E2** · HCl): C 60,11 (60,37), H 7,90 (7,35), N 3,54 (3,52)



3,30 g (8,3 mmol) látky **E2** vo forme hydrochloridu bolo 4× extrahovaných z 50 ml 5% vodného roztoku NaOH do 20 ml Et_2O . Po vysušení organickej fáze s Na_2SO_4 , filtrácii sušidla a odparení rozpúšťadiel na RVO bolo získaných 2,98 g (8,25 mmol) žltastého oleja látky **E2**.

Medzitým bola pripravená aparátúra podľa obrázku 34 a bola prečísaná argónom. V trojhrdlej banke bolo prítomných jemne nadržvených tabliet 1,25 g (33 mmol, 4 ekv. k látke **E2**) LAH a po ochladení banky zmesou $\text{CO}_2(\text{s})$ a EtOH bolo pridaných cca 50 ml bezvodého THF. Po čiastočnom rozpustení LAH bola k zmesi za stáleho chladenia injekciou prikvapkaných 3,8 ml (30 mmol, 3,5 ekv. k látke **E2**) trimethylsilylchloridu. Následne bola reakčná oparátúra pozvoľne ohriata na RT a po 3 hodinách bola znova ochladená na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (so zmesou suchého ľadu a ethanolu). Ku vychladenej reakčnej zmesi bol injekciou, kvapkami (pomaly) pridaný roztok látky **E2** v 20 ml bezvodého THF. Po pridaní bolo chladenie odstránené a reakčná zmes sa miešala pri RT počas 1 dňa. Následne bola zmes znova ochladená ľadovým kúpeľom a injekciou pomaly boli pridané kvapky destilovanej vody (prvých cca 20 kvapiek veľmi pomaly, následných cca 10 ml pozvoľnejšie) nasledované cca 15% vodným roztokom peroxidu vodíku pripraveného z 3,0 g (30 mmol, 3,5 ekv.) 30% vodného roztoku.

Po 6 hodinách miešania pri RT bol prúd argónu pozastavený a reakčná zmes bola prenesená do centrifúgačných skúmaviek. Odstredenie prebiehalo pri 4000 rpm počas 10 min. Číry vodný roztok bol nanosený na kolónu s Dowex 50 (100 ml) a pevný podiel bol rozpustený v 17% vodnom roztoku HCl. Rozpúšťadlá chlorovodíkového roztoku boli odparené na RVO, odparok bol rozpustený v 25 ml destilovanej vody a nanosený na tú istú kolónu s Dowex 50. Kolóna bola premytá cca 300 ml H_2O a produkt bol eluovaný s 10% vodným roztokom pyridínu. Po odparení rozpúšťadiel na RVO bolo získaných 2,11 g (7,3 mmol) látky **E4** vo forme žltého oleja. Výtťažok reakcie bol 88 %.

Vhodný monokryštál látky **E4** na röntgenoštruktúrálnu analýzu bol získaný pomalým odparom vodného roztoku látky **E4** a hydrochloridu adamantylamínu (cca 2–3 ekv.).

Charakterizácia látky **E4**:

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , $\text{pD} = 2,39 + 0,41$): 2,04 (dt, $^2J_{\text{HP}} = 16,5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 2H, P-CH₂-CH₂), 3,37 (dt, $^2J_{\text{HP}} = 9,1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-N), 4,37 (s, 4H, N-CH₂-Ph), 6,91 (d, $^1J_{\text{HP}} = 526,7$ Hz, 1H, H-P-CH₂), 7,41–7,56 (m, 10H, Ph)

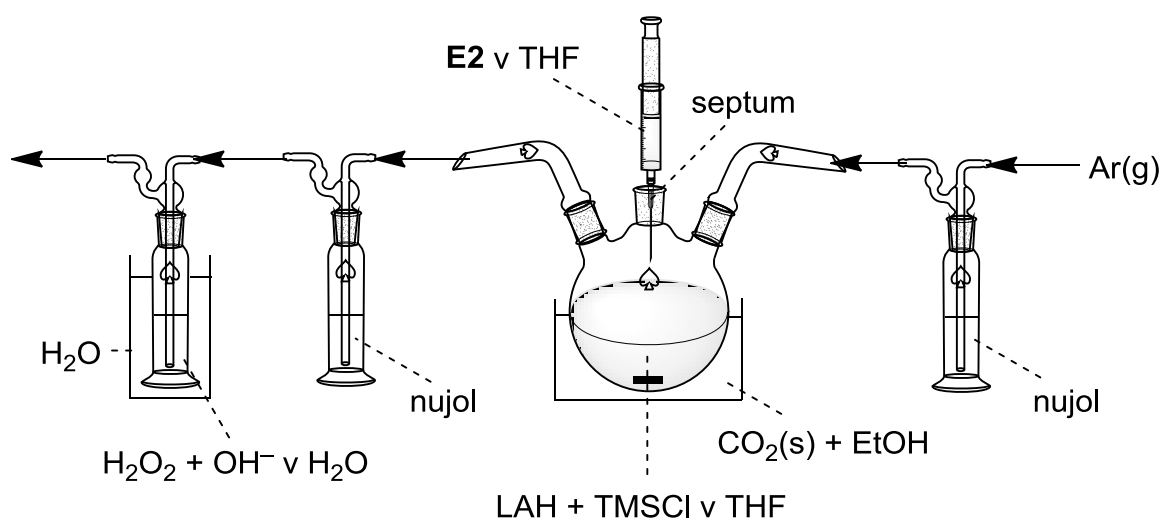
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (D_2O , $\text{pD} = 2,39 + 0,41$): 26,5 (d, $^1J_{\text{CP}} = 83$ Hz, P-CH₂-CH₂), 47,6 (CH₂-CH₂-N), 57,5 (N-CH₂-Ph), 129,7 (Ph), 130,1 (Ph), 130,9 (Ph), 131,6 (Ph)

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , $\text{pD} = 2,39 + 0,41$): 21,7 (dm, $^1J_{\text{PH}} = 527,0$ Hz)

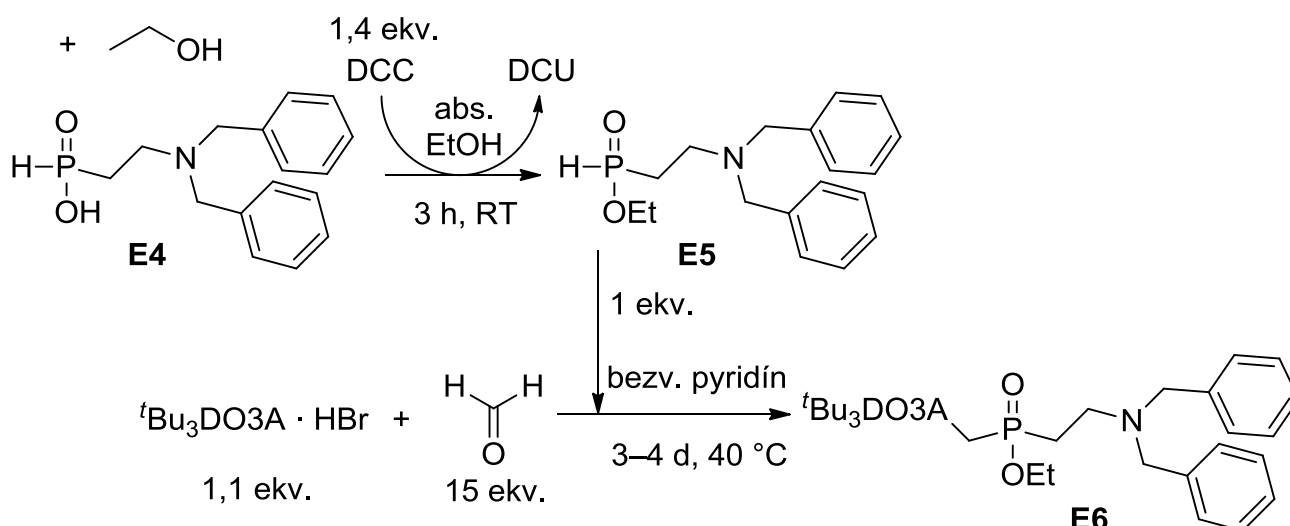
$^{31}\text{P-NMR}$ (abs. EtOH): 21,6 (dm, $^1J_{\text{PH}} = 511,8$ Hz)

MS(+): 290,3 (290,1; $[\text{M}+\text{H}]^+$)

MS(-): 288,1 (288,1; $[\text{M}-\text{H}]^-$)



Obrázok 34 – schéma aparatúry použitej pri redukcii látky **E2** a následnej oxidácii látky **E3**



3,00 g (10 mmol) oleja obsahujúcu látku **E4** a 3,00 g (14 mmol, 1,4 ekv.) DCC boli rozpustené v 50 ml abs. EtOH v 100ml guľatej banke. Zmes sa miešala 3 hodiny pri RT. Následne boli rozpúšťadlá reakcie odparené na RVO pri teplote vodného kúpeľa 50 °C a odparok bol čiastočne rozpustený pridaním 25 ml bezvodého pyridínu. Heterogénny roztok bol prefiltrovaný cez 0,2 µm PTFE filter od vylúčenej DCU priamo do 250ml guľatej banky so zmesou 6,80 g (11 mmol, 1,1 ekv.) látky $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ a 6,3 g (156 mmol, 15 ekv.) paraformaldehydu. Banka bola naplnená bezvodým pyridínom až takmer po zábrus. Reakcia bola miešaná a prebiehala pri zahrievaní na 40 °C počas 3 dní.

Následne bola reakčná zmes prefiltrovaná od paraformaldehydu na frite hrubosti S4 a filtrát bol zahustený na RVO. K odparku bolo pridaných 100 ml Et_2O a po 1 dni stánia pri RT bola odfiltrovaná na frite hrubosti S3 nezreagovaná látka $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ vo forme bieleho prášku. Filtrát bol potom zbavený rozpúšťadiel na RVO. Hnedý olej obsahujúci látku **E6** bol použitý do ďalšej reakcie (nevážený medziprodukt, podľa ^{31}P -NMR kvantitatívny výťažok).

Charakterizácia látky **E5**:

^{31}P -NMR (abs. EtOH): 40,7 (dm, $^2J_{\text{PH}} = 550,2$ Hz)

MS(+): 318,3 (318,2; $[\text{M}+\text{H}]^+$), 340,3 (340,1; $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

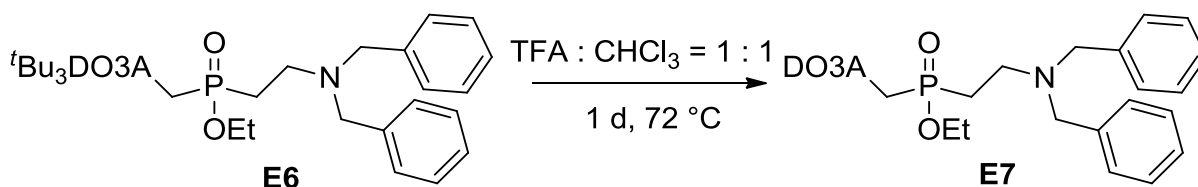
MS(-): 281,2 (281,1; $[\text{M}-\text{Et}]^-$)

Charakterizácia látky **E6**:

$^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ -NMR (bezvodý pyridín): 51,2 (s)

MS(+): 844,7 (844,5; $[\text{M}+\text{H}]^+$), 866,6 (866,5; $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

MS(-): 814,6 (814,5; $[\text{M}-\text{Et}]^-$)



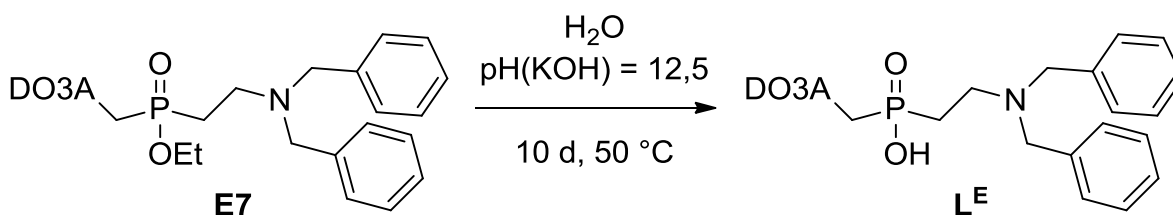
Olej obsahujúci látku **E6** bol rozpustený v 150 ml zmesi TFA : CHCl₃ = 1 : 1 v 250ml guľatej banke. Reakčná zmes bola refluxovaná (72 °C) pod spätným chladičom so sušiacou trubičkou naplnenou s CaCl₂ počas 6 hodín. Roztok bol zbavený rozpúšťadlami na RVO a ešte raz po pridaní cca 50 ml destilovanej vody. Získaný bol olej čiernej farby (nevážený medziprodukt, podľa ³¹P-NMR kvantitatívny výtťažok) obsahujúci látku **E7**.

Charakterizácia látky **E7**:

³¹P{¹H}-NMR (10% vodný roztok pyridínu): 53,9 (s)

MS(+): 676,5 (676,4; [M+H]⁺), 698,5 (698,3; [M+Na]⁺), 714,4 (714,3; [M+K]⁺), 736,4 (736,3; [M+Na+K-H]⁺), 752,3 (752,3; [M+2K-H]⁺)

MS(-): 674,3 (673,3; [M-H]⁻)



Olej obsahujúci látku **E7** bol rozpustený v 100 ml destilovanej vody v 250ml guľatej banke. Hodnota pH roztoku bola upravená na 12,5 s pevným KOH a roztok bol miešaný pri zahrievaní na 50 °C počas 2 dní. Následne bola hodnota pH roztoku znova upravená na 12,5 s KOH a tento proces bol opakovaný obdeň. Celkovo po 10 dňoch zahrievania na 50 °C a miešania bola konverzia reakcie približne kvantitatívna (³¹P-NMR).

Roztok bol nanesený na kolónu s Dowex 50 (500 ml) a kolóna bola premytá s H₂O (1500 ml), EtOH (1000 ml) a H₂O (500 ml). Produkt bol následne eluovaný s 10% vodným roztokom pyridínu a zahustený na RVO. Získaný olej bol rozpustený v 50 ml EtOH a rozpúšťadlá roztoku boli odstránené na RVO. Odparok bol rozpustený v 25 ml EtOH a produkt bol vyzrážaný pridaním 125 ml 1,4-dioxánu. Pevná látka bola oddelená od matečného roztoku filtráciou na frite hrubosti S4 a precipitát bol sušený dispergovaním v 25 ml Et₂O, následným odsatím kvapaliny a 15 min presávaním vzduchu. Látka **L^E · 5H₂O** bola získaná vo forme bieleho prášku (*m* = 3,45 g, 47 %).

Charakterizácia látky **L^E**:

¹H-NMR (D₂O, pD = 3,64 + 0,41): 2,18 (m, 2H, P-CH₂-CH₂), 2,86 (d, ²J_{HP} = 6,4 Hz, 2H, N-CH₂-P), 2,97–3,17 (bm, 6H, C1 + C4), 3,22–3,30 (bm, 2H, C1), 3,30–3,43 (bm, 4H, C2 + C3), 3,41 (t, ³J_{HH} = 8,6 Hz, 2H, CH₂-CH₂-N-Bn), 3,43–3,49 (bm, 4H, C2 + C3), 3,50 (s, 2H, N-CH₂-COOH), 3,85 (q, *J* = 15,4 Hz, 4H, (N-CH₂-COOH)₂), 4,36 (bd, *J* = 52,3 Hz, 4H, N-CH₂-Ph), 7,44–7,57 (m, 10H, Ph)

¹³C{¹H}-NMR (D₂O, pD = 3,64 + 0,41): 24,8 (d, ¹J_{CP} = 83,0 Hz, P-CH₂-CH₂), 48,9 (CH₂-CH₂-N-Bn), 48,9 (C4), 49,8 (C1), 51,4 (C2), 52,2 (C3), 52,9 (d, ¹J_{CP} = 95,2 Hz, N-CH₂-P), 54,6 (N-CH₂-COOH), 56,9 (N-CH₂-Ph), 57,5 ((N-CH₂-COOH)₂), 130,0 (Ph), 130,2 (Ph), 130,7 (Ph), 131,7 (Ph), 170,9 ((N-CH₂-COOH)₂), 175,6 (N-CH₂-COOH)

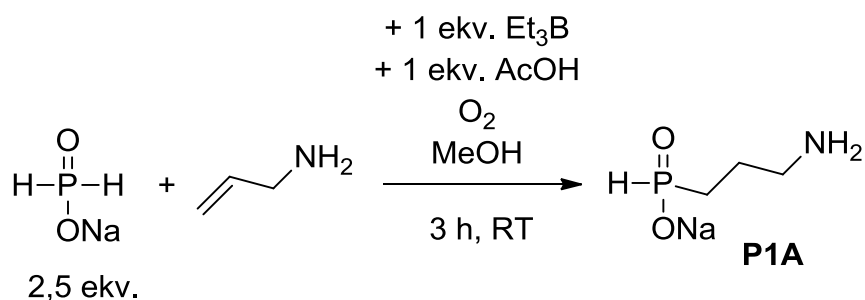
³¹P{¹H}-NMR (D₂O, pD = 3,64 + 0,41): 35,9 (s)

MS(+): 686,0 (686,3; [M+K]⁺), 707,9 (708,3; [M+Na+K-H]⁺), 729,9 (730,2; [M+2Na+K-2H]⁺)

MS(-): 683,7 (684,3; [M-2H+K]⁻)

EA(L^E · 5H₂O): C 50,71 (50,47), H 7,74 (7,65), N 9,32 (9,49)

3.8 Syntéza látky L^P



Postup bol zreprodukovaný podľa literatúry (89).

V 250ml guľatej banke bolo zmiešaných 1,14 g (20 mmol) allylamínu, 5,30 g (50 mmol, 2,5 ekv.) monohydrátu fosforanu sodného, 100 ml methanolu a 1,2 ml (21 mmol, 1 ekv.) kyseliny octovej. Zmes bola rozpustená pomocou ultrazvuku (5 min). Do miešaného roztoku v otvorenej banke bolo injekciou a pod hladinu roztoku pridaných 20 ml (1 ekv.) 1M triethylboránu v THF. Roztok bol 3 hodiny miešaný pri RT v otvorenej nádobe.

Následne boli rozpúšťadlá reakcie odparené na RVO a odparok bol nanosený na kolónu s Dowex 50 (150 ml). Kolóna bola premytá s 450 ml H₂O a produkt bol eluovaný s roztokom konc. NH₃ : EtOH = 1 : 1. Po zbavení rozpúšťadiel eluátu na RVO bol odparok rozpustený v 50 ml H₂O a rozpúšťadla boli znova odparené. Olej obsahujúci produkt **P1A** bol použitý do ďalšej reakcie (nevážený medziprodukt).

Charakterizácia látky **P1A**:

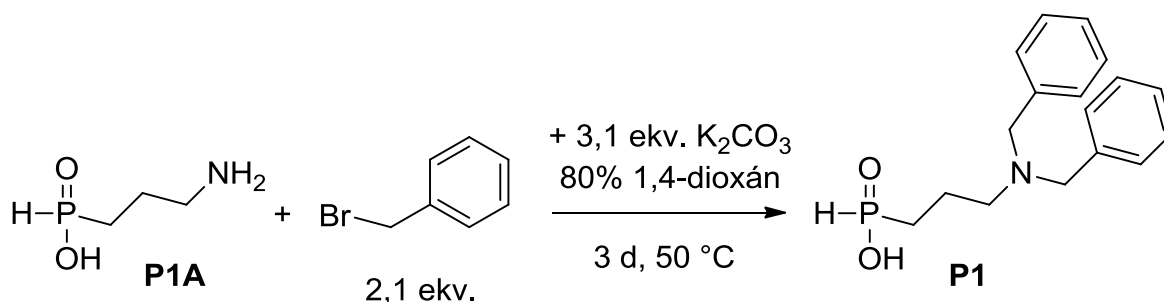
¹H-NMR (D₂O, pD = 8,12 + 0,41): 1,61 (dtm, ²J_{HP} = 15,9 Hz, ³J_{HH} = 8,1 Hz, 2H, P-CH₂-CH₂), 1,82–1,91 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂), 3,07 (td, ³J_{HH} = 7,5 Hz, ⁴J_{HP} = 1,1 Hz, 2H, CH₂-CH₂-N), 6,96 (d, ¹J_{HP} = 509,8 Hz, 1H, H-P-CH₂)

¹³C{¹H}-NMR (D₂O, pD = 8,12 + 0,41): 20,1 (CH₂-CH₂-CH₂), 20,9 (d, ¹J_{CP} = 89,7 Hz, P-CH₂-CH₂), 40,7 (d, ³J_{CP} = 17,6 Hz, CH₂-CH₂-N)

³¹P-NMR (D₂O, pD = 8,12 + 0,41): 27,9 (dtt, ¹J_{PH} = 509,8 Hz, ²J_{PH} = 15,3 Hz, ³J_{PH} = 11,8 Hz)

MS(+): 169,8 (169,0; [M+2Na-H]⁺)

MS(-): 121,6 (122,0; [M-H]⁻)



Olej obsahujúci produkt **P1A** (teoreticky cca 2,5 g, 20 mmol) bol rozpustený v 125 ml cca 80% vodného roztoku 1,4-dioxánu v 250ml guľatej banke. K roztoku bol prisýpaných 8,70 g (63 mmol, 3,1 ekv.) K_2CO_3 a injekciou pod hladinu roztoku pridaných 5,0 ml (42 mmol, 2,1 ekv.) benzyl bromidu. Na banku bola nasadená sušiacca trubička s $CaCl_2$ a roztok bol miešaný a zahrievaný na 50 °C počas 3 dní. Následne bolo k roztoku priliateho 1–2 ml 40% vodného roztoku dimethylamínu a po 3 hodinách miešania pri chladnutí z 50 °C na RT boli rozpúšťadlá reakcie odparené pomocou RVO.

Odparok bol dispergovaný v 50 ml ethanolu a daný do ultrazvuku na 5 min. Nerozpustené soli boli odstránené na frite hrubosti S3. Filtrát bol zahustený na RVO a nanosený na kolónu s Dowex 1 (200 ml). Kolóna bola premytá s 500 ml cca 50% vodného roztoku ethanolu a produkt bol eluovaný s 20% vodným roztokom AcOH. Po odparení rozpúšťadiel na RVO bol odparok nanosený na kolónu s Dowex 50 (150 ml) a premytý s 300 ml H_2O . Produkt bol eluovaný so zmesou konc. NH_3 : EtOH = 1 : 1. Po odstránení rozpúšťadiel na RVO a vysušení odparením s 10 ml TOL, bol získaný žltý olej obsahujúci produkt **P1** ($m = 4,45$ g, 70 %).

Charakterizácia látky **P1**:

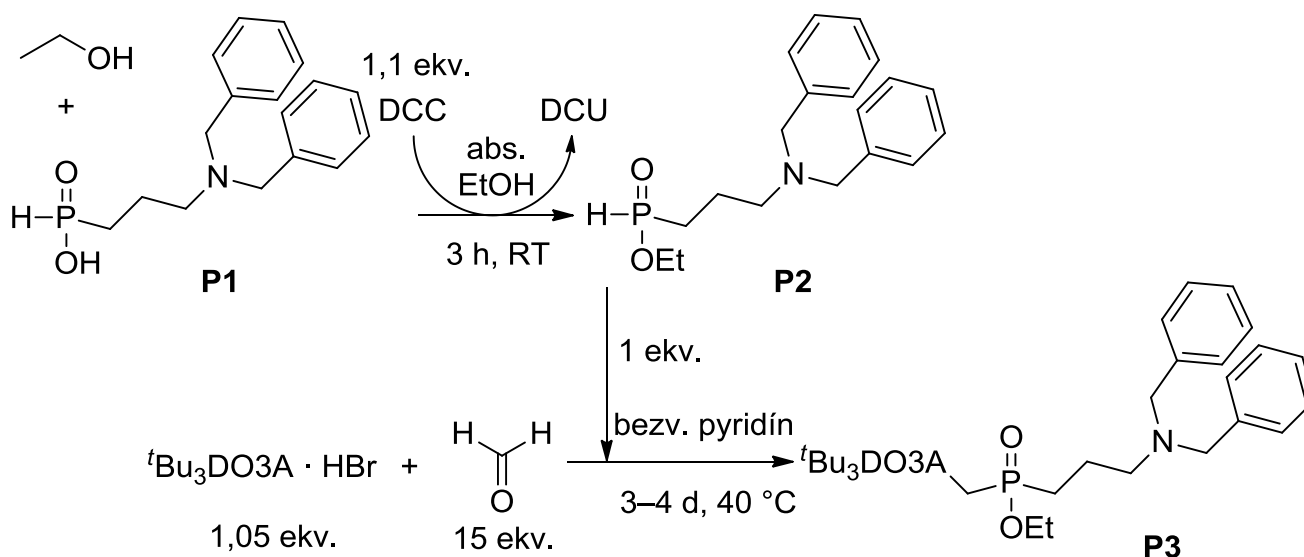
1H -NMR (D_2O , pD = 3,14 +0,41): 1,47 (dt, $^2J_{HP} = 15,3$ Hz, $^3J_{HH} = 7,7$ Hz, 2H, P- CH_2-CH_2), 1,99 (dp, $^3J_{HP} = 12,5$ Hz, $^3J_{HH} = 7,7$ Hz, 2H, $CH_2-CH_2-CH_2$), 3,18 (t, $^3J_{HH} = 8,0$ Hz, 2H, CH_2-CH_2-N), 4,37 (s, 4H, N- CH_2-Ph), 6,91 (d, $^1J_{HP} = 511,6$ Hz, 1H, H-P- CH_2), 7,43–7,57 (m, 10H, Ph)

$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (D_2O , pD = 3,14 +0,41): 16,8 ($CH_2-CH_2-CH_2$), 29,0 (d, $^1J_{CP} = 89,2$ Hz, P- CH_2-CH_2), 53,6 (d, $^2J_{CP} = 16,9$ Hz, CH_2-CH_2-N), 57,8 (N- CH_2-Ph), 129,8 (Ph), 130,0 (Ph), 130,8 (Ph), 131,8 (Ph)

^{31}P -NMR (D_2O , pD = 3,14 +0,41): 28,0 (dp, $^1J_{PH} = 511,6$ Hz, $^{2,3}J_{HH} = 14,0$ Hz)

MS(+): 303,9 (304,1; $[M+H]^+$), 325,9 (326,1; $[M+Na]^+$)

MS(-): 301,6 (302,1; $[M-H]^-$)



0,40 g (1,32 mmol) oleja obsahujúci látku **P1** a 0,30 g (1,45 mmol; 1,1 ekv.) DCC bolo rozpustených v 50 ml abs. EtOH v 100ml slzovitej banke. Po 3 hodinách miešania pri RT boli rozpúšťadlá reakcie odparené na RVO pri teplote vodného kúpeľa do 50 °C. Odparok bol čiastočne rozpustený v bezvodom pyridíne a prefiltrovaný cez 0,2 µm PTFE filter od DCU rovno do zmesi v 100ml guľatej banke obsahujúcej 0,83 g (1,39 mmol; 1,05 ekv.) látky $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ a 0,59 g (19,8 mmol; 15 ekv.) paraformaldehydu. Banka bola naplnená s bezvodým pyridínom až takmer po zábrus a reakčná zmes bola miešaná a zahrievaná na 40 °C počas 4 dní.

Paraformaldehyd bol odstránený filtráciou roztoku cez fritu hrubosti S4 a filtrát bol zahustený na RVO. Odparok bol rozpustený v 50 ml zmesi DCM : Et₂O = 1 : 10. Po 1 dni stánia pri RT bola na fritu hrubosti S3 odfiltrovaná vylúčená nezreagovaná látka $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$. Filtrát bol zbavený na rozpúšťadiel na RVO a bol získaný hnedý olej obsahujúci látku **P3** (nevážený medziprodukt, podľa ³¹P-NMR kvantitatívna konverzia).

Charakterizácia látky **P2**:

³¹P-NMR (abs. EtOH): 42,1 (dm, ¹J_{PH} = 539,5 Hz)

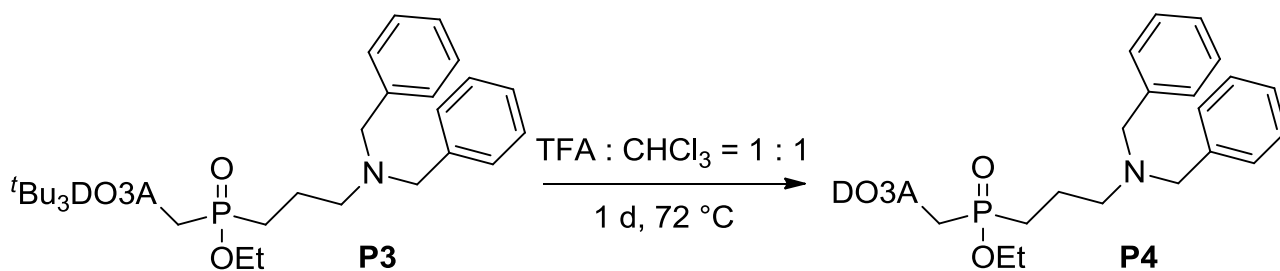
MS(+): 332,0 (332,2; [M+H]⁺), 353,9 (354,2; [M+Na]⁺)

MS(-): 301,6 (302,1; [M-Et]⁻)

Charakterizácia látky **P3**:

³¹P{¹H}-NMR (bezvodý pyridín): 52,3 (s)

MS(+): 858,2 (858,6; [M+H]⁺), 880,2 (880,5; [M+Na]⁺)



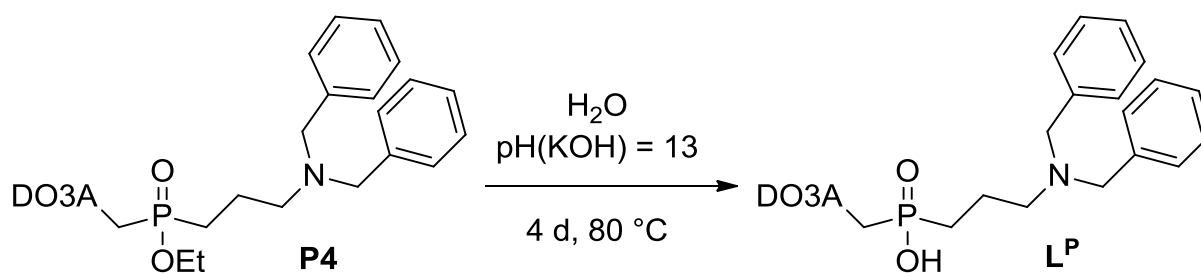
Olej obsahujúci látku **P3** bol rozpustený v 50 ml zmesi TFA : CHCl₃ = 1 : 1 v 100ml guľatej banke. Roztok bol refluxovaný (72 °C) pod spätným chladičom so sušiacou trubičkou naplnenou s CaCl₂ počas 1 dňa. Následne boli rozpúšťadlá reakcie odparené na RVO, k odparku bolo pridaných 25 ml H₂O a roztok bol znova zbavený rozpúšťadiel. Nakoniec bol získaný čierny olej obsahujúci látku **P4** (nevážený medziprodukt, podľa ³¹P-NMR kvantitatívna konverzia).

Charakterizácia látky **P4**:

³¹P{¹H}-NMR (TFA : CHCl₃ = 1 : 1): 55,5 (s)

MS(+): 690,0 (690,4; [M+H]⁺), 712,0 (712,4; [M+Na]⁺), 728,0 (728,3; [M+K]⁺), 750,0 (750,3; [M+Na+K-H]⁺)

MS(-): 687,8 (688,4; [M-H]⁻), 725,8 (726,3; [M-2H+K]⁻), 748,7 (748,3; [M-3H+Na+K]⁻)



Olej obsahujúci látku **P4** bol rozpustený v 50 ml H_2O a hodnota pH roztoku bola upravená na cca 13,0 s pevným KOH. Roztok bol miešaný a zahrievaný pod prítomným spätným chladičom na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ počas 4 dní.

Následne bola zmes ochladená na RT a nanosená na kolónu s Dowex 50 (150 ml). Kolóna bola premytá s H_2O (300 ml), EtOH (300 ml) a H_2O (150 ml). Produkt bol eluovaný s 10% vodným roztokom pyridínu. Eluovaný roztok bol zbavený rozpúšťadiel na RVO. Odparok bol nanosený na kolónu s Amberlite CG50 (50 ml) a kolóna bola premytá s H_2O (150 ml), 5% vodným roztokom AcOH (50 ml) a 3% vodným roztokom HCl (100 ml). Chlorovodíková frakcia bola zahustená na RVO a nanosená na kolónu s Dowex 50 (100 ml). Po premytí kolóny s 200 ml H_2O bol produkt eluovaný s 10% vodným roztokom pyridínu. Rozpúšťadlá eluátu boli odparené na RVO. Odparok bol rozpustený v 50 ml EtOH a produkt bol vyžrážaný pridaním 150 ml THF. Po chvíli tritúrácie prášku v ultrazvuku (5 min) bola pevná látka izolovaná zachytením na frite hrubosti S4. Precipitát bol sušený dispergovaním v 10 ml Et_2O , jeho odsatím a presatím vzduchu (5 min). Získaný hnedobiely prášok obsahoval nečistú látku **L^P** ($m = 0,12 \text{ g}$) s pravdepodobnou prímiesou oxidovanej formy látky **P1** (fosfónová kyselina).

Charakterizácia látky **L^P**:

¹H-NMR (D_2O , pD = 3,61 + 0,41): 1,51–1,61 (m, 2H, P–CH₂–CH₂), 1,97–2,06 (m, 2H, CH₂–CH₂–CH₂), 3,04–3,11 (bm, 2H, C4), 3,06 (d, ²J_{HP} = 4,5 Hz, 2H, N_C–CH₂–P), 3,11–3,16 (bm, 2H, C4), 3,16–3,23 (bm, 2H, C1), 3,23 (t, ³J_{HH} = 7,7 Hz, 2H, CH₂–CH₂–N–Bn), 3,29–3,36 (bm, 2H, C3), 3,36–3,48 (bm, 6H, C1 + C2 + C3), 3,50–3,58 (bm, 2H, C2), 3,54 (s, 2H, HOOC–CH₂–N), 3,77–3,90 (bm, 4H, (HOOC–CH₂–N)₂), 4,29–4,46 (bm, 4H, N–CH₂–Ph), 7,40–7,66 (m, 10H, Ph)

¹³C{¹H}-NMR (D_2O , pD = 3,61 + 0,41): 17,5 (CH₂–CH₂–CH₂), 28,4 (d, ¹J_{CP} = 88,8 Hz, P–CH₂–CH₂), 49,2 (C4), 50,0 (C1), 51,5 (C2), 51,9 (C3), 52,7 (d, ¹J_{CP} = 90,6 Hz, N_C–CH₂–P), 54,4 (d, ³J_{CP} = 14,5 Hz, CH₂–CH₂–N–Bn), 54,6 (HOOC–CH₂–N), 57,3 ((HOOC–CH₂–N)₂), 57,6 (N–CH₂–Ph), 130,0 (Ph), 130,7 (Ph), 130,8 (Ph), 131,8 (Ph), 171,3 ((HOOC–CH₂–N)₂), 175,0 (HOOC–CH₂–N)

³¹P{¹H}-NMR (D_2O , pD = 3,61 + 0,41): 37,9 (s)

MS(+): 684,0 (684,3; [M+Na]⁺), 700,0 (700,3; [M+K]⁺), 722,0 (722,3; [M+Na+K–H]⁺)

MS(–): 683,7 (683,3; [M–2H+Na][–]), 697,8 (698,3; [M–2H+K][–])

3.9 Postup, usporiadanie a vyhodnotenie spektrálnymi metódami

NMR titrácie

Do NMR trubičky bolo navážených okolo 12 mg pevnej látky pre ligandy a 25 mg oleja pre komplexy. Z látok bol vytvorený roztok pridaním 400 μl destilovanej vody. Hodnota pH roztoku bola menená so zriedenými vodnými roztokmi LiOH (cca 5% a 0,5%) alebo CsOH (cca 5%) pre titrované ligandy, NaOH (cca 2,5% a 0,2%) pre komplexy a vodným roztokom HCl pre všetky titrované látky (3% a 0,3%).

NMR titrácia látok prebiehala nasledovne: na čerstvo nakalibrovanej elektróde bola zmeraná hodnota pH pripraveného roztoku v NMR trubičke a ďalej bolo zmerané ^1H -NMR spektrum s H-inzertom. Následne bol vymenený H-inzert za P-inzert a bolo zmerané ^{31}P -NMR spektrum (bez zmenenia nastavenia locku a NMR parametrov shimu), ktoré bolo referencované na štandard. Po ďalšej úprave hodnoty pH boli merané spektrá len s H-inzertom so zachovaním NMR parametrov merania. Pre NMR titračný experiment ligandov boli použité 2 kyvety so vzorkou – jednej bola menená hodnota pH do kyslej oblasti a druhej do bázičkej oblasti. Pre NMR titrácie komplexov bola hodnota pH vzorky postupne upravovaná najprv k pH $\sim 2,0$ a následne menená do pH $\sim 11,0$. Iónová sila roztoku nebola kontrolovaná.

Získané spektrá boli vyhodnotené v programe MestReNova a dáta spracované v programe P z balíku programu OPIUM (freeware (90)).

Potenciometrické titrácie

Pred každou vlastnou titráciou bola elektróda kalibrovaná na zmesi vodného roztoku HCl s NMe_4Cl (konc. rádovo 10^{-2} M, celková iónová sila bola cca 10^{-1} M) titráciou s vodným roztokom NMe_4OH (konc. rádovo 10^{-1} M) pomocou automatického titrátoru. Teplota celej titrácie bola nastavená na $25,0 \pm 0,1$ °C termostatom. Vlastná titrácia bola učená so zmesou vodného roztoku HCl s NMe_4Cl a vodného roztoku ligandu titráciou s vodným roztokom NMe_4OH (konc. rádovo 10^{-1} M) pomocou automatického titrátoru. Roztok ligandu bol pripravený rozpustením 0,7208 g prášku ligandu látky $\text{L}^{\text{M}} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($M_r = 687,73$) v 49,89 ml H_2O , 0,5890 g prášku hydrochloridu ligandu L^{A} (pravdepodobne vo forme $\text{L}^{\text{A}} \cdot \text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $M_r = 543,94$) v 49,91 ml H_2O a 0,7767 g prášku ligandu $\text{L}^{\text{E}} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($M_r = 737,78$) v 49,94 H_2O .

Experimenty boli vykonané Mgr. Zuzanou Böhmovou.

Luminiscenčné merania

Meraný roztok bol pripravený 2- až 3-násobným odparom (pomocou RVO) polykryštalickej látky (cca 20 mg) z roztoku destilovanej alebo deuterovanej vody (podľa typu merania) a následným rozpustením v 1,000 ml daného typu vody. Následne bol roztok prefiltrovaný cez mikrofilter (0,2 μm PTFE) do fluorescenčnej kyvety a hodnota pH roztoku bola upravená prídavkom pár μl zriedeného vodného roztoku HCl alebo NaOH.

Vzorkám (komplexom) bolo zmerané excitačné (pre Eu^{3+} $\lambda_{\text{EM}} = 616$ nm alebo 595 nm a $\lambda_{\text{EX}} = 300\text{--}550$ nm a pre Tb^{3+} $\lambda_{\text{EM}} = 544$ nm a $\lambda_{\text{EX}} = 300\text{--}520$ nm, obe s krokom $\Delta\lambda = 1$ nm a rýchlosťou kroku $\Delta\lambda = 5$ nm/s) a emisné (pre Eu^{3+} $\lambda_{\text{EX}} = 362$ nm alebo 395 nm a $\lambda_{\text{EM}} = 500\text{--}720$ nm a pre Tb^{3+} $\lambda_{\text{EX}} = 379$ nm a $\lambda_{\text{EM}} = 400\text{--}650$ nm, obe s krokom $\Delta\lambda = 1$ nm a rýchlosťou kroku $\Delta\lambda = 5$ nm/s) spektrum a následne vyhasínania fluorescencie (pre Eu^{3+} od času $\tau_{\text{min}} = 100$ (100) μs po $\tau_{\text{max}} = 5,0$ (2,5) ms s krokom $\Delta\tau = 20$ (10) μs , 1000 opakovaní, a pre Tb^{3+} od času $\tau_{\text{min}} = 150$ (150) μs po $\tau_{\text{max}} = 10$ (5) ms s krokom $\Delta\tau = 30$ (20) μs , 700 opakovaní – časové parametre sú uvedené pre D_2O (H_2O) roztoky). Spektrá so zaznamenaným vyhasínaním fluorescencie boli preložené fitom s exponenciálnou závislosťou, čím bol získaný parameter k_{D} alebo k_{H} .

Vysokorozlíšené UV-VIS merania

Meraný roztok bol pripravený z polykryštalickej látky europitého komplexu (cca 150 mg) rozpustením v 1,000 ml čistenej vody a prefiltrovaním cez mikrofilter (0,2 μm PTFE) do kremennej UV-VIS kyvety. Absorpčné spektrá $\lambda = 581$ až 578 nm boli merané s krokom $\Delta\lambda = 0,005$ nm. Získané spektrá boli korigované na absorpciu pozadia zarovnaním čiary „baseline“ (cez lineárny fit s krajných bodov, kde teoretická absorbancia $A = 0$). Dekonvolúcia zloženého signálu bola učená rovnicou [22].

^{17}O -NMR experimenty

Pre merania na spektrometri Varian VNMRs 400 boli použité 5mm NMR kyvety a externý inert s 1% D_2O roztokom $^t\text{BuOH}$ a 0,5% H_2^{17}O a samostatne meraná referenčná kyveta s H_2O a na spektrometri Bruker Avance (III) 500 2,6mm NMR kyvety so samostatne meranou vzorkou (bez prítomnosti komplexu, roztok bol obohatený s H_2^{17}O na cca 0,5 % a s $^t\text{BuOH}$ na $\sim 0,5$ %). Teplota vzorky bola učená po dobu 15 min. Pri meraní roztokov s Dy^{3+} bola teplota merania RT. Koncentrácia komplexov v roztokoch bola určená metódou BMS ($c_{\text{GdL}} \sim 20$ mM).

Spektrá látok boli vyhodnotené v programe MestReNova.

Fluorescenčné merania

Kryštalická pevná látka gadolinitého komplexu látky L^M (cca 5 mg) bola rozpustená v čistenej vode (2 ml) a koncentrácia roztoku bola stanovená metódou BMS ($C_{GdL} = 1,53$ mM). Zásobný roztok fluorescenčných látok bol pripravený rozpustením $m(ANS) = 3,7$ mg pridaním H_2O v 10ml odmernej banke, $m(DSg) = 7,9$ mg pridaním H_2O v 25ml odmernej banke (roztok bolo nutné zahriať a použiť ultrazvuk) a $m(DSa) = 7,7$ mg pridaním bezvodého MeOH v 25ml odmernej banke. Roztok sérového albumínu bol pripravený rozpustením $m(HSA) = 6,7$ mg pridaním pufráčného roztoku v 10ml odmernej banke. Pufráčny roztok PBS (0,3 M) bol pripravený rozpustením $m(NaCl) = 200,0$ mg, $m(KCl) = 5,0$ mg, $m(Na_2HPO_4 \cdot H_2O) = 41,0$ mg a $m(KH_2PO_4) = 6,0$ mg pridaním H_2O v 25ml odmernej banke a pufráčny roztok SSC (0,3 M) rozpustením $m(NaCl) = 200,0$ mg, $m(KCl) = 5,0$ mg a $m(\text{monohydrát citrónovej kyseliny}) = 63,0$ mg pridaním H_2O v 25ml odmernej banke. Hodnota pH roztokov HSA s puframi bola upravená so zriedenými vodnými roztokmi HCl alebo NaOH – pre PBS na pH = 7,4 a pre SSC = 4,5.

Vlastná titrácia prebiehala prídavkom 1 až 4 μ l daného roztoku (koncentrácia v oblasti mM) do 1,500 ml meraného roztoku (koncentrácia v oblasti μ M). Premiešanie látok bolo učené mechanickou agitáciou alebo nasatím a vysatím roztoku do špičky automatickej byrety. Krok merania bol nastavený na $\Delta\lambda = 3$ nm.

Relaxometrické merania

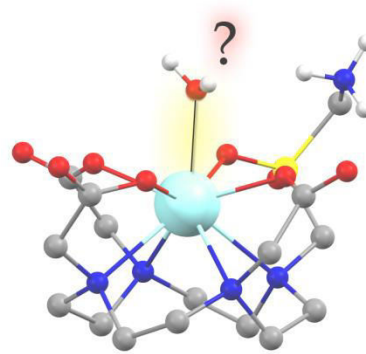
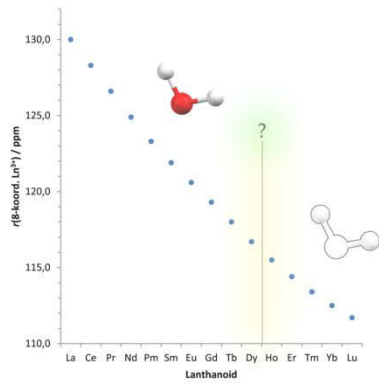
Meraným vodným roztokom Gd-L, ktorého koncentrácia bola určená metódou BMS, bola hodnota pH upravovaná vodnými roztokmi HCl a NaOH. Zastúpenie HSA bolo zvyšované prídavkom pevného HSA do magneticky miešaného roztoku. Roztok inhibítora (Ibuprofen[®] a Warfarin[®]) s Gd- L^M bol pripravený pridaním danej pevnej látky do vodného roztoku Gd- L^M .

Meranie prebiehalo odobratím časti roztoku do kyvety a po zmeraní bol tento roztok vrátený k materskému roztoku. 1H -NMRD profil Gd- L^M s HSA bol meraný z roztoku po ukončení titrácie s HSA (najkoncentrovanejší roztok HSA s prítomným komplexom Gd- L^M).

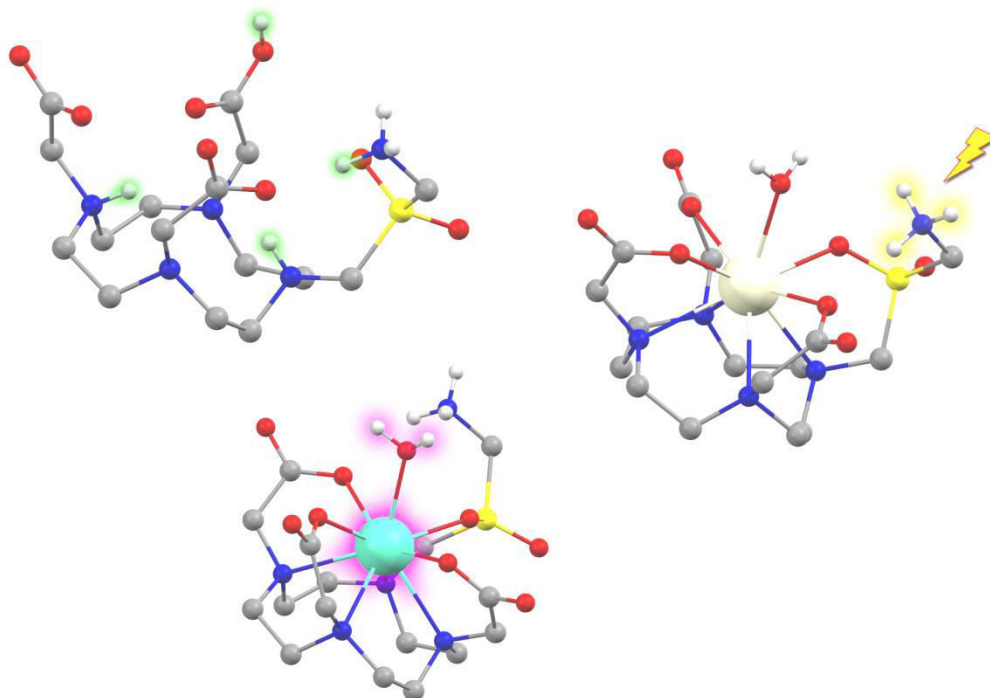
PARACEST experimenty

Merané Ln^{3+} komplexy boli rozpustené v H_2O s 1 % t BuOH (stanovenie koncentrácie metódou BMS – koncentrácie boli približne 60 mM). Hodnota pH roztoku bola menená s vodnými roztokmi HCl a NaOH. Roztoky boli merané v 5mm NMR trubičkách s externým inzertom ($D_2O + 0,1$ % t BuOH). Ďalej bola použitá štandardná pulzná sekvencia pre presaturáciu signálu. Ak nie je uvedené inak, teplota vzoriek bola 25 °C. Intenzita saturačného pulzu bola 29 dB (~ 1000 Hz) a doba ožarovania saturačným pulzom bola 2 s.

Experimenty boli vykonané Mgr. Terezou Krchovou.

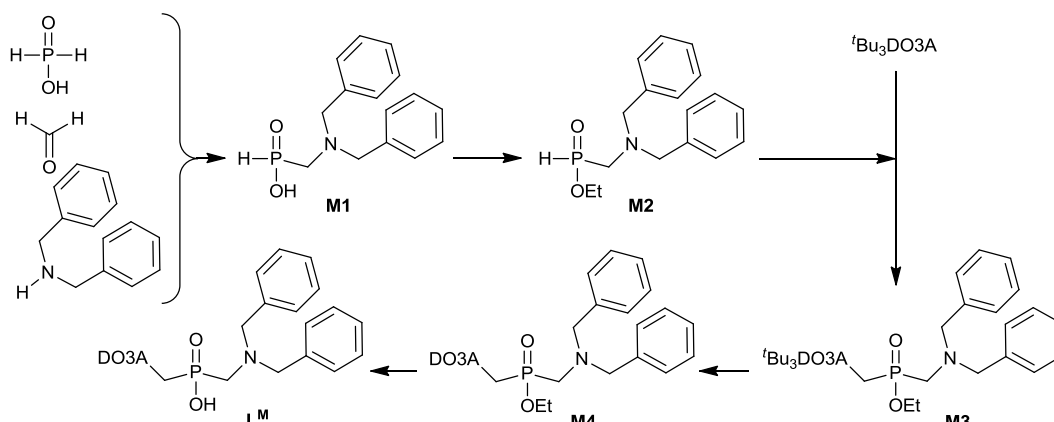


4. Výsledky a diskusia



4.1 Syntéza navrhnutých ligandov

4.1.1 Ligand s pendantnou dibenzylaminometylovou skupinou (L^M)



Látka L^M bola pripravená a charakterizovaná už v bakalárskej práci (87). Avšak jej príprava nebola ideálna, a preto bola syntetická cesta optimalizovaná nasledovne:

Látka $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$, M_2 a paraformaldehyd reagujú v pomere 1,05 : 1 : 15 v bezvodom pyridíne. Reakcia je miešaná a zahrievaná na 40 °C počas 3–4 dní.

Odparok reakčnej zmesi látky M_3 bol rozpustený v Et_2O a po 1 dni státi pri RT bola vylúčená nezreagovaná látka $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$, ktorá bola následne odfiltrovaná na frite hrubosti S_3 , a tým bola recyklovaná a mohla byť znovu použitá.

Extrakčné procedúry pri čistení látky M_3 boli zbytočné, pretože po extrakciách obe fáze obsahovali čistený produkt M_3 . Nepolárne nečistoty, ktoré sú touto purifikáciou odstránené, sa dajú separovať i neskôr, konkrétne pri čistení na kolóne s Dowex 50.

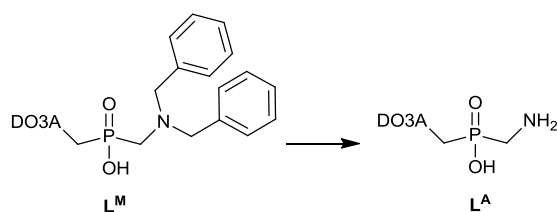
Olej obsahujúci látku M_4 bol rozpustený v cca 75% vodnom roztoku pyridínu. Reakčná zmes bola miešaná a zahrievaná na 60 °C počas 7–10 dní. Po odstránení rozpúšťadiel reakcie na RVO bol odparok spracovaný rovnako ako bolo už popísané (kolóna s Dowex 50).

Odparok (olej) obsahujúci látku L^M bol triturovaný vo vriacom THF nad teplovzdušnou pištoľou. Pevný podiel (hnedooranžový prášok) bol izolovaný na frite hrubosti S_4 , sušený dispergovaním v Et_2O a po jeho odsatí ešte sušený presatím vzduchu (5 min). Získaný prášok bol následne triturovaný prídavkom teplého EtOH v ultrazvuku (5 min). Pevný podiel obsahujúci látku L^M bol odfiltrovaný na frite hrubosti S_3 .

Matečné filtráty s podielom látky L^M je možné pomocou hydrogenácie odstrániť benzylové skupiny a čistením reakčnej zmesi na kolóne s Dowex 50 následne izolovať látku L^A (fosfónové deriváty a prítomná DCU sú eluované už s vodou alebo ethanolom, látka L^A je eluovaná až s 5% vodným roztokom NH_3).

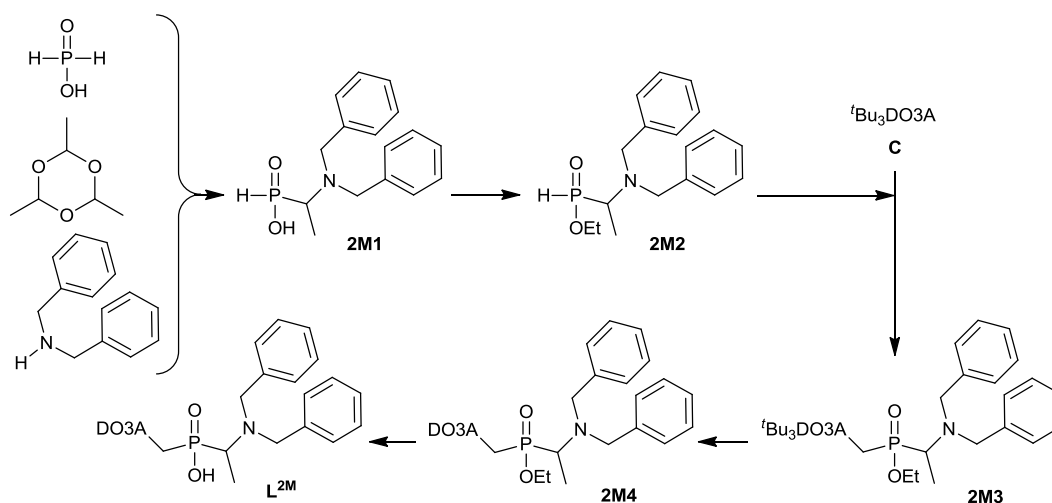
Výťažok reakcie bol 69 % a postup bol týmito popísanými krokmi optimalizovaný pre počiatočnú navážku látky $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ rovnú až 10,00 g.

4.1.2 Ligand s pendantnou aminometylovou skupinou (L^A)

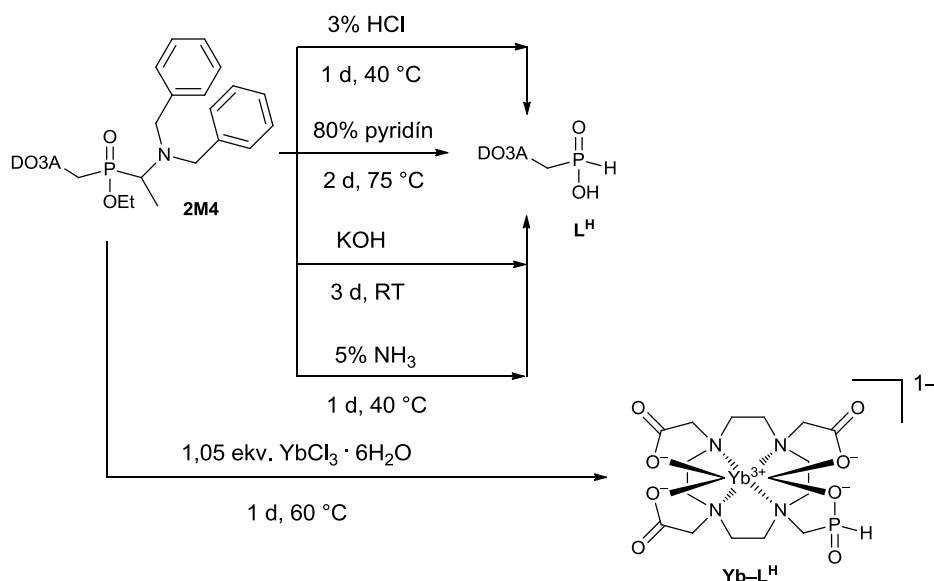


Látka L^A bola pripravená hydrogenáciou látky L^M . Najúčinnějšími podmienkami reakcie bolo zahrievanie na teplotu 40 °C v približne 75% vodnom roztoku kyseliny octovej a použitie až 0,1 hmotn. ekv. katalyzátora 10% Pd/C. Tým sa minimalizoval podiel monobenzylovaného intermediátu. Po vyčistení zmesi odfiltrovaním katalyzátora, odstránením rozpúšťadiel na RVO a na kolóne s Dowex 50 bola látka L^A získaná vo forme kryštalického hydrátu amónnej soli. Izolácia látky L^A prebiehala trituráciou z odparku pomocou pridaného EtOH a ultrazvuku. Amoniak v štruktúre bol potvrdený špecifickou reakciou s Nesslerovým činidlom. Preto pre účely potenciometrických titrácií bola látka $L^A \cdot \frac{1}{2}NH_3 \cdot 8H_2O$ prevedená na hydrochlorid nanesením na kolónu s Dowex 1 a eluovaním s 3% vodným roztokom HCl. Látka L^A opäť bola získaná v pevnej fáze po triturácii z odparku pomocou pridaného EtOH a ultrazvuku.

4.1.3 Ligand s pendantnou dibenzylamino-1,1-etylovou skupinou (L^{2M})

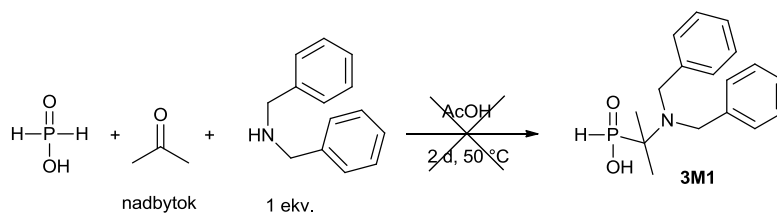


Syntetická cesta k látke $2M1$ bola vedená obmenou Mannichovej reakcie. Pre látku $2M1$ bol použitý acetaldehyd v jeho trimérnej forme (paraldehyd – kvapalina; lepšia manipulácia oproti plynnému acetaldehydu). Reakcia prebiehala takmer čisto v rozpúšťadle AcOH. Opäť bola dosiahnutá konverzia len do prvého stupňa (jedna voľná P–H väzba), avšak reakcia prebiehala pomalšie – i po zvýšení teploty reakčnej zmesi na 50 °C. Veľkou nevýhodou reakcie sú vznikajúce, pravdepodobne polymérne a hydrofóbne, nečistoty, ktoré sa veľmi pevne zachytávajú na iónomeničoch a ich odstránenie je náročné i s použitím ethanolického roztoku HCl. Pokus o cielečné stuženie výslednej fosfínovej kyseliny (látka $2M1$) bolo neúspešné. Po prevedení látky na hydrochlorid bol pozorovaný pomalý rozklad (pravdepodobne reakciou retromannichovského typu).

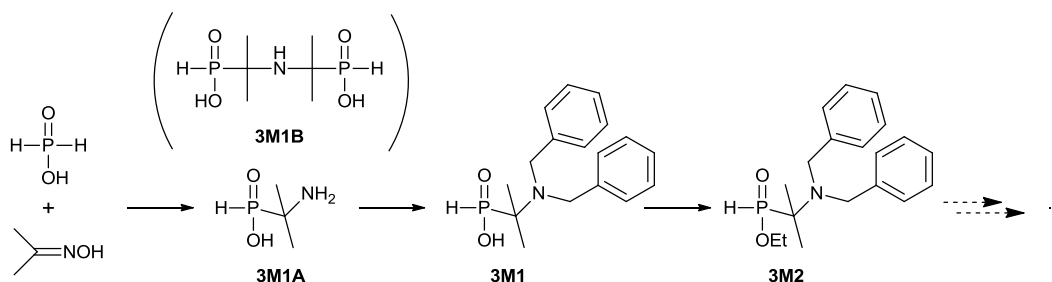


Následná konverzia fosfínovej kyseliny na jej ester (látka **2M2**) vyžadovala väčšie množstvo DCC, pravdepodobne pre obsah viazanej vody v látke **2M1** (viď EA látky **2M1**). Ďalšie reakcie (bázická reakcia Mannichovho typu v bezvodom pyridíne a eliminácia ^tBu esterov v chloroformovom roztoku TFA) prebiehali čisto (podľa ³¹P-NMR), až na hydrolýzu ethyl esteru látky **2M4**. Boli skúsené bázické hydrolýzy (s vodným roztokom NH₃, pyridínu, KOH), kyslá hydrolýza (vodný roztok HCl) i hydrolýza po komplexácii látky s lathanoidom (s YbCl₃ · 6H₂O) vo vode, no vždy bol na ³¹P-NMR a MS pozorovaný časom narastajúci signál látky **L^H**, čo môže svedčiť o samovoľnej hydrolýze látky **L^M**. Alternatívou prípravy komplexov látky **L^M** by mohla byť nevodná komplexácia organickej soli lathanoidu s následnou hydrolýzou ethyl esteru komplexu alebo najprv hydrolýzou esterov látky **2M3** v bezvodom prostredí (napríklad pomocou Me₃SiBr) a následne by bol v bezvodom prostredí vytvorený komplex pripravenej látky **L^M**. Tieto varianty ešte neboli testované.

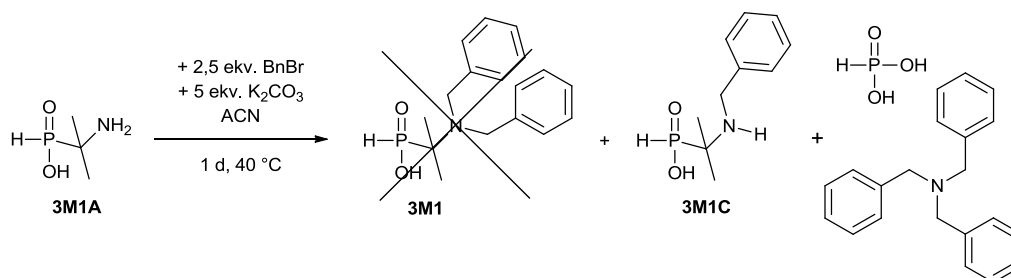
4.1.4 Ligand s pendantnou dibenzylamino-2,2-propylovou skupinou (**L^{3M}**)



Prvotné pokusy o syntézu látky **3M1** vychádzali z Mannichovej reakcie acetónu s reaktantmi, no v použítom rozpúšťadle AcOH konverzia bola nulová. Možným riešením by bolo zameniť rozpúšťadlo za silnejšiu kyselinu (HCl, HClO₄, H₂SO₄ a pod.) a reakčnú zmes zahriať na vyššiu teplotu, no tým by bolo znížená stabilita kyseliny fosforenej a látky **3M1** voči oxidácii. Nereaktivnosť ketónov a stericke bránených aldehydov v reakcii Mannichovho typu je všeobecne známa.



Inou reakčnou cestou bolo pripraviť intermediát – látku **3M1A** s primárnym amínom. Podľa literatúry adícia oxímov na fosfínové kyseliny (P–H väzba) prebieha najlepšie v bezvodých rozpúšťadlách a za prítomnosti kyseliny (91). Tieto poznatky boli testované a verifikované. Optimálnym rozpúšťadlom reakcie boli bezvodé alkoholické roztoky s adsorbovaným chlorovodíkom. Isopropanol bol vhodnejší pre jeho vyšší bod varu. Avšak ani v bezvodých rozpúšťadlách konverzia nasledovnej adície dvojnej väzby oxímu na kys. fosfornú neprekročila 55 %. Navyše bočnou reakciou bola pravdepodobne dvojnásobná adícia kys. fosforenej na oxím, ktorá poznaťne znižovala výťažok (cca z 60 % podľa ^{31}P -NMR). Izolácia látky **3M1A** spolu s látkou **3M1B** (hypotetická) bola účinná chromatograficky na kolóne s Dowex 50, kde sa látky zdržiavajú a netečú s čelom. Po odparení rozpúšťadiel na RVO a triturácii s EtOH v ultrazvuku bol získaný biely prášok. Všetok možný prítomný amoniak po reakcii bol odstránený na zmienenej kolóne s Dowex 50.

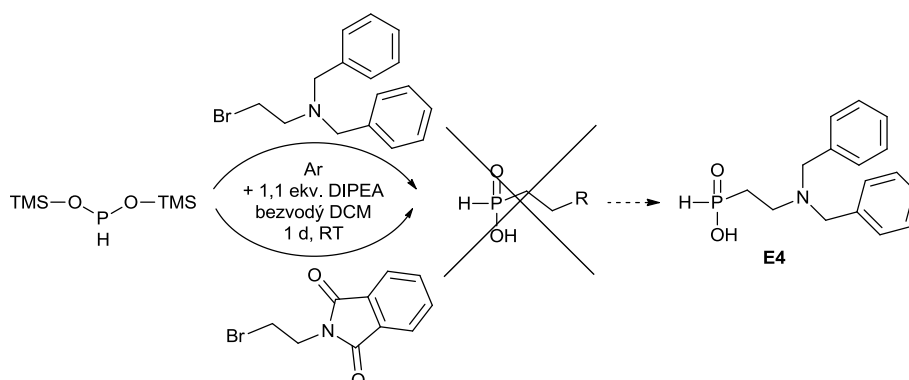


Avšak po alkylácii amino skupiny látky **3M1A** s benzylbromidom v rôznych rozpúšťadlách (EtOH, ACN, DMF, H_2O a i.) a pri rôznych reakčných teplotách bol získaný tribenzylamín. Podľa MS bola v zmesi po prevedenej reakcii prítomná takmer iba látka **3M1** (dôkaz na jej monobenzyl a amino derivát negatívny), no po purifikácii na iónomeničoch bol nanajvyš získaný jej monobenzyl derivát (látka **3M1C**), z ktorej bol pripravený vhodný monokryštál (z odparku purifikovanej zmesi) na röntgenoštruktúrnu analýzu (viď príloha), a s prímiesou amino derivátu (látka **3M1A**). S vysokou pravdepodobnosťou je látka **3M1** hydrolyticky nestála, čo nasvedčuje (podľa ^{31}P -NMR) aj prítomnosť H_3PO_3 alebo signálu dd (neznáma látka) v reakčnom zmesiach.

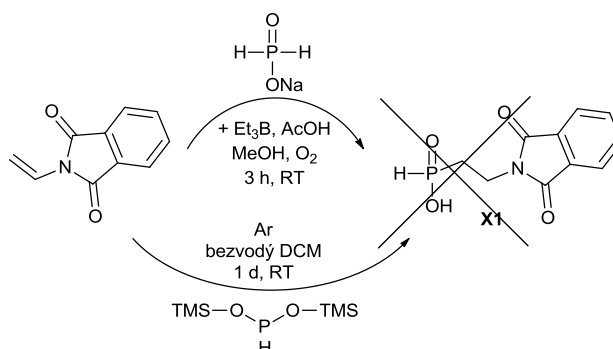
Po vytvorení ethyl esteru látky **3M1** reakciou s DCC a EtOH a alkylácii tejto zmesi s benzylbromidom boli pozorované obdobné hydrolytické reakcie (ethyl estery fosfínových kyselín sú hydrolyticky veľmi nestále).

Z pozorovaných reakcií vetvených alkylových substituentov (za atómom P) bolo usúdené, že možné produkty reakcií (látok $\text{L}^{2\text{M}}$ a $\text{L}^{3\text{M}}$) sú vysoko nestále, a preto boli reakčné schémata a ich variácie opustené.

4.1.5 Ligand s pendantnou dibenzylamino-1,2-ethylovou skupinou (L^E)

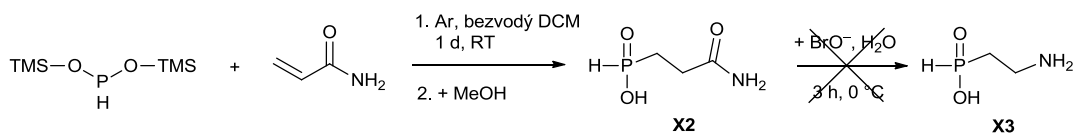


Jednoduchá syntéza látky **E4** nebola dosiaľ preskúmaná. Podľa literatúry (92) je jej možné intermediáty pripraviť katalyticky adíciou na derivát so skupinou *N*-vinyl pomocou katalyzátoru na báze Pd^0 . Inou reakčnou cestou boli alkylačné reakcie *N*-ethylhalogénu (často bromid) alebo adičné reakcie trojmocného P na *N*-vinyl derivát. Vzorová reakcia Arbuzovho a Michaelisovho typu sa nachádza v poznámke¹. Preskúmané reakcie (boli použité alkylačné činidlá 1-brom-2-(*N,N*-dibenzylamino)ethán a 1-brom-2-ftalimidoethán) nevedli k očakávaným výťažkom, ale k netriviálne čistiteľným zmesiam.

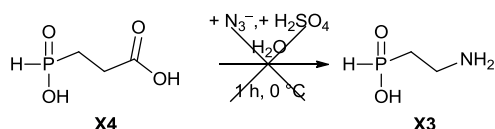


Neúspešne dopadla aj konjugovaná adícia bis(trimethylsilyl)fosfitu (P^{III}) na dvojnú väzbu vinylftalimidu. K nejasným príčinám nízkej (až nulovej) konverzie mohli prispieť nepriaznivé elektrónové pomery v *P*-ethyl derivátoch. Adičná reakcia dvojnej väzby vinylftalimidu s fosforanom sodným pomocou triethylboránu (viď ďalej u prípravy látky **P1**) v methanole mala pravdepodobne za následok prednostnú polymerizáciu vinylftalimidu pred adíciou (tvorba bieleho zákalu až prášku). Konjugovanou adíciou bola pripravená látka **X1** (reakcia akrylamidu bola takmer kvantitatívna a reakcia sčasti prebiehala i do druhého stupňa), ktorej skelet je o jeden „uhlík“ vo forme karbonylu dlhší.

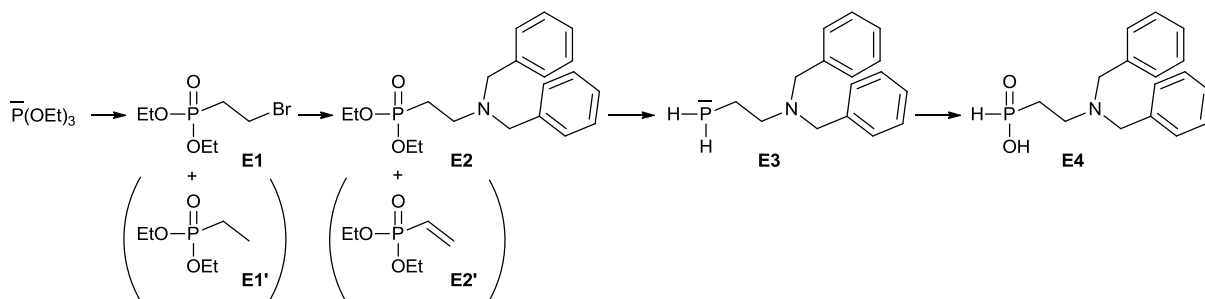
¹ Fosforan amónny bol v trojhrdlej banke sekurovanej aparatúry so spätným chladičom zmiešaný s 2,5 ekv. HMDS. Zmes bola zahrievaná na 105 °C počas 3 hodín v inertnej atmosfére. Následne bola zmes ochladená na RT a bol k nej pridaný bezvodý DCM. K miešanému roztoku bol injekciou pridaný roztok alkylačného činidla (1,1 ekv.) a DIPEA (1,1 ekv.) v bezvodom DCM alebo roztok látky s terminálnou dvojnou väzbou v bezvodom DCM. Po 1 dni miešania pri RT v inertnej atmosfére bol k zmesi injekčne pridaný MeOH (nadbytok) po kvapkách. Reakčná zmes bola následne zbavená rozpúšťadiel na RVO a ďalej čistená (často na iónomeničoch).



Odbúravanje Hofmannovho typu pomocou brómnanu (látka bola pripravená tesne pred použitím zmiešaním Br_2 a 5 ekv. vodného roztoku NaOH pri $0\text{ }^\circ\text{C}$) bolo neúspešné, i keď sa pri reakcii tvorili bublinky (pravdepodobne len ako výsledok miešania dvoch rôznych roztokov o rôznych teplotách). Dôkaz CO_2 pomocou tyčinky s vodným roztokom $\text{Ba}(\text{OH})_2$ bol negatívny. Odlišiť látky **X2** a **X3** pomocou ^1H - alebo ^{31}P -NMR bolo takmer nemožné a po štandardnom prídavku reagentu (látka **X2**) do NMR trubičky s reakčnou zmesou boli pozorované 2 signály dm v ^{31}P -NMR. Neskôr bolo zistené, že v zásobnom methanolicom roztoku látky **X2** (látka sa nepodarilo ztužiť) samovoľne pomaly prebieha jej esterifikácia – methyl ester látky má chemický posun ^{31}P odlišný len o pár jednotiek ppm. Zaujímavosťou je značná odolnosť P–H väzby v roztoku s BrO^- . Signál fosfónovej kyseliny (^{31}P -NMR) bol pozorovaný až po pridaní kyseliny do tohto roztoku (t.j. disproporcionácia brómnanu na Br_2 a BrO_3^-).



Odbúravanje Curtiusovho typu látky **X4** pomocou prídavku azidu sodného (premena na látku **X3**) taktiež dopadlo neúspešne. Podľa kontroly reakcie s metódou TLC reakcia látky **X4** vôbec neprebíhala. Po prídavku SOCl_2 (aktivovanie karboxylovej kyseliny) bola pozorovaná pravdepodobne oxidácia fosfínovej kyseliny na fosfónovú (detekcia s TLC).



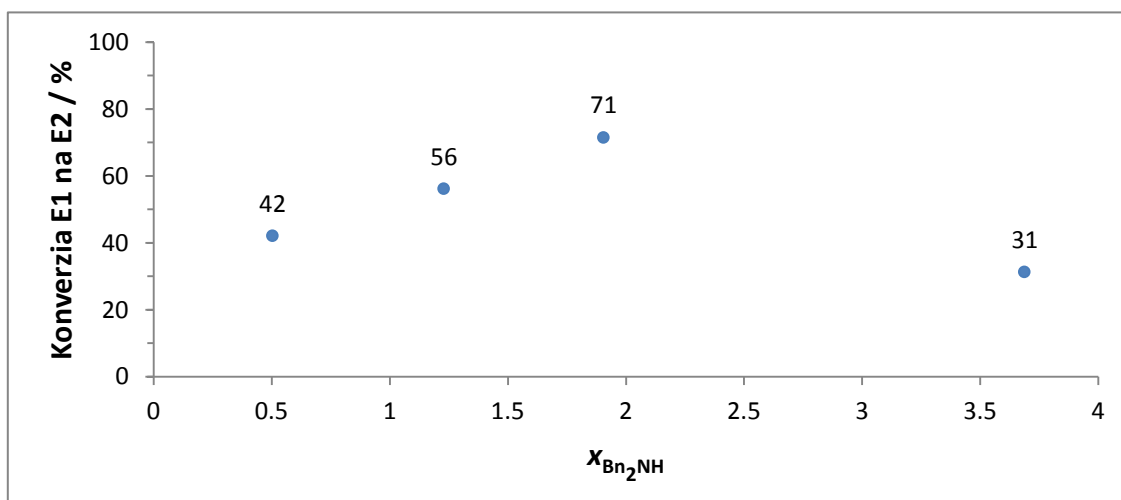
Po preštudovaní dostupnej literatúry ohľadom syntézy látok s fragmentom P– CH_2 – CH_2 –N boli získané chemické postupy na prípravu fosfónového derivátu (látka **E2** (88)) a jeho redukciu na fosfán **E3** s následnou oxidáciou na požadovanú látku **E4** (93). Prvý stupeň reakcie zahŕňal refluxujúcu (150 – $180\text{ }^\circ\text{C}$) bezrozpúšťadlovú zmes triethylfosfitu s nadbytkom 1,2-dibrómmethánu a čistenie destiláciou za zníženého tlaku. Reakčnú zmes sa tým podarilo vyčistiť len od reaktantov, ktoré boli regenerované, a frakcia s produktom obsahovala i nečistoty ako triethylfosfát a látku **E1'** (produkt bočnej reakcie), ktoré však v ďalšej reakcii neparticipovali a boli ľahšie odstrániteľné až po nej.

Zmes obsahujúca alkylačné činidlo (látka **E1**) bola použitá na alkyláciu dibenzylamínu. Po prvom pokuse bola získaná majoritne látka **E2'** – alkylačné činidlo ľahko eliminuje alfa vodík a vzniká *P*-vinyl derivát. Touto konkrétnou reakciou sa bolo zaoberané dôkladnejšie (zmenou rozpúšťadla reakcie, použitej bázy, teploty, katalyzátoru a i.) a niektoré pozorované výsledky sú uvedené v tabuľke 11 a na obrázku 35 (reakcia premeny **E1** na **E2**).

Tabuľka 11

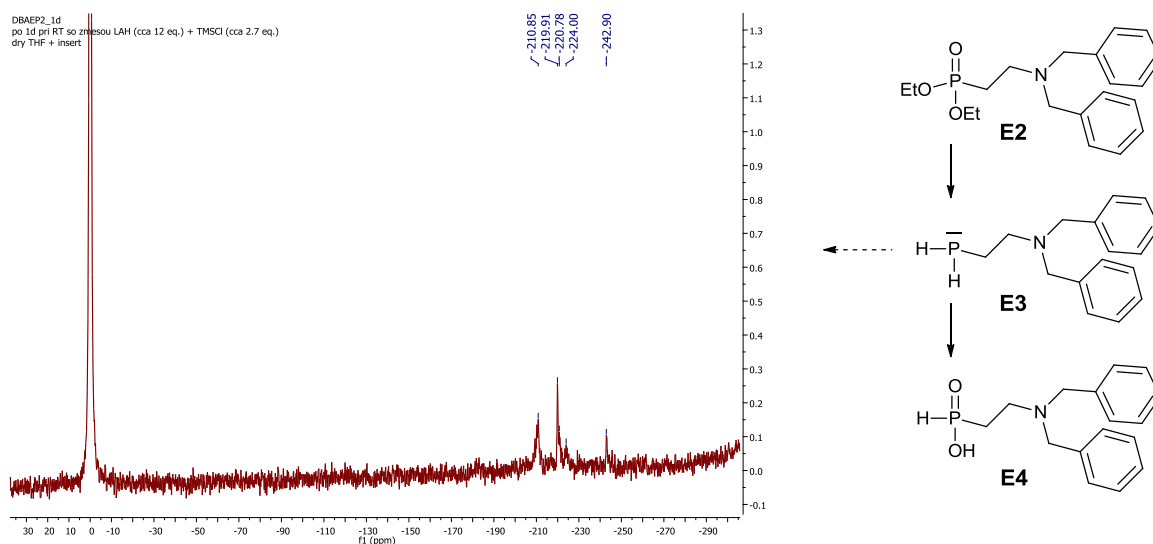
Podmienky reakcie: 1,25 ekv. E1, + 3 ekv. báze, rozpúšťadlo, 1 d, 60 °C

Báza	Vínyl (E2')	Dibenzyl (E2)	Rozpúšťadlo	Poznámka
Li ₂ CO ₃	55	45	Bezvodý ACN	
K ₂ CO ₃	70	30	Bezvodý ACN	
KHCO ₃	70	30	Bezvodý ACN	
CaCO ₃	50	50	Bezvodý ACN	pomalá reakcia
MgCO ₃	90	10	Bezvodý ACN	
Pyridín	–	–	Bezvodý ACN	deesterifikácia
DIPEA	95	5	Bezvodý ACN	
AcONa	45	55	Bezvodý ACN	
Citrát sodný	40	60	Bezvodý ACN	pomalá reakcia
MeONa	70	30	Bezvodý ACN	
–	45	55	Bezvodý ACN	bez prídavku báze
AcONa	100	0	DMF	
AcONa	–	–	EtOH	nový signál
AcONa	–	–	abs. EtOH	nový signál
AcONa	0	0	AcOH	nereaguje
AcONa	33	66	TOL	pomalá reakcia
Li ₂ CO ₃	55	45	TOL	prídavok Bu ₄ N ⁺ Br ⁻
K ₂ CO ₃	90	10	TOL	prídavok Bu ₄ N ⁺ Br ⁻



Obrázok 35 – premena látky **E1** na **E2**, podmienky reakcie: + 1,3 ekv. K₂CO₃, TOL, 1 d, 120 °C

Najvyššia konverzia reakcie bola dosiahnutá 71% s prídavkom nadbytočného dibenzylamínu (približne 2 ekv. k reaktantu **E1**, obrázok 35). Zvyšný dibenzylamín bol transformovaný na amid acylovým činidlom (benzoyl chloridom) a tým bolo dosiahnuté, že zmes obsahovala iba jeden amín – požadovanú látku **E2**. Čistenie reakčnej zmesi bez hydrolyzy ethyl esterov látok bolo skúsené i rýchlou extrakčnou metódou. Purifikácia zmesi extrakciami z/do CHCl_3 alebo Et_2O (výhodnejšie) do/z vodného roztoku HCl alebo NaOH (prekvapivo, ethyl estery látok neboli takmer vôbec hydrolyzované) nebolo selektívne a prímеси prechádzali i do vodných roztokov. Problém izolácie bol vyriešený vyrážaním amínu plynným chlorovodíkom v bezvodom Et_2O pomocou bublačky (izolácia je náchylná na vzdušnú vlhkosť – stopy vody majú za následok rozpustenie hydrochloridu amínu) a neskôr bola optimalizovaná prevedením amínu na hydrochlorid pomocou bezvodého $\text{ROH} \cdot \text{HCl}$ a zrážaním odparku v Et_2O . Monokryštál látky bol získaný cez noc zrážaním parami Et_2O z roztoku látky **E2** · HCl v chloroforme (prvé organické rozpúšťadlo, v ktorom bola táto látka rozpustná).



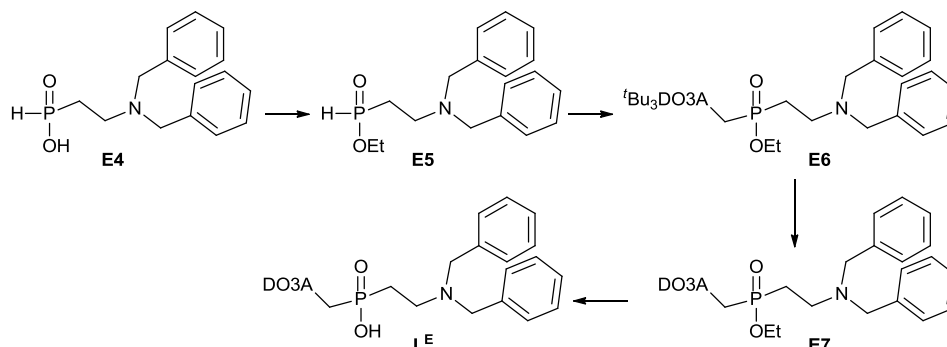
Obrázok 36 – ^{31}P -NMR spektrum látky **E3** *in situ* s externým inzertom

Po získaní látky **E2** vo forme voľnej báze extrakčnou metódou (rozpuštením vo vode, pridaním NaOH do docielenia $\text{pH} > 10$ a extrakciou do Et_2O) bola látka **E2** redukovaná pomocou zmesi $\text{LAH} + \text{TMSCl}$ (pravdepodobne *in situ* vzniká Me_3SiH) podľa obmeneného návodu v literatúre (93). Úspešná redukcia bola zachytená na ^{31}P -NMR spektre (obrázok 36) a stopy fosfánu boli ľahko detekovateľné zápachom. Po hydrolyze zvyškov LAH bol fosfán oxidovaný troma spôsobmi – prídavkom jódu, brómnanu alebo peroxidu. Všetky typy oxidácie viedli k fosfínovej kyseline (čisto prebiehajúce reakcie podľa ^{31}P -NMR). Vymenované činidlá sú uvedené podľa rýchlosti konverzie látky **E3** na **E4**. Pri použití nadbytku peroxidu vodíku (5 ekv.) bola reakcia ukončená do 6 hodín.

Problémom bolo následné odstránenie hydroxidu hlinitého, ktorý zanašal všetky dutiny použitej stacionárnej fázy (SiO_2 , Al_2O_3) využitej na filtráciu. Filtrácia cez vatú bola neúčinná. Jemná suspenzia bola nakoniec odstredená v centrifúge, no pevná fáza obsahovala množstvo adsorbovaného produktu (cca 70 % látky **E4**). Rozpuštením supernatantu v HCl , odparením rozpúšťadiel pomocou RVO a čistením na kolóne s Dowex 50 bola látka **E4** získaná

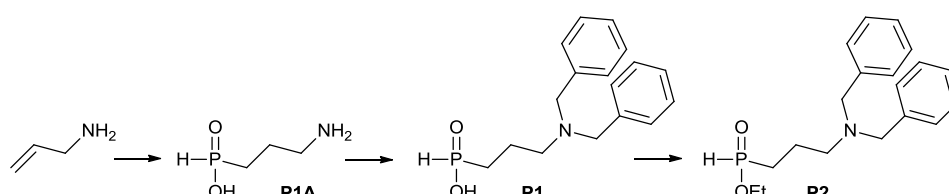
vo forme oleja. Získanie látky v pevnom stave nebolo úspešné (boli použité rôzne druhy zrážania). Najslubnejším sa javilo zrážanie látky v THF roztoku za chladenia suchým ľadom.

Vhodný monokryštál na röntgenoštruktúrnu analýzu bol napokon získaný. Najprv boli pripravené len veľmi jemné XRD nemerateľné ihličky lithnej soli látky **E4**, ktoré boli získané z vodného roztoku (pH alkalizované s LiOH) difúziou pár Me₂CO. Neskôr boli pripravené monokryštály pozvoľným odparom vodného roztoku zmesi látky **E4** s rozpusteným hydrochloridom adamantylamínu (cca 2–3 ekv.), tieto monokryštaly boli vhodné na XRD analýzu.



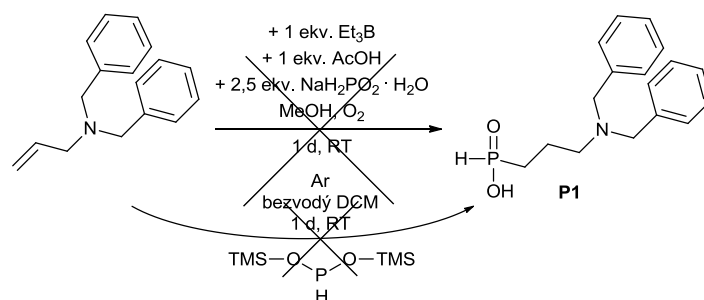
Následná adícia fosfínovej kyseliny na makrocyklus prebiehala bez problémov (esterifikácia, reakcia Mannichovho typu v bezvodom pyridíne, eliminácia ^tBu esterov s TFA, hydrolyza ethyl esteru). Ethyl ester látky **E7** bol hydrolyzovaný až vo vodnom roztoku KOH pri zahrievaní na 40 °C (vodný roztok pyridínu alebo NH₃ nemali pozorovateľný účinok ani po zahriatí). Pripravením látky **L^E** v pevnom stave z ethanolického roztoku pomocou 1,4-dioxánu a následnou filtráciou zrazeniny bol pripravený biely prášok vhodnej čistoty na potenciometrickú titračnú analýzu.

4.1.6 Ligand s pendantnou dibenzylamino-1,3-propylovou skupinou (**L^P**)



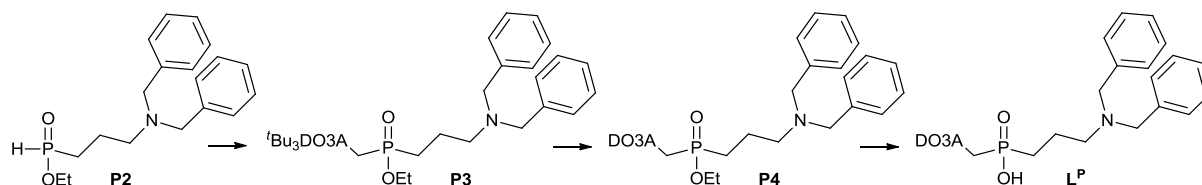
Syntéza *P*-(*n*-propylamínu) vychádzala z publikácie – radikálovou adíciou dvojnej väzby allylamínu na fosfornan sodný v MeOH pomocou triethylboránu (89). Dôležitým faktorom reakcie je prísun kyslíku, t.j. otvorená reakčná nádoba. Konverzia reakcie bez prídavku 1 ekv. AcOH bola takmer polovičná, no s prítomnosťou kyseliny octovej vznikol aj disubstituovaný derivát odvodený od látky **P1A** (rádovo %).

Bez čistenia reakčnej zmesi chromatograficky na kolóne s Dowex 50 (t.j. bez odstránenia nadbytočného fosfornanu) ďalšia reakcia, alkylácia amínu benzylbromidom, neprebíhala ideálne. Konverzia nebola úplná a zmes sa musela dlhšiu dobu (cca 7 dní) zahrievať na 50 °C a reaktanty bolo nutné rozpustiť vo vodných roztokoch organických rozpúšťadiel (1,4-dioxán, ACN a pod.) kvôli ich forme sodných solí. S prečistenou látkou **P1A** pomocou kolóny s Dowex 50 bol spomenutý problém odstránený, no alkylácia benzylbromidom nebola kvantitatívna (cca 95 % podľa ³¹P-NMR).



Alternatívne bola látka **P1** skúsená vyrobiť konjugovanou adíciou fosforného prekursoru na allyldibenzylamín (pripravený jednoduchou reakciou allylamínu s benzylbromidom v bezvodom ACN s prídavkom 2,2 ekv. potaše; po 3 hodinách miešania pri RT filtrácia zmesi; prídavok 0,5 ekv. vodného roztoku dimethylamínu a odstránenie rozpúšťadiel na RVO; tým bola získaná zmes allyldibenzylamínu s benzyldimethylamínom), no konverzia reakcie bola do 10 %. Radikálovou adíciou allyldibenzylamínu na fosfornan sodný pri už spomenutých podmienkach reakcie bola získaná bohatá zmes. Podľa prítomných signálov dm v ^{31}P -NMR spektrách zmes obsahovala aj $(\text{Bn}_x\text{H}_{2-x})$ aminopropylfosfínové kyseliny ($x = 0, 1$ a 2).

Pre vysokú hodnotu pK_A amínu látky **P1** bolo čistenie reakčnej zmesi na kolóne s Dowex 50 odlišné od ostatných pripravovaných fosfínových kyselín. Produkt bol len čiastočne eluovaný s 10% vodným roztokom pyridínu (paradoxne takmer ekvivalentne s množstvom prítomného monobenzyl derivátu) a prekvapivo s použitím konc. $\text{NH}_3 : \text{EtOH} = 1 : 1$ bol eluovaný až s oneskorením (pravdepodobne sú prítomné silné hydrofóbne interakcie látky **P1** s nosičom iónomeniča). Nakoniec bola látka **P1** získaná vo forme oleja (pokusy o prípravu látky v pevnom stave zrážaním z roztokov dopadli neúspešne).



Následné naviazanie látky **P1** na makrocyclus prebiehalo obdobným postupom ako u ostatných popísaných prípravach. Hydrolyza ethyl esteru látky **P4** vyžadovala až silné zahrievanie ($80\text{ }^\circ\text{C}$) vo vodnom roztoku KOH, čo malo za následok čiastočnú degradáciu produktu. Avšak látka **L^P** bola získaná s dostatočnou čistotou (60 % podľa ^{31}P -NMR) pre NMR titračný experiment (pravdepodobnou prímiesou bol fosfónový derivát odvodený od látky **P1**).

Pokusy o zmenu ethyl esteru fosfínovej kyseliny (látka **P2**) za methyl ester (t.j. výmena reaktantu, resp. rozpúšťadla, abs. EtOH za bezvodý MeOH) boli menej úspešné – konverzia esterifikácie dosiahla maximálne ~ 60 %.

4.2 Stanovenie hodnôt pK_A NMR titráciou a potenciometricky

NMR spektrá s variabilnou hodnotou pH boli sfázované a referencované na externý štandard ($t\text{BuOH}$). Z priebehu signálov skupín, ktoré boli jednoznačné počas celého priebehu titrácie, boli vypočítané hodnoty pK_A programom OPIUM. Prehľad chemických posunov signálov od ligandov L^M , L^A , L^E a L^P závislých na hodnote pH a ich preloženie teoretickou krivkou sú znázornené na obrázkoch 37–41. Ďalej neuvedené chyby sú rádovo stotiny hodnoty pK_A .

Z potenciometrických meraní ligandov boli zistené protonizačné konštanty pK_P (a tým i disociačné pK_A , $K_A = K_P^{-1}$) a ďalej boli spočítané distribučné diagramy rôzne protonizovaných foriem látok L^M , L^A a L^E (látka L^P nebola pripravená v dostatočnom množstve a čistote pre potenciometrickú analýzu). Hodnoty pK_A získané z NMR titračných experimentov a potenciometrických meraní sú porovnané pre jednotlivé ligandy v tabuľkách 12–15. Údaje pK_A získané oboma metódami sú vo veľmi dobre zhode až na najvyššiu hodnotu pK_A , ktorá patrí makrocyclickým amínom (zdieľaný protón amino skupín v kavite makrocyclu). Toto cielené zníženie bolo dosiahnuté použitím LiOH ako báze (Li^+ je komplexovaný ligandom). Zámenou báze LiOH za CsOH bola táto hodnota pK_A porovnateľná so získanou hodnotou z potenciometrických meraní. Hodnoty pK_A látky L^A neboli jednoznačne priradené ku konkrétnym protonizovaným miestam z vyhodnotenia NMR titrácie s použitím LiOH (2 hodnoty pK_A makrocyclických a 1 hodnota pendantnej amino skupiny), a preto je ďalej uvedené aj vyhodnotenie NMR titrácie s použitím CsOH (obrázok 41).

Predĺžením pendatného ramena ligandu L^M bolo docielené zvýšenie hodnoty pK_A pendantnej amino skupiny. Avšak očakávaná zmena hodnoty, ktorá je patrná predĺžením pendantu ligandu L^E , t.j. vytvorenie ligandu L^P ($\Delta pK_A \sim 0,3$), nebola naplnená. Výrazný rozdiel týchto hodnôt $pK_A(L^M)$ a $pK_A(L^E)$, $\Delta pK_A \sim 1,4$, môže byť zapríčinený vzdialením (izoláciou) skupiny NBn_2 ligandu L^E , a tým je indukčný efekt fosfínovej kyseliny (fragment $-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)-$) minimalizovaný. Ligand L^E má hodnotu pK_A danej skupiny porovnateľnú s alifatickými amínmi, pretože daná amino skupina nie je ovplyvňovaná inou skupinou. U hodnoty pK_A danej skupiny ligandu L^P sa už prejavuje len indukčný efekt 1,3-propylénu.

Hodnoty druhých pK_A ($\sim 9,1$) makrocyclických dusíkov (pravdepodobne pre susedné atómy N voči pendantu) ligandov L^M , L^E a L^P sú si podobné pre podobnosť pendatných skupín (zhodný indukčný efekt). Najvyššia hodnota pK_A ligandu L^E (a pravdepodobne i ligandu L^P) koreluje s nárastom hodnoty pK_A pendantnej amino skupiny (pre spomínaný indukčný efekt a izoláciu skupín od seba).

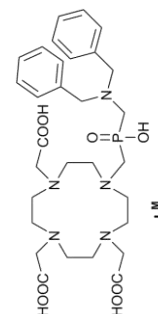
Zmenou dĺžky pendatného ramena u látok L^M , L^E a L^P je ovplyvnená hodnota pK_A výlučne pendatného amínu a na zvyšné veľkosti pK_A makrocyclickej časti nemá veľký vplyv (diferencia je rádovo desatiny). To je výsledkom zhodnej interakcie pendatného ramena ligandov s určitými skupinami na makrocycle a dá sa predpokladať, že jednotlivé

postupne protonizované formy ligandov L^M , L^E a L^P (H_6L^{2+} až L^{4-}) sú zhodné (konkrétne miesto protonizácie). Návrh štruktúr, resp. miest postupnej protonizácie, bol publikovaný v bakalárskej práci (87).

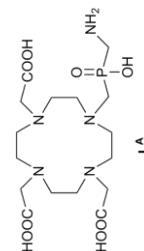
Naproti tomu hodnoty pK_A ligandu L^A sú najviac odlišné od ostatných. To môže byť spôsobené stericou nenáročnosťou a flexibilitou pendantného amínu, ktorý je schopný preferovať výhodnú elektrostatickú interakciu so susedným karboxylátom. Tým je hodnota pK_A susedného karboxylátu ligandu L^A nižšia o pár desatín než u ligandov L^M , L^E a L^P (hodnota pK_A karboxylátu patrí nie susednému, ale protiľahlému voči pendantnej skupine). Bazicita makrocyklu (súčet $pK_{A1} + pK_{A2}$) ostáva zachovaná ($\sim 21,3$) pre ligandy L^M a L^A a hodnota mierne narastá s predlžujúcim sa pendantom (ligandy L^E a L^P).

Tabuľka 12–15

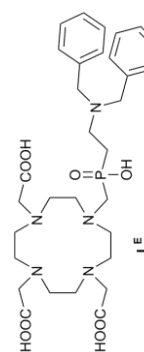
Potenciometria L ^M		NMR titrácia L ^M		
pK _A	pK _A (Li ⁺)	pK _A (Cs ⁺)	Miesto protonizácie	
1,53	1,6	1,6	makrocyklus/karboxylát	
2,40	2,6	–	makrocyklus/karboxylát	
4,32	4,2	4,1	karboxylát	
6,75	6,9	6,3	pendantný amín	
9,15	9,3	9,1	makrocyklus	
12,15	9,4	12,0	makrocyklus	



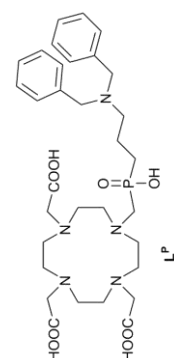
Potenciometria L ^A		NMR titrácia L ^A		
pK _A	pK _A (Li ⁺)	pK _A (Cs ⁺)	Miesto protonizácie	
–	–	0,6	makrocyklus/karboxylát	
1,92	1,4	1,4	makrocyklus/karboxylát	
4,06	4,1	4,0	karboxylát	
8,42	8,6	8,3	makrocyklus	
9,53	9,4	9,4	pendantný amín	
12,86	10,0	13,0	makrocyklus	

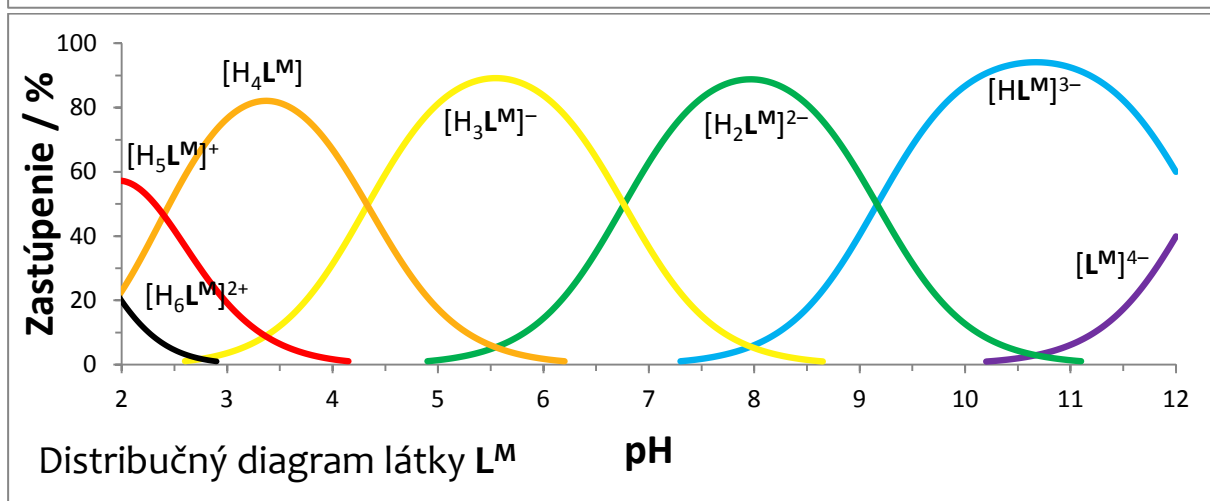
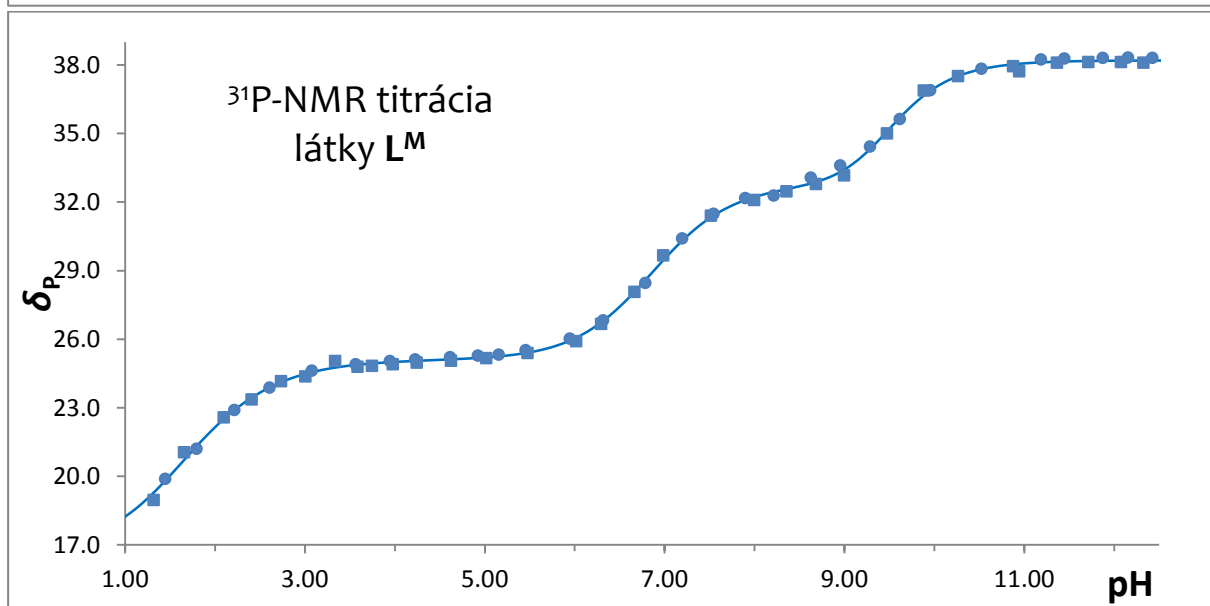
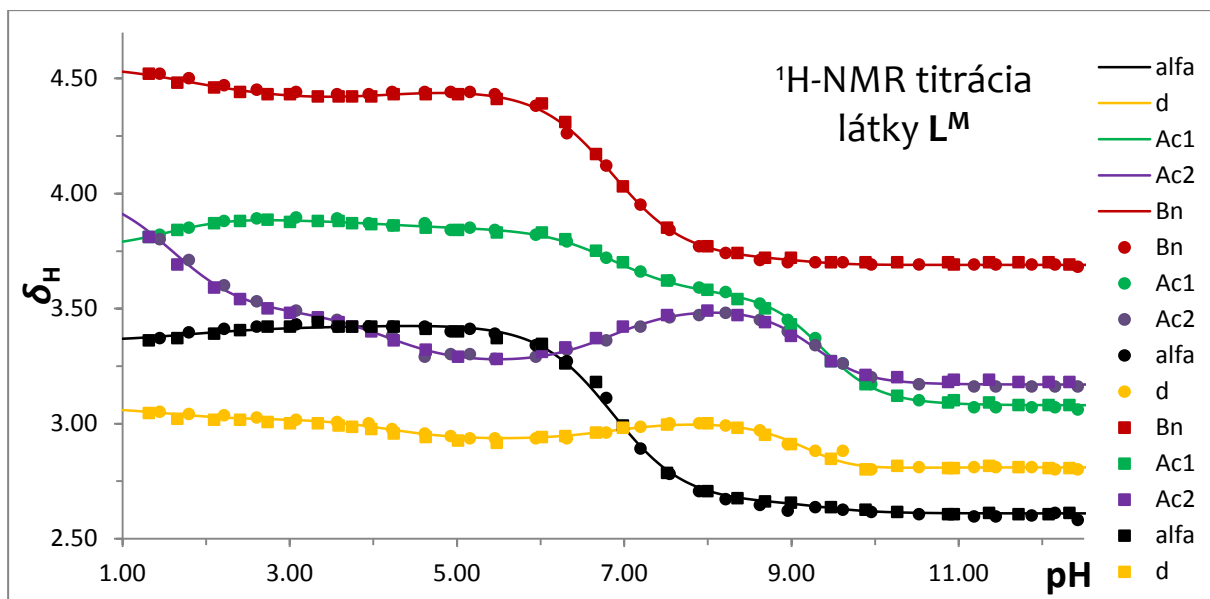


Potenciometria L ^E		NMR titrácia L ^E		
pK _A	pK _A (Li ⁺)	pK _A (Cs ⁺)	Miesto protonizácie	
1,61	1,8	1,5	makrocyklus/karboxylát	
2,59	2,3	2,3	makrocyklus/karboxylát	
4,33	4,2	4,3	karboxylát	
8,09	8,1	7,9	pendantný amín	
9,16	9,2	9,1	makrocyklus	
12,49	9,3	12,2	makrocyklus	

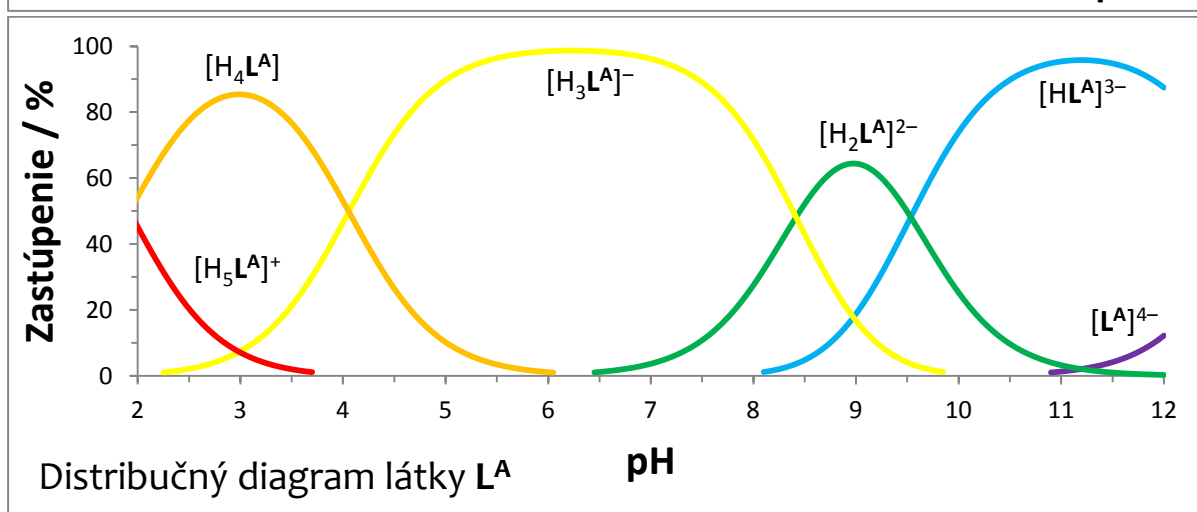
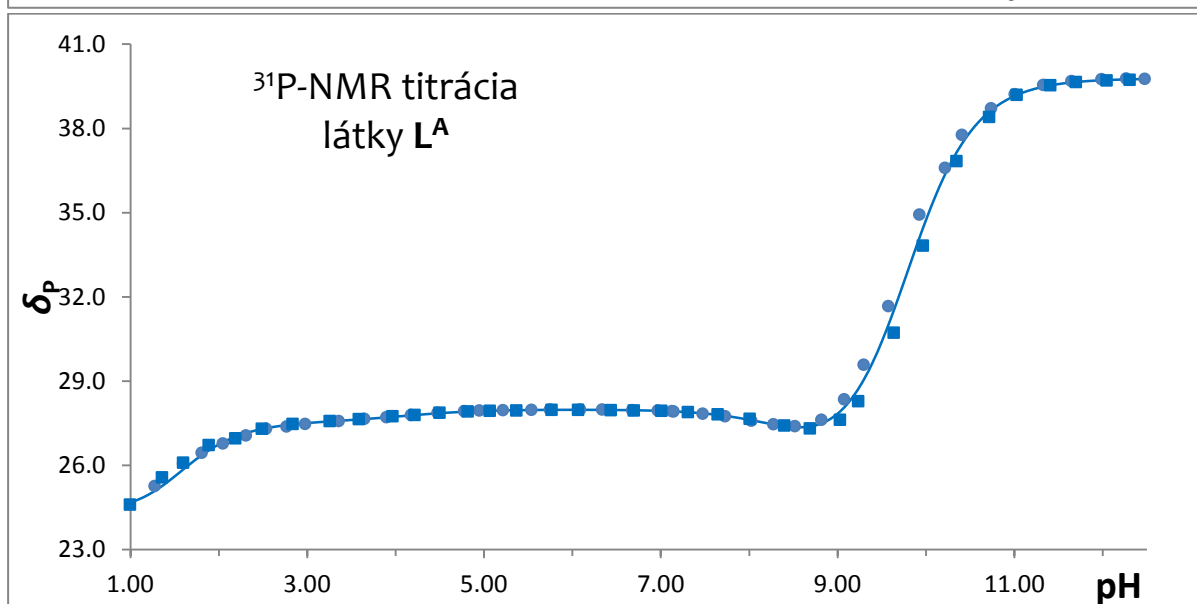
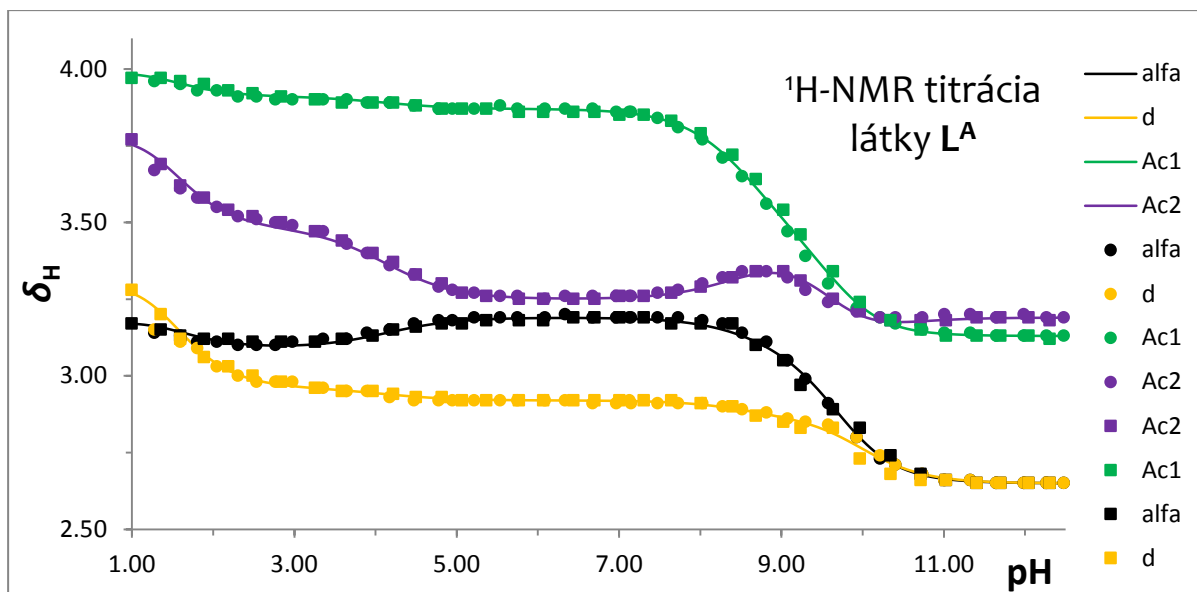


Potenciometria L ^P		NMR titrácia L ^P		
pK _A	pK _A (Li ⁺)	pK _A (Cs ⁺)	Miesto protonizácie	
–	1,6	0,5	makrocyklus/karboxylát	
–	2,6	2,3	makrocyklus/karboxylát	
–	4,4	4,6	karboxylát	
–	8,4	8,2	pendantný amín	
–	8,9	9,2	makrocyklus	
–	9,1	11,8	makrocyklus	

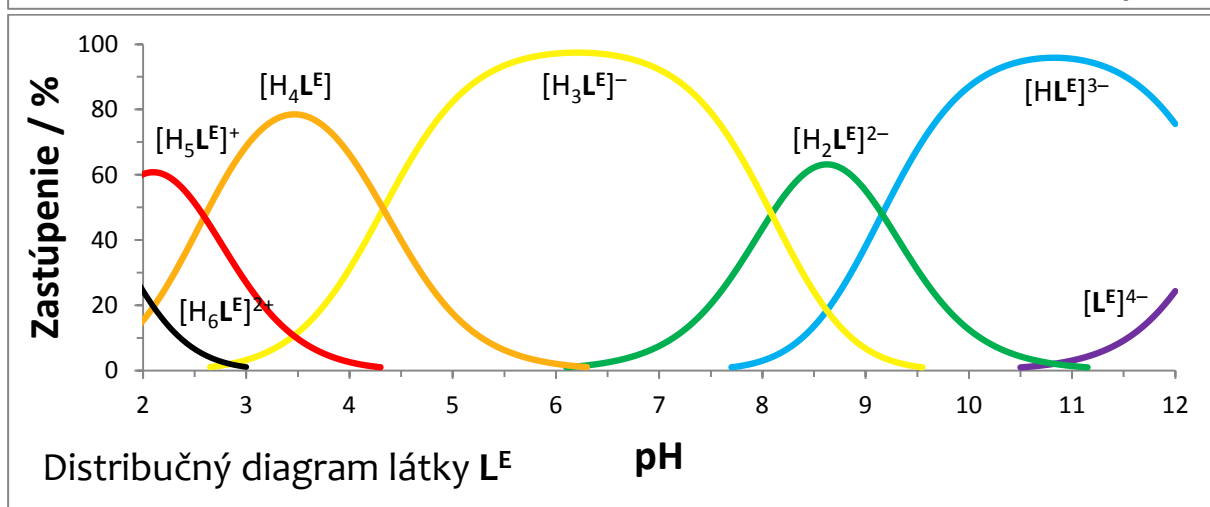
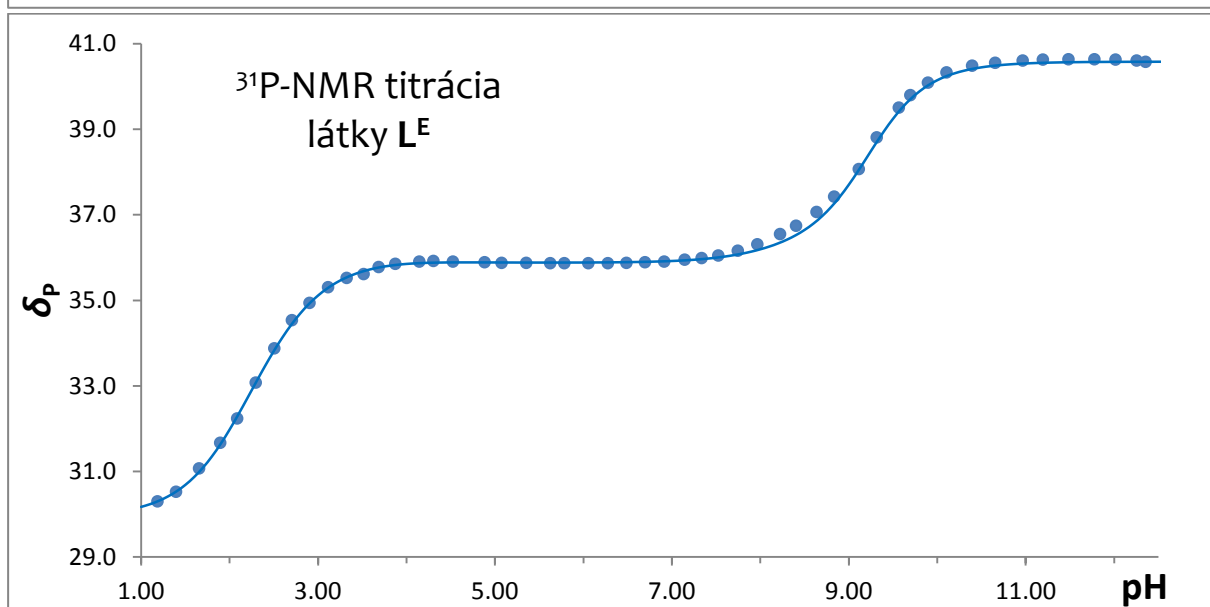
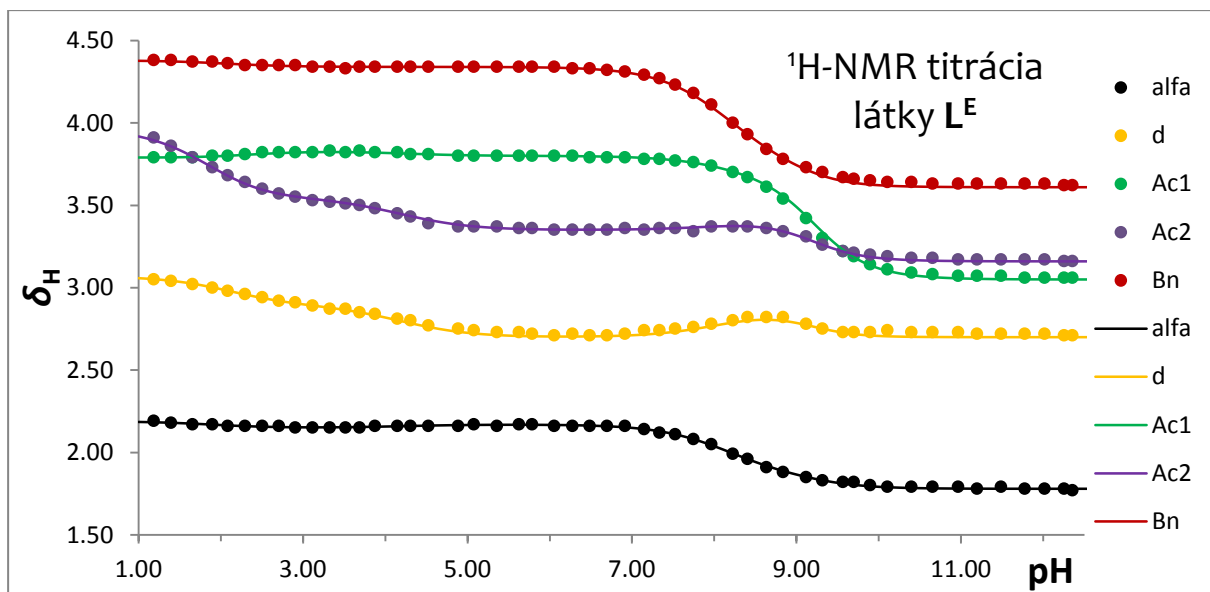




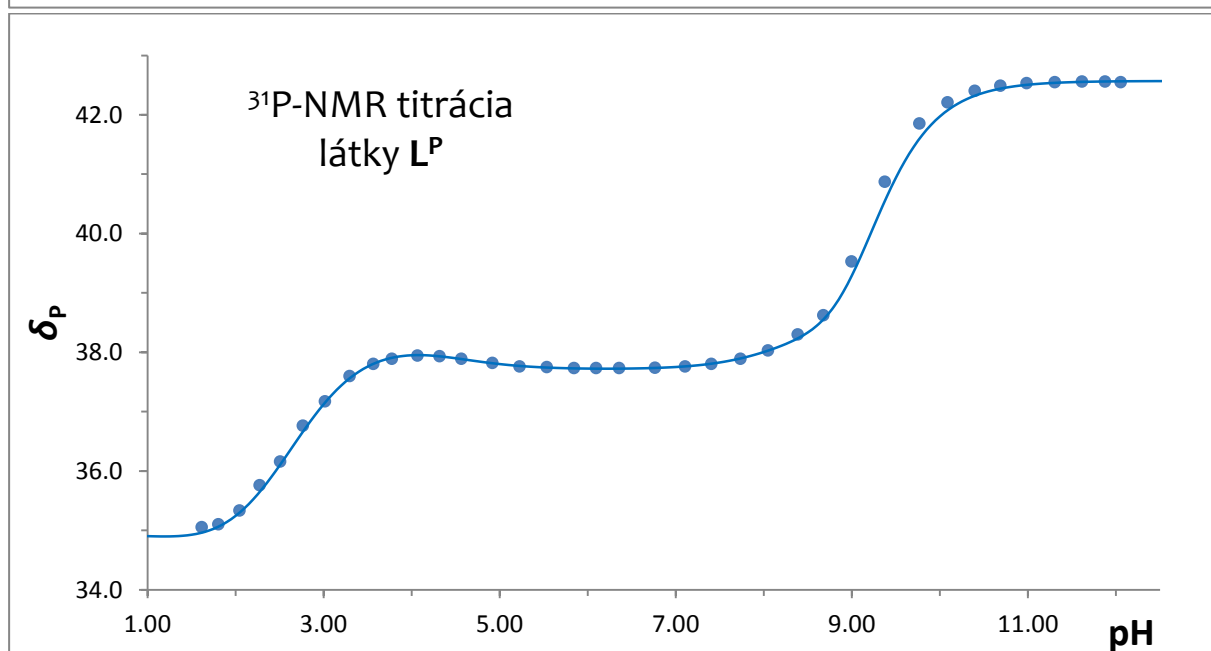
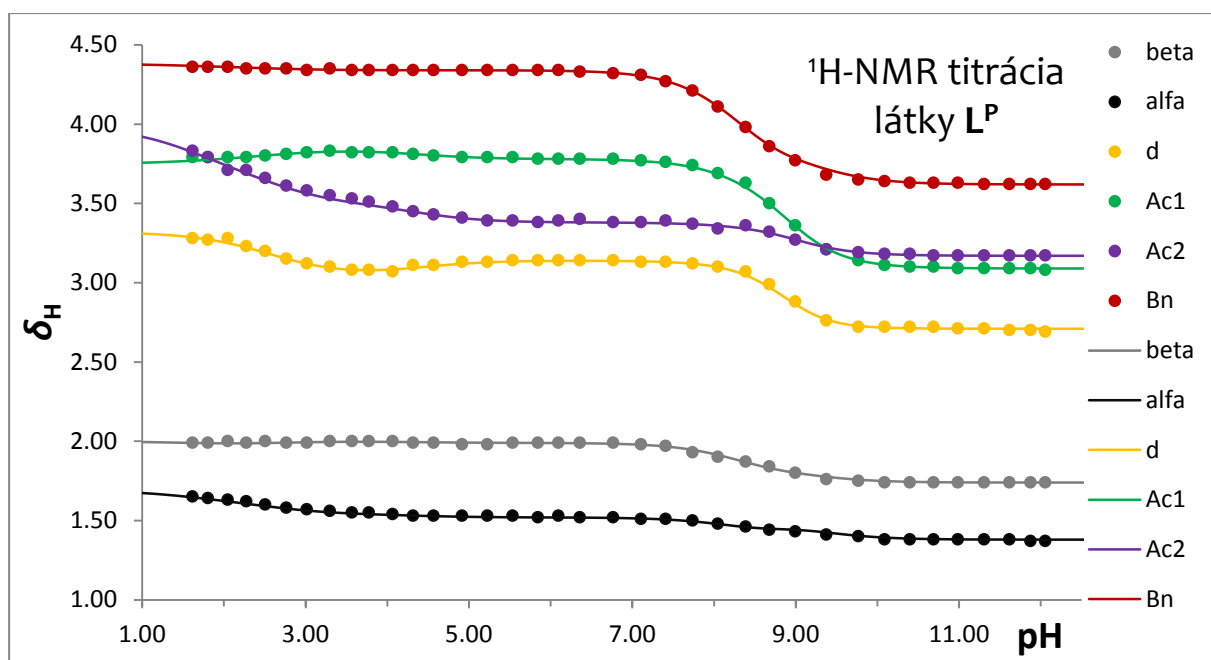
Obrázok 37 – priebeh pH závislostí posunu ¹H- (hore) a ³¹P-NMR (stred) signálov látky L^M pri použití LiOH ako titračného činidla, krivky boli vypočítané programom OPIUM; distribučný diagram bol vypočítaný z potenciometrických údajov látky L^M (dolu)



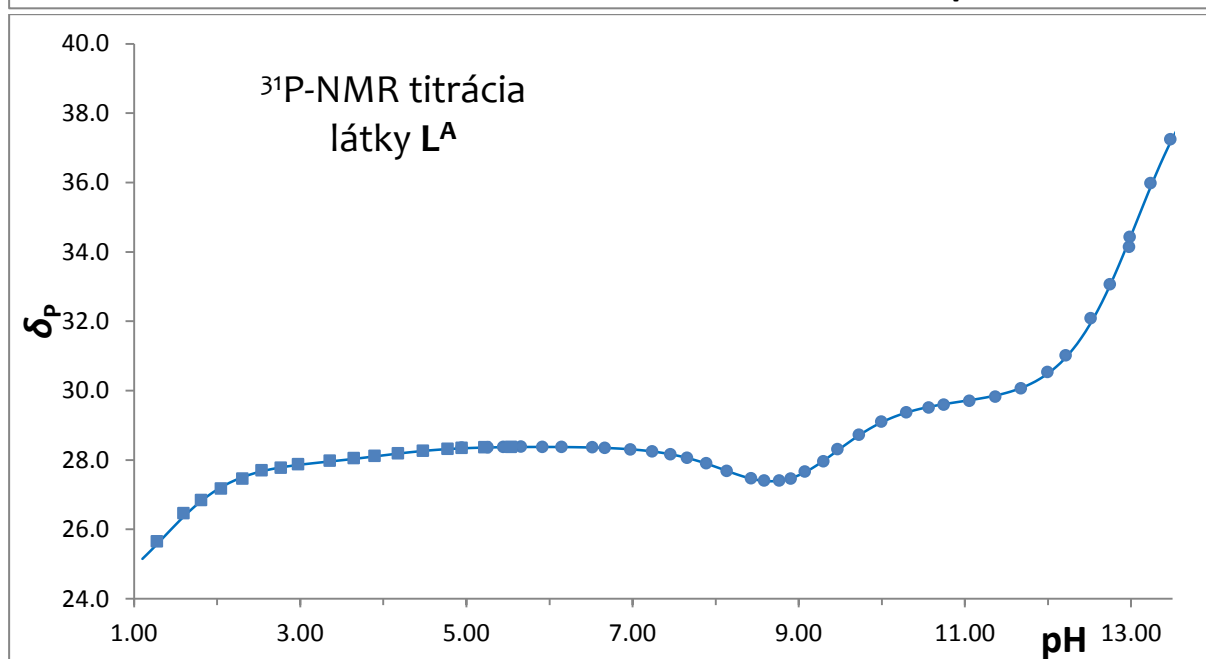
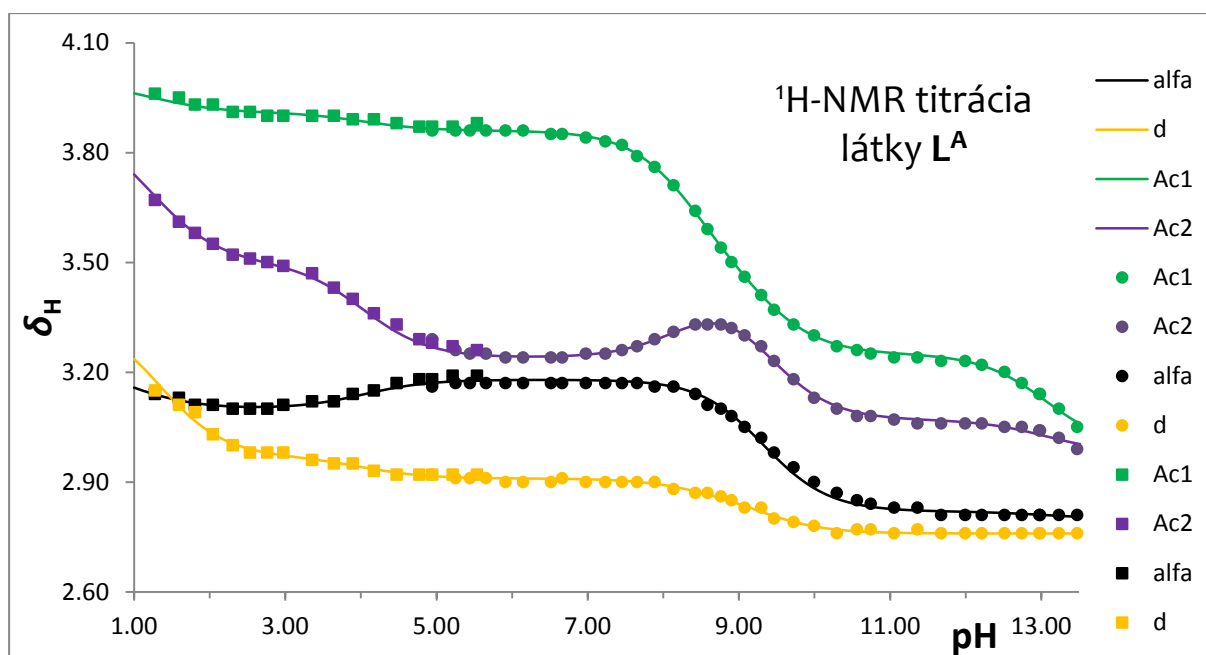
Obrázok 38 – priebeh pH závislostí posunu ^1H - (hore) a ^{31}P -NMR (stred) signálov látky L^{A} pri použití LiOH ako titračného činidla, krivky boli vypočítané programom OPIUM; distribučný diagram bol vypočítaný z potenciometrických údajov látky L^{A} (dolu)



Obrázok 39 – priebeh pH závislostí posunu ¹H- (hore) a ³¹P-NMR (stred) signálov látky L^E pri použití LiOH ako titračného činidla, krivky boli vypočítané programom OPIUM; distribučný diagram bol vypočítaný z potenciometrických údajov látky L^E (dolu)



Obrázok 40 – priebeh pH závislostí posunu ¹H- (hore) a ³¹P-NMR (dolu) signálov látky L^P pri použití LiOH ako titračného činidla, krivky boli vypočítané programom OPIUM



Obrázok 41 – priebeh pH závislostí posunu ¹H- (hore) a ³¹P-NMR (dolu) signálov látky L^A pri použití CsOH ako titračného činidla, krivky boli vypočítané programom OPIUM

Od ligandu L^M boli potenciometricky vyhodnotené i „out-of-cell“ titrácie s biogénnymi kationmi Zn^{2+} a Cu^{2+} v pomere $L^M : M^{2+} = 1 : 1$ a $L^M : M^{2+} = 1 : 2$ a s kationom Gd^{3+} (pomer 1 : 1).

Analýza dát ukázala, že ochota tvorby komplexu 1 : 2 je nízka (nízke zastúpenie, nízka hodnota konsekutívnej konštanty, veľké chyby a pod.). Cu^{2+} a Zn^{2+} ako centrálné atómy preferujúce stredne tvrdé donorové atómy, akými sú amíny, nemajú príliš veľké opodstatnenie pre tvorbu komplexov 1 : 2 s cyklénovým derivátom – bola by nutná koordinácia dvoch dvojíc makrocyclických amínov k jednotlivým M^{2+} . Navyše, vďaka makrocyclickému efektu je uprednostnený komplex 1 : 1 (makrocyclicklus ku M^{2+}).

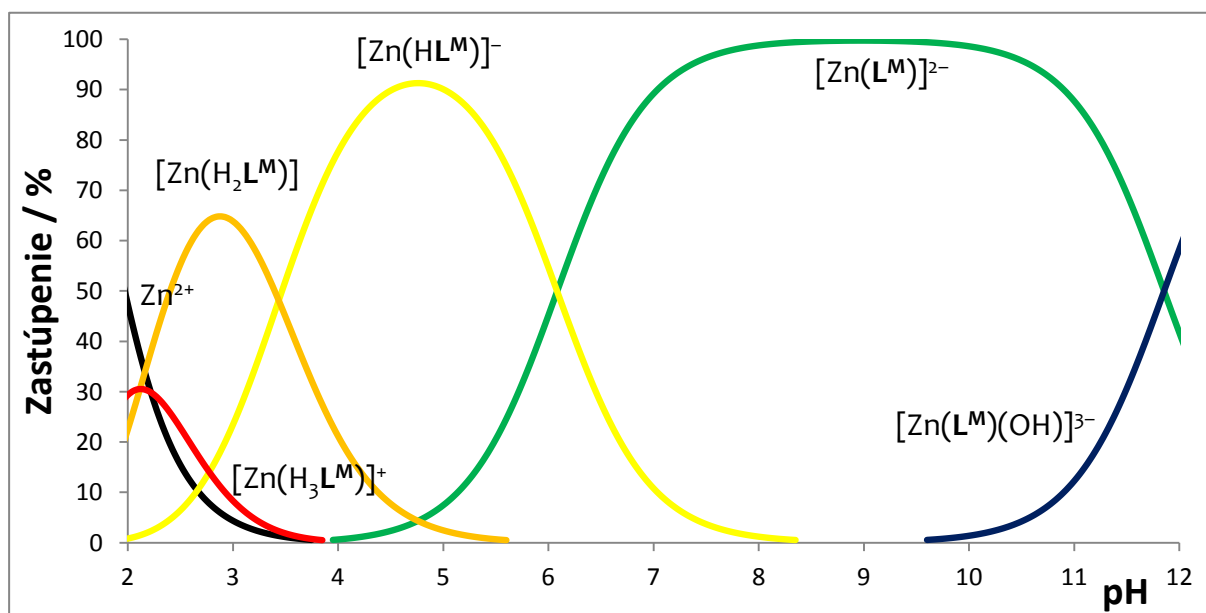
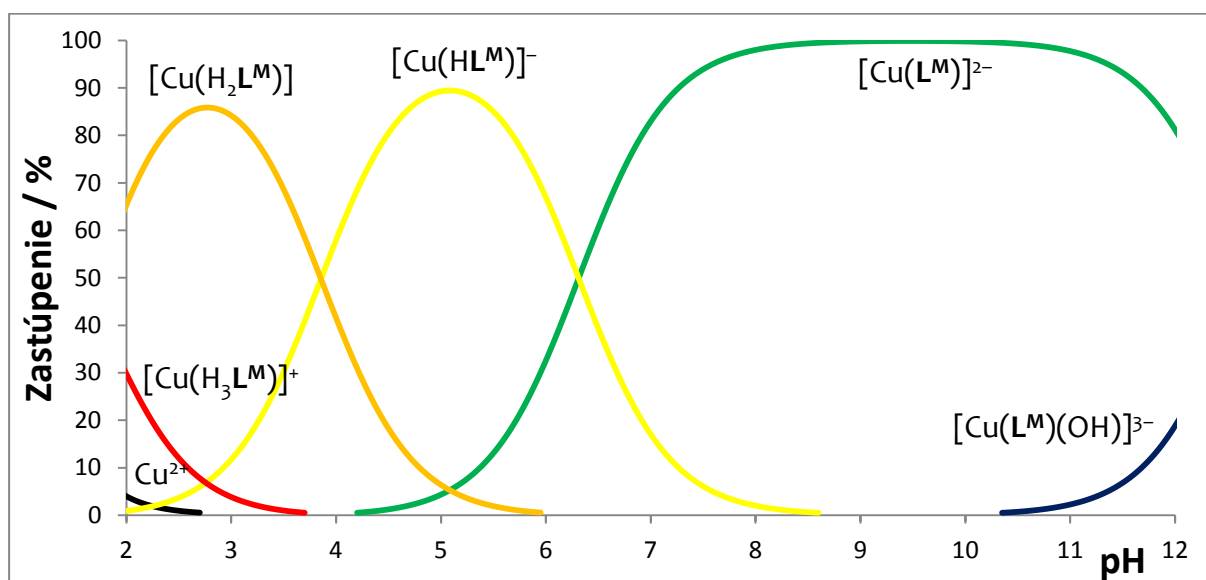
Preto boli do úvahy brané len rôzne protonizované formy komplexu spomínaných M^{2+} s L^M v pomere 1 : 1. Konštanty stability komplexov odpovedajú $\log K(Cu-L^M) = 23,92(6)$ a $\log K(Zn-L^M) = 21,96(1)$ a tieto hodnoty sú podobné s konštantami stabilit komplexov M^{2+} s makrocyclickými ligandmi (vid' tabuľka 4). Ďalej vypočítané hodnoty pK_A sú uvedené v tabuľkách 16 a 17 a distribučné diagramy týchto častíc sú zobrazené na obrázku 41. Z hodnôt je patrná absencia koordinácie pendantného amínu (už i pre sterické problémy), ktorého hodnota pK_A je len o 0,5–0,8 nižšia oproti voľnému ligandu L^M (táto malá zmena je spôsobená zmenou veľkosti indukčného efektu pravdepodobne koordinovaného fosfinátu). Pravdepodobná štruktúra komplexov $Cu-L^M$ a $Zn-L^M$ odpovedá koordinácii štyroch makrocyclických amínov k centrálnemu atómu. Ku koordináčnemu vysýteniu centrálnemu atómu je pravdepodobná koordinácia ďalších dvoch donorových atómov (pravdepodobne fosfinát a karboxylát alebo dva karboxyláty).

Tabuľka 16

pK_A (Cu-L ^M)	Miesto protonizácie Cu-L ^M
1,66(7)	karboxylát / makrocyklus
3,85(6)	karboxylát
6,31(6)	pendantný amín
12,64(6)	hydroxočastica

Tabuľka 17

pK_A (Zn-L ^M)	Miesto protonizácie Zn-L ^M
2,12(1)	karboxylát / makrocyklus
3,44(1)	karboxylát
6,08(1)	pendantný amín
11,85(1)	hydroxočastica

Obrázok 42 – distribučný diagram látky Cu-L^M (hore) a látky Zn-L^M (dolu)

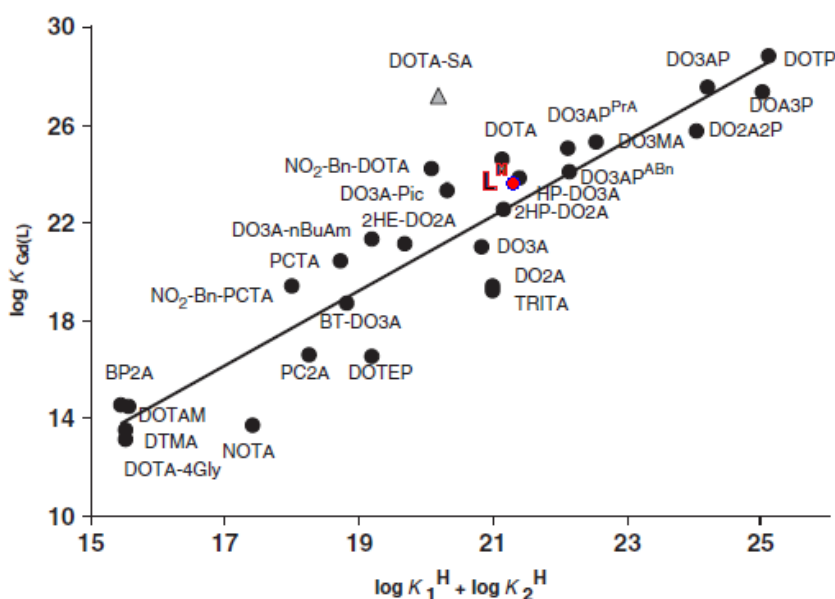
Z potenciometrických „out-of-cell“ titrácií látky L^M a Gd^{3+} v pomere 1 : 1 bola spočítaná hodnota konštanty stability komplexu $Gd-L^M$ ($\log K(Gd-L^M) = 23,77(4)$) a hodnota bola porovnaná s niektorými Gd^{3+} komplexami makrocyclických ligandov (tabuľka 18). Termodynamická konštantu stability komplexu odpovedá podobným komplexoch odvodených od derivátov ligandu DO_3AP^R .

Po vynesení termodynamickej stability makrocyclických komplexov $Gd-L$ oproti súčtu dvoch najvyšších hodnôt pK_A makrocyclických amínov (obrázok 43 (51)) je vidieť lineárna regresia a získaná hodnota $\log K(Gd-L^M)$ je v súhlase s touto koreláciou.

Ďalej bola z protonizačných konštánt spočítaná hodnota pK_A (tabuľka 19) pendantnej amino skupiny a distribučný diagram (obrázok 44) látky $Gd-L^M$. Z obrázku 44 vyplýva, že ligand L^M tvorí komplex s voľným Gd^{3+} už pri $pH \sim 1,6$ a pri $pH \sim 3,5$ je Gd^{3+} termodynamicky plne viazané v komplexe $Gd-L^M$. Hodnota pK_A pendantnej amino skupiny klesla až o 1,1 po vytvorení komplexu oproti voľnému ligandu L^M , čo je zapríčinené presunom elektrónovej hustoty vďaka koordinácii fosfínovej kyseliny (zníženie indukčného efektu skupiny). Koordinácia bočnej amino skupiny nie je možná pre sterickú zábranu.

Tabuľka 18

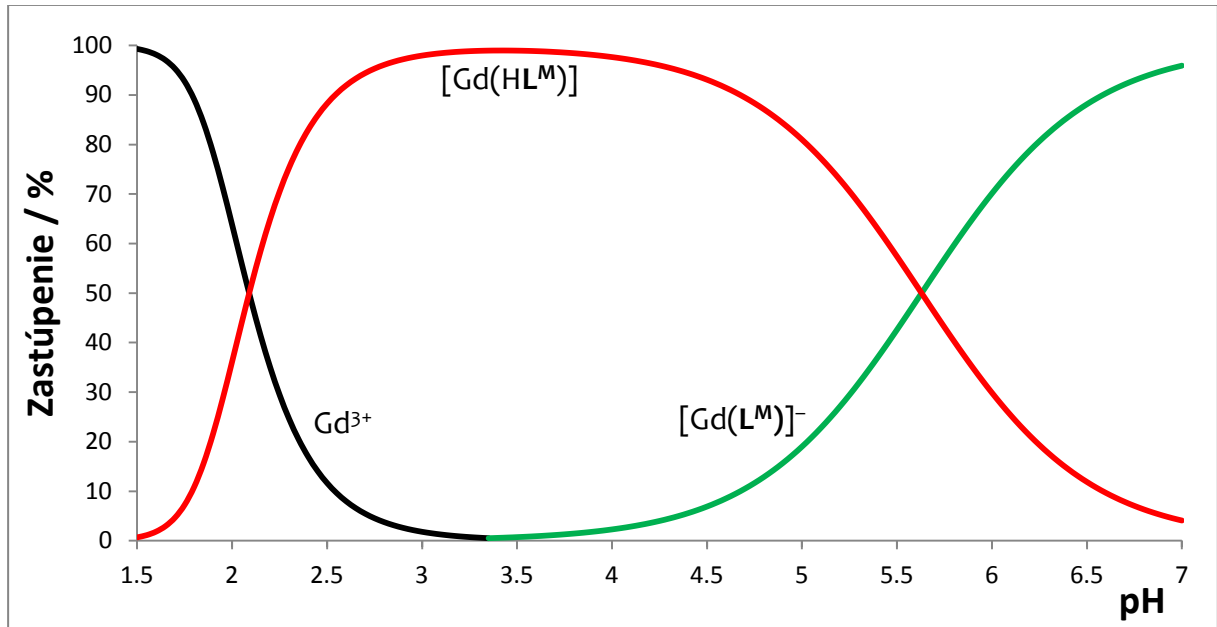
Ligand L	$\log K(Gd-L)$	Ref.
MS-325	22,1	(94)
DTPA	22,5	(24)
L^M	23,8	-
DO_3AP^{ABn}	24,0	(42)
DOTA	24,7	(41)



Obrázok 43 – závislosť termodynamickej stability komplexov $Gd-L$ na bazicite makrocyclického ligandu (súčet ich dvoch najbázickejších hodnôt pK_A , (51)) s doplneným údajom (červený), ktorý bol získaný pre ligand L^M a jeho komplex s Gd^{3+}

Tabuľka 19

pK_A ($[Gd(HL^M)]$)	Miesto protonizácie $Gd-L^M$
5,63	pendantný amín



Obrázok 44 – distribučný diagram látky $Gd-L^M$

4.3 NMR titračné experimenty komplexov Ln-L^M a Ln-L^A

Získané ¹H- a ³¹P-NMR spektrá komplexov (titrované v H₂O) boli referencované na externý štandard. Jednoznačné signály počas celého priebehu NMR titrácie a signály s veľkou zmenou chemického posunu po (de)protonizácii pendantnej amino skupiny boli preložené teoretickou krivkou vypočítanou programom OPIUM. Uvádzané hodnoty pK_A sú aritmetickým priemerom hodnôt pK_A vypočítaných z ¹H- a z ³¹P-NMR titračného vyhodnotenia (t.j. pK_A = [pK_A(¹H) + pK_A(³¹P)] / 2) a ďalej neuvádzané chyby hodnôt pK_A sú rádovo desatiny. Chyby integračných hodnôt sú do 5 %.

Od ligandu L^M boli vytvorené Ln³⁺ komplexy pre základnú charakterizáciu T₁-kontrastnej látky (Eu³⁺, Gd³⁺, Tb³⁺, Dy³⁺ a Yb³⁺) a ďalšie (Nd³⁺ a Er³⁺), aby boli vyhodnotené trendy zastúpenia a zmeny zastúpenia izomérov so zmenou veľkosti Ln³⁺ (obrázok 45).

Zastúpenie SA a TSA Ln-L^M, ako bolo očakávané, má typický priebeh pre protonizovanú formu pendantnej amino skupiny komplexu [Ln(HL^M)]. Zlom (prevaha izoméru TSA' nad TSA) nastáva na začiatku druhej polovice série, medzi [Tb(HL^M)] a [Dy(HL^M)]. Avšak u komplexov s deprotonizovanej formou pendantného amínu [Ln(L^M)]⁻ je zlom netypicky už medzi [Gd(L^M)]⁻ a [Tb(L^M)]⁻ a nárast zastúpenia TSA' je veľmi prudký. Vysvetlením by bola stérická náročnosť dibenzylamino skupiny, ktorá pravdepodobne zasahuje i do priestoru koordinácie H₂O. Je veľmi pravdepodobné, že koordinovaná voda interaguje pomocou H-väzby s protonizovanou formou amínu (HN⁺Bn₂, H₂O - -H-N⁺), a tým sú benzylové skupiny fixované mimo koordinačný priestor H₂O. Taktiež pravdepodobne interaguje i deprotonizovaná forma amínu (NBn₂) s koordinovanou H₂O, no vo forme O-H - -N-Bn.

Vďaka strate koordinovanej molekuly vody po deprotonizácii pendantnej amino skupiny a nárastu zastúpenia TSA' izoméru sú zmeny chemických posunov ³¹P v okolí pH ~ pK_A extrémne. Rozdiel posunov blízkeho atómu ³¹P látky Dy-L^M v závislosti na protonizácii pendantného amínu je až cez 110 ppm a pre oba izoméry. Žiaľ, ³¹P-NMR signál je patrný len v hodnote pH odpovedajúcej okrajovým častiam titračnej krivky. V okolí hodnoty pH ~ pK_A sú ³¹P-NMR signály rozšírené pravdepodobne z dôvodu fluxionality, a preto je táto obdivuhodná zmena posunu ³¹P nevyužiteľná ako pH senzor v ³¹P-MRS (z angl. Magnetic Resonance Spectroscopy).

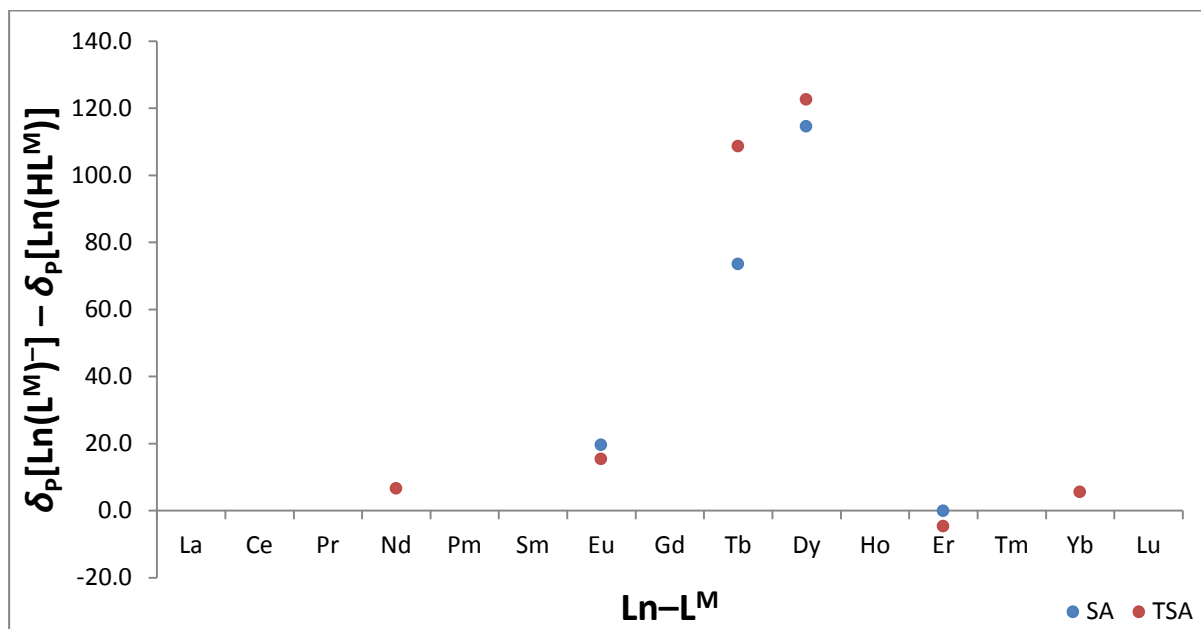
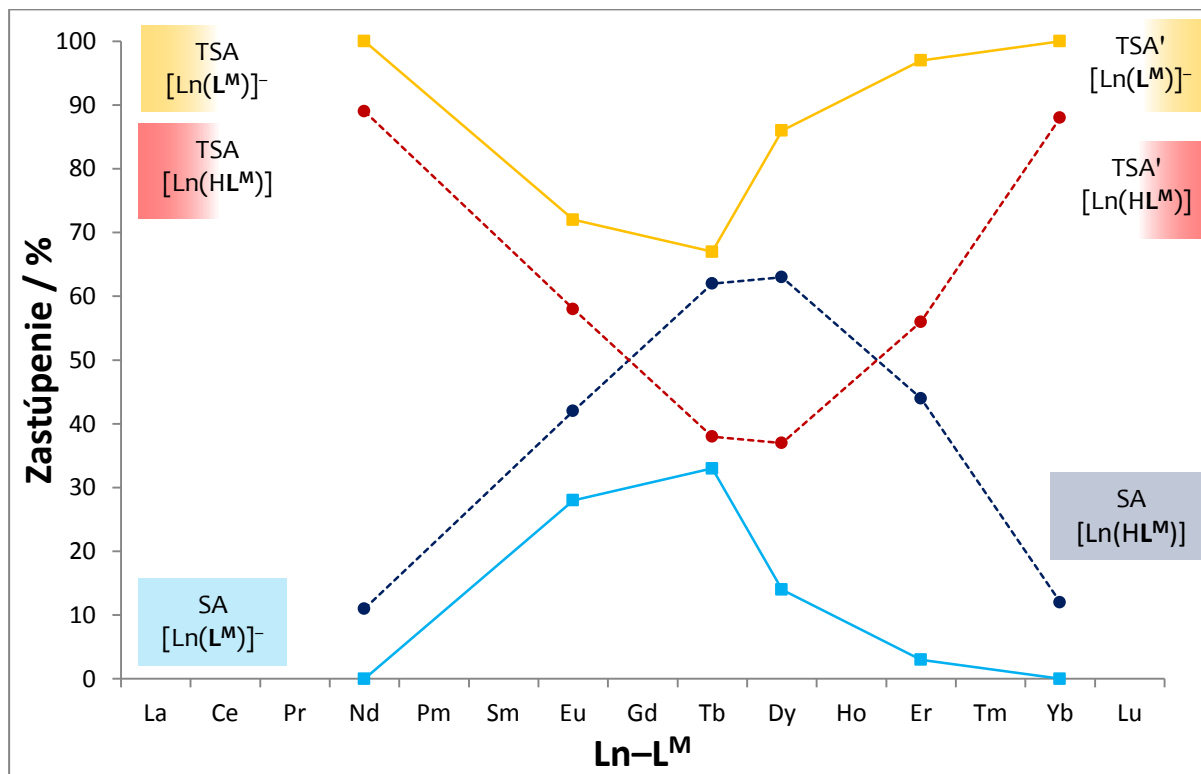
Zmena zastúpenia izomérov po (de)protonizácii pendantnej amino skupiny komplexu odpovedá vyššie popísaným javom a princípom. Zmena o takmer 50 % u Dy-L^M odpovedá strate (nadobudnutiu) koordinácie H₂O. Tieto merania dobre odpovedajú zmene veľkosti parametru q zistenou metódou DIS (rôzne hodnoty q pre [Dy(HL^M)] a [Dy(L^M)]⁻, vid' ďalej).

Hodnota pK_A pendantnej amino skupiny komplexov je takmer o 1,0 menšia oproti hodnote pK_A voľného ligandu L^M i L^A. Tento prudký pokles je spôsobený koordináciou fosfínovej funkčnej skupiny, a tým je jej záporný indukčný efekt výrazne zväčšený. V sérii (Eu-L^M, Tb-L^M a Yb-L^M) sa táto hodnota pK_A príliš nemení. Avšak rozdiel hodnôt pK_A izomérov SA a TSA + TSA' jedného komplexu je markatný – priemerne 0,4. Opäť, táto hodnota môže byť zapríčinená zvýšeným zastúpením izoméru TSA' po deprotonizácii pendantnej amino skupiny.

Popísané vlastnosti sú uvedené v tabuľke 20 a zobrazené na obrázku 45.

Tabuľka 20

Ln^{3+}	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	Sc	Y
$\text{pK}_A(\text{SA}, \text{Ln}-\text{L}^{\text{M}})$	-	-	-	-	-	-	6,3	-	6,4	-	-	-	-	-	-	-	-
$\text{pK}_A(\text{TSA}, \text{Ln}-\text{L}^{\text{M}})$	-	-	-	-	-	-	5,8	-	5,9	-	-	-	-	5,7	-	-	-



Obrázok 45 – zastúpenie izomérov SA a TSA + TSA' komplexov $[\text{Ln}(\text{HL}^{\text{M}})]$ a $[\text{Ln}(\text{L}^{\text{M}})]^-$ (hore) a zmena chemického posunu ^{31}P izomérov SA a TSA + TSA' po deprotonizácii pendantnej amino skupiny (dolu)

Od látky L^A boli pripravené komplexy so všetkými Ln^{3+} (okrem rádioaktívneho Pm^{3+}) a so „pseudo-lanthanoidmi“ Sc^{3+} a Y^{3+} kvôli štúdiu PARACEST efektu pendantnej amino skupiny. Veľkostne je oktakoordinovaný Y^{3+} podobný s oktakoordinovaným Dy^{3+} a vlastnosti $Y-L^A$ sú podobné s $Dy-L^A$ (zastúpenie SA a TSA + TSA' a hodnoty pK_A). Oktakoordinovaný Sc^{3+} má veľkosť omnoho menšiu ako oktakoordinovaný Lu^{3+} . Komplex $Sc-L^A$ má takmer zhodné vlastnosti (zastúpenie izomérov, zmena a posun ^{31}P a i.) s komplexom $Y-L^A$.

Zastúpenie izomérov SA a TSA + TSA' má typický priebeh so zmenou veľkosti Ln^{3+} . Zlom (prevaha TSA' nad TSA) nastáva pri forme komplexu $[Ln(HL^A)]$ medzi $Dy-L^A$ a $Ho-L^A$ a pri forme $[Ln(L^A)]$ medzi $Tb-L^A$ a $Dy-L^A$ alebo medzi $Dy-L^A$ a $Ho-L^A$. Mierny posun tohto zlomu je pravdepodobne spôsobený zmenou geometrie komplexu, t.j. pendantnej amino skupiny voči koordinovanej vode (H-väzby typu $H_2O \cdots H-N^+$ a $HO-H \cdots N-H$).

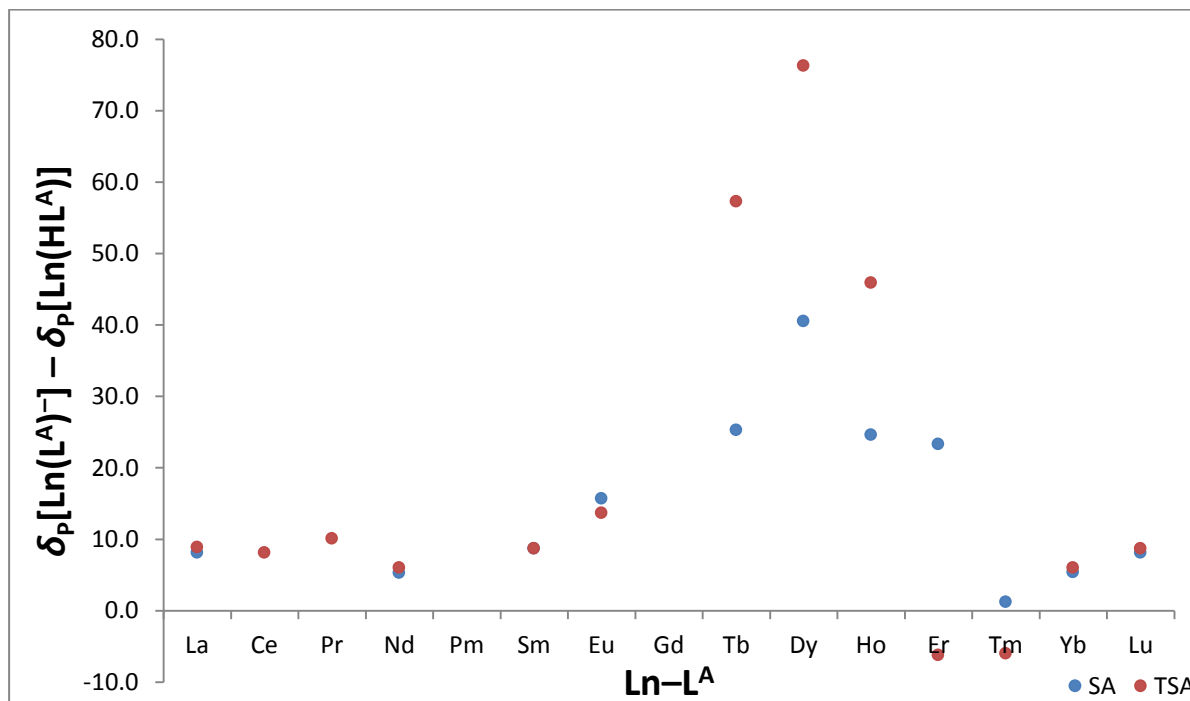
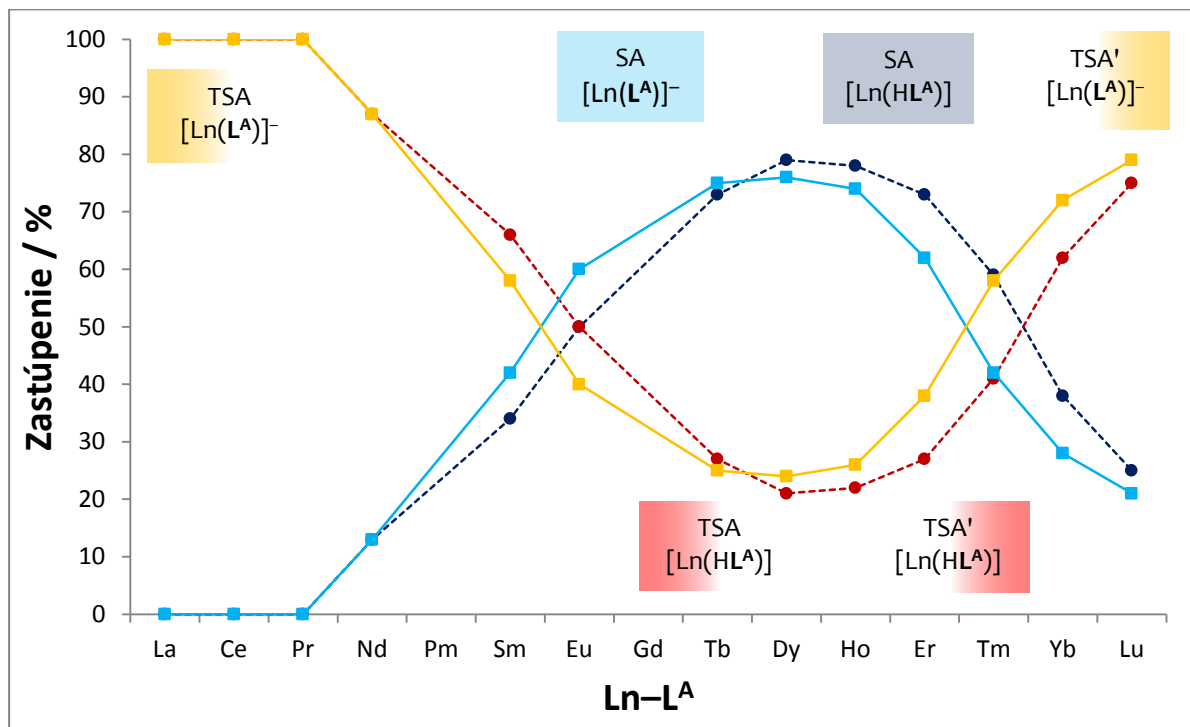
Zmena posunu ^{31}P po (de)protonizácii pendantnej amino skupiny odpovedá, okrem blízkosti atómu ^{31}P a efektívneho magnetického momentu Ln^{3+} , miernej zmene zastúpenia TSA a TSA'. Avšak zmena chemického posunu ^{31}P cez 40 ppm (max. 76 ppm) u $Tb-L^A$ a $Dy-L^A$ je pozoruhodná a signál je jasne rozlíšiteľný počas celého priebehu NMR titrácie (viď príloha). Tieto ideálne vlastnosti pre pH senzor v ^{31}P -MRS narúša fakt, že hodnota pK_A oboch izomérov je mimo fyziologickej oblasti pH ($pK_A(Ln-L^A) \sim 8,6$).

Hodnoty pK_A pendantnej amino skupiny komplexov $Ln-L^A$ sú v rámci chyby podobné. Rozdiel hodnôt pK_A izomérov SA a TSA + TSA' je len cca 0,2, čo môže byť zapríčinené rôznou vzdialenosťou daného amínu od kavity makrocyclu. Patrné prehodenie hodnôt pK_A izomérov u $Ho-L^A$ je zapríčinené prevahou zastúpenia izoméru TSA' nad TSA, a tým je priemerná častica komplexu menej hydratovaná ($q < 1$). Veľkostne sú hodnoty pK_A izomérov v poradí $pK_A(TSA') < pK_A(SA) < pK_A(TSA)$. Stratou koordinovanej vody nastáva i zmena typu pravdepodobnej H-väzby pendantnej amino skupiny ($H_2O \cdots H-N^+$ a $HO-H \cdots N-H$) a geometria komplexu je pravdepodobne mierne modifikovaná. Priemerná hodnota pK_A komplexov je 8,5–8,6 a teda pH senzorké vlastnosti sú nevyužiteľné v prostredí *in vivo*. Táto zmena hodnoty pK_A komplexov $Ln-L^A$ ($pK_A \sim 8,6$) oproti hodnote pre voľný ligand L^A ($pK_A \sim 9,5$) je zapríčinená spomenutou zmenou veľkosti indukčného efektu po koordinácii fosfínovej kyseliny k centrálnemu atómu.

Vyššie popísané NMR vyhodnotenia komplexov $Ln-L^A$ sú uvedené v tabuľke 21 a graficky zobrazané na obrázku 46.

Tabuľka 21

Ln^{3+}	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	Sc	Y
$\text{p}K_A(\text{SA}, \text{Ln}-\text{L}^A)$	-	-	-	8,0	-	8,5	8,5	-	8,6	8,6	8,7	8,7	8,6	8,7	8,7	8,7	8,7
$\text{p}K_A(\text{TSA}, \text{Ln}-\text{L}^A)$	8,1	8,2	8,4	8,3	-	8,6	8,8	-	8,6	8,7	8,6	8,5	8,4	8,4	8,5	8,8	8,6



Obrázok 46 – zastúpenie izomérov SA a TSA + TSA' komplexov $[\text{Ln}(\text{HL}^A)]$ a $[\text{Ln}(\text{L}^A)]^-$ a zmena chemického posunu ^{31}P izomérov SA a TSA + TSA' po deprotonizácii pendantnej amino skupiny (dolu)

4.4 Počet priamo koordinovaných vôd (q)

4.4.1 Luminiscenčné experimenty

Meraním komplexov Eu-L^{M} , Tb-L^{M} a Eu-L^{A} , Tb-L^{A} rozpustených v H_2O alebo D_2O pri dvoch hodnotách pH / pD (odpovedajúcich formám $[\text{Ln}(\text{HL})]$ a $[\text{Ln}(\text{L})]^-$, $\text{L} = \text{L}^{\text{M}}$ alebo L^{A}) boli zistené rýchlostné konštanty vyhasínania k a teda aj doby života τ týchto stavov (tabuľka 22 a 23). Typické excitačné a emisné spektrá meraných látok sú zobrazené na obrázku 47 a 48.

Z NMR titračných a UV-VIS experimentov (viď ďalej) bolo zistené, že Eu^{3+} komplexy týchto dvoch ligandov majú $q \sim 1$, a Tb^{3+} komplexy môžu mať $q < 1$, no stále prevahu tvoria častice (izoméry) s koordinovanou molekulou vody. Luminiscenčné merania tomu neodpovedajú (výpočet q_{H} (71) a q_{P} (72)), lebo hodnoty q vychádzajú približne polovičné. Pravdepodobnou príčinou tohto pozorovania je interakcia koordinovanej molekuly vody (O–H a O–D) a pendantnej amino skupiny (N–H). Pravdepodobná H-väzba prítomná medzi tými dvoma skupinami znižuje energiu valenčnej vibrácie O–H a O–D, a tým je zhášacia účinnosť týchto skupín znížená.

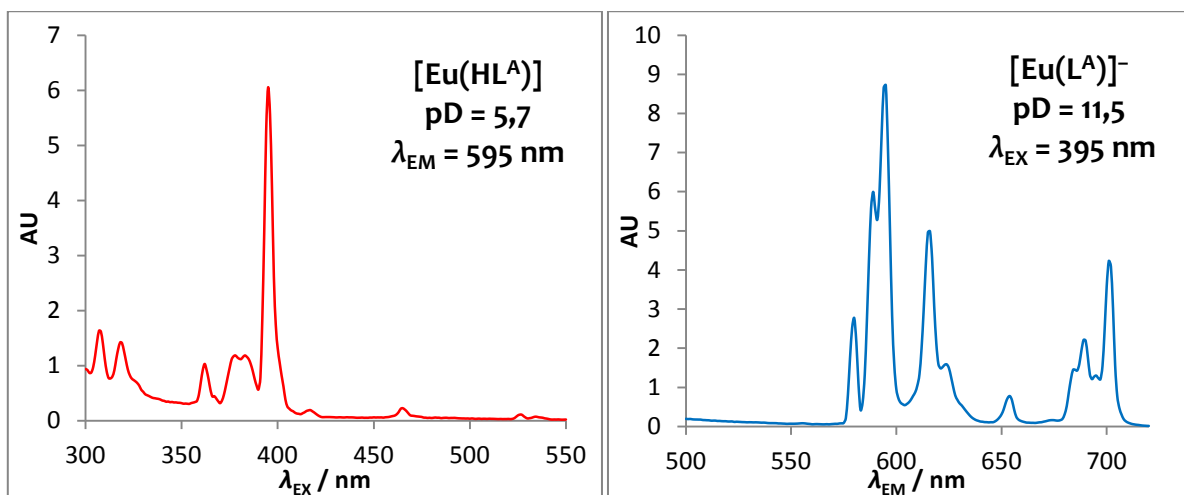
Eu^{3+} komplex ligandu L^{M} má vo forme $[\text{Eu}(\text{L}^{\text{M}})]^-$ neobyčajne nízke doby životov τ . Experimenty boli vykonané 4× s rôznymi vzorkami a i pri inej hodnote pH (9,5 a 11,9), no bolo dosahovaných podobných výsledkov. Extrémne nízke hodnoty môžu byť spôsobené rozvíbovaním celej molekuly pre zvýšenú labilnosť koordinovanej molekuly H_2O pre pravdepodobný začiatok tvorby izoméru TSA' (strata koordinovanej H_2O izoméru TSA).

Tb^{3+} komplex ligandu L^{M} podľa NMR titračných experimentov mení hodnotu q s hodnotou pH, resp. s (de)protonizáciou pendantnej amino skupiny. Luminiscenčné merania tomu odpovedajú.

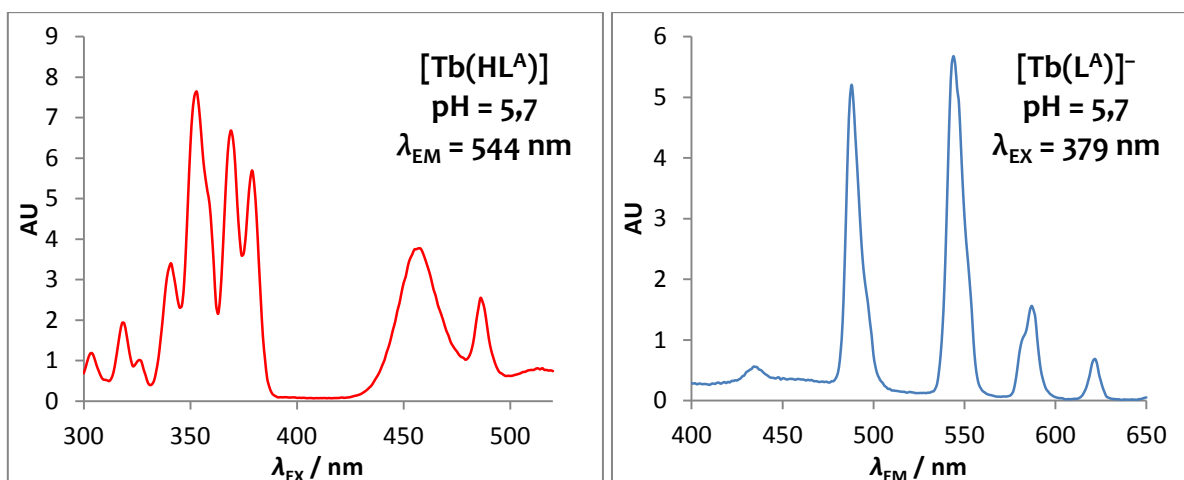
Tabuľka 22 (hore) a 23 (dolu)

Ligand L	pH	Náboj amínu pendentu	Počet N–H vibrátorov	τ_H / ms	τ_D / ms	q_P	q_H
L^M	8,5	0	0	0,44	0,73	0,78	0,95
L^M	4,2	+	1	0,81	2,57	0,71	0,89
L^A	11,5	0	2	0,99	3,91	0,61	0,79
L^A	5,7	+	3	1,00	3,61	0,57	0,76

Ligand L	pH	Náboj amínu pendentu	Počet N–H vibrátorov	τ_H / ms	τ_D / ms	q_P	q_H
L^M	8,2	0	0	2,82	4,22	0,29	0,49
L^M	4,2	+	1	2,61	4,40	0,48	0,65
L^A	11,5	0	2	2,55	4,28	0,49	0,67
L^A	5,7	+	3	2,48	4,48	0,60	0,76



Obrázok 47 – typické excitačné (vľavo) a emisné (vpravo) spektrá Eu^{3+} komplexu



Obrázok 48 – typické excitačné (vľavo) a emisné (vpravo) spektrá Tb^{3+} komplexu

4.4.2 Vysokorozlíšené UV-VIS experimenty europitých komplexov

Výsledkom teplotne závislých meraní prechodov ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ komplexov Eu-L^{M} a Eu-L^{A} je mierne nesymetrický signál, ktorý mení svoju polohu a tvar (obrázok 50). Na prvý pohľad je zrejmé, že častice v ňom obsiahnuté sa nelíšia parametrom q a vzhľadom k výsledkom luminiscenčných meraní zjavne platí, že $q = 1$ pre všetky prítomné častice. Dekonvolúciou (rozklad na zložky) boli získané dva elementárne signály odpovedajúce izomérom SA a TSA (oba koordinujú molekulu vody). Ich zastúpenie je variabilné s teplotou, no získanie ich presného podielu je diskutabilné pre rozdiel vlnových dĺžok cca 0,1 nm. Fitovaním experimentálnych údajov dvoma Gaussovými krivkami s celkovo 5 údajmi (pološírka, posun signálu ν_{SA} a signálu ν_{TSA} , intenzita signálu I_{SA} a signálu I_{TSA} ; bol zanedbaný príspevku Lorentzovho tvaru signálu a rozdielne pološírky pozorovaných signálov) boli získané trendy v tabuľkách 25 a 26.

Porovnať hodnoty ν_{SA} a ν_{TSA} s výsledkami vysokorozlíšeného UV-VIS vyhodnotenia látky $[\text{Eu}(\text{dota})]^-$ nie je možné, pretože sa autori odvolávajú na nereproducibilnosť separácie signálov izomérov (95), čo bol majoritný problém i pri vyhodnocovaní získaných údajov pre Eu^{3+} komplexy ligandov L^{M} a L^{A} . Avšak rozdiel posunov absorpčných signálov izomérov SA a TSA komplexov ligandu $\text{DO}_3\text{AP}^{\text{R}}$ ($\Delta\lambda \sim 0,1$ nm) je v zhode s publikovanými údajmi pre Eu^{3+} komplex ligandu DOTA.

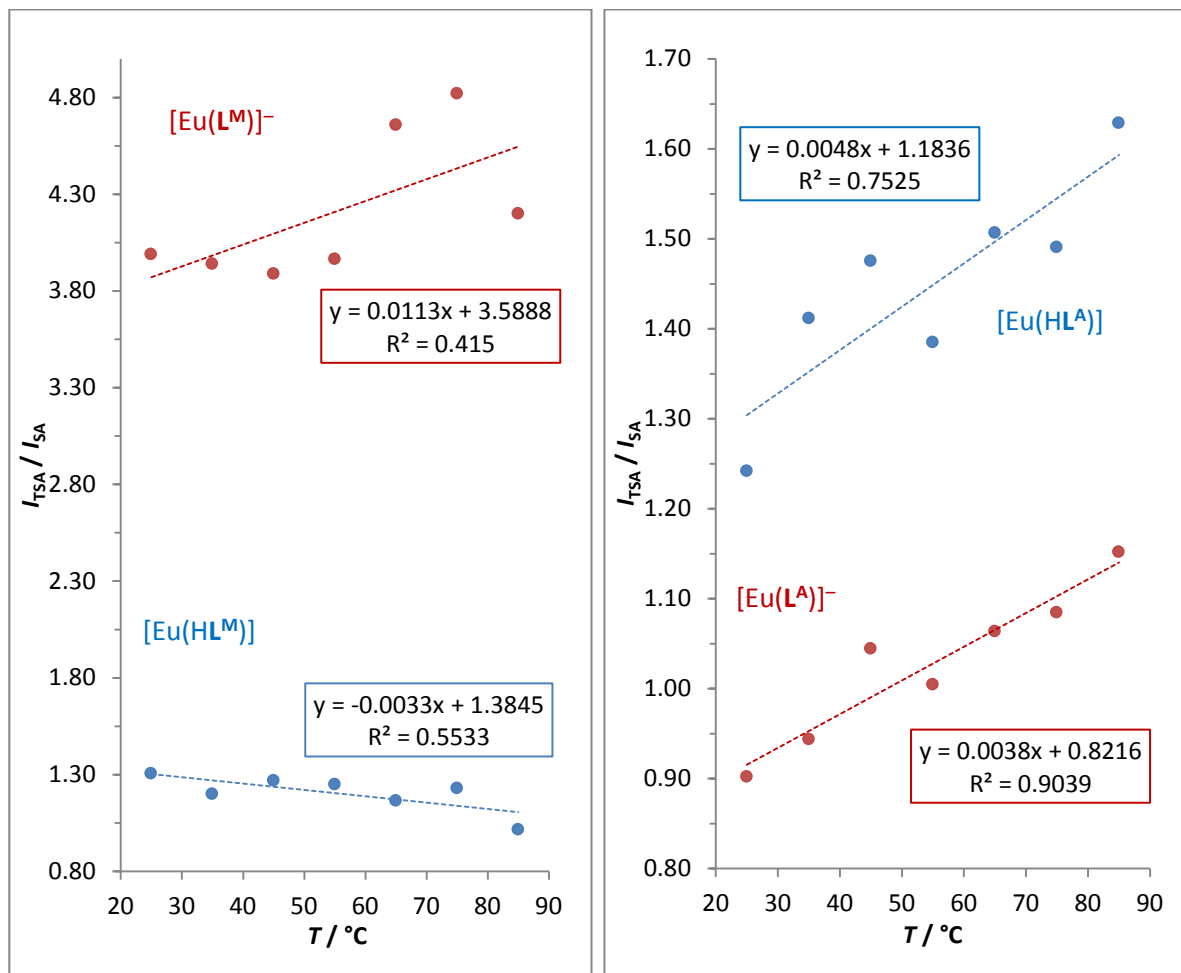
So zvyšujúcou sa teplotou sa pozorované signály rozširujú (zvyšujúca sa hodnota pološírky Δ) a posúvajú k vyšším vlnovým dĺžkám. Oba merané komplexy pri oboch hodnotách pH menia zastúpenie izomérov SA a TSA. Pri zvýšení teploty je preferované zastúpenie energeticky náročnejšieho usporiadania, izoméru TSA (prítomná kladná smernica lineárnych regresii pre komplex Eu-L^{A} na obrázku 49). Výsledné zastúpenie izomérov z analýzy UV-VIS spektier komplexu Eu-L^{M} má príliš veľkú chybu, aby sa dal popísať trend ich zastúpenia.

Z tvaru absorpčného signálu, ktorý bol vieruhodne preložený dvoma dekonvolúvanými signálmi, je zrejmé, že izomér TSA' nie je prítomný ani pri jednej (de)protonovanej forme komplexov Eu-L^{M} a Eu-L^{A} , resp. jeho zastúpenie je pod detekčným limitom metódy. Izomér TSA' by vytváral tretí signál, ktorý by bol vzdialený od absorpčných signálov SA a TSA ($\nu_{\text{SA}} \sim \nu_{\text{TSA}} \neq \nu_{\text{TSA}'}$).

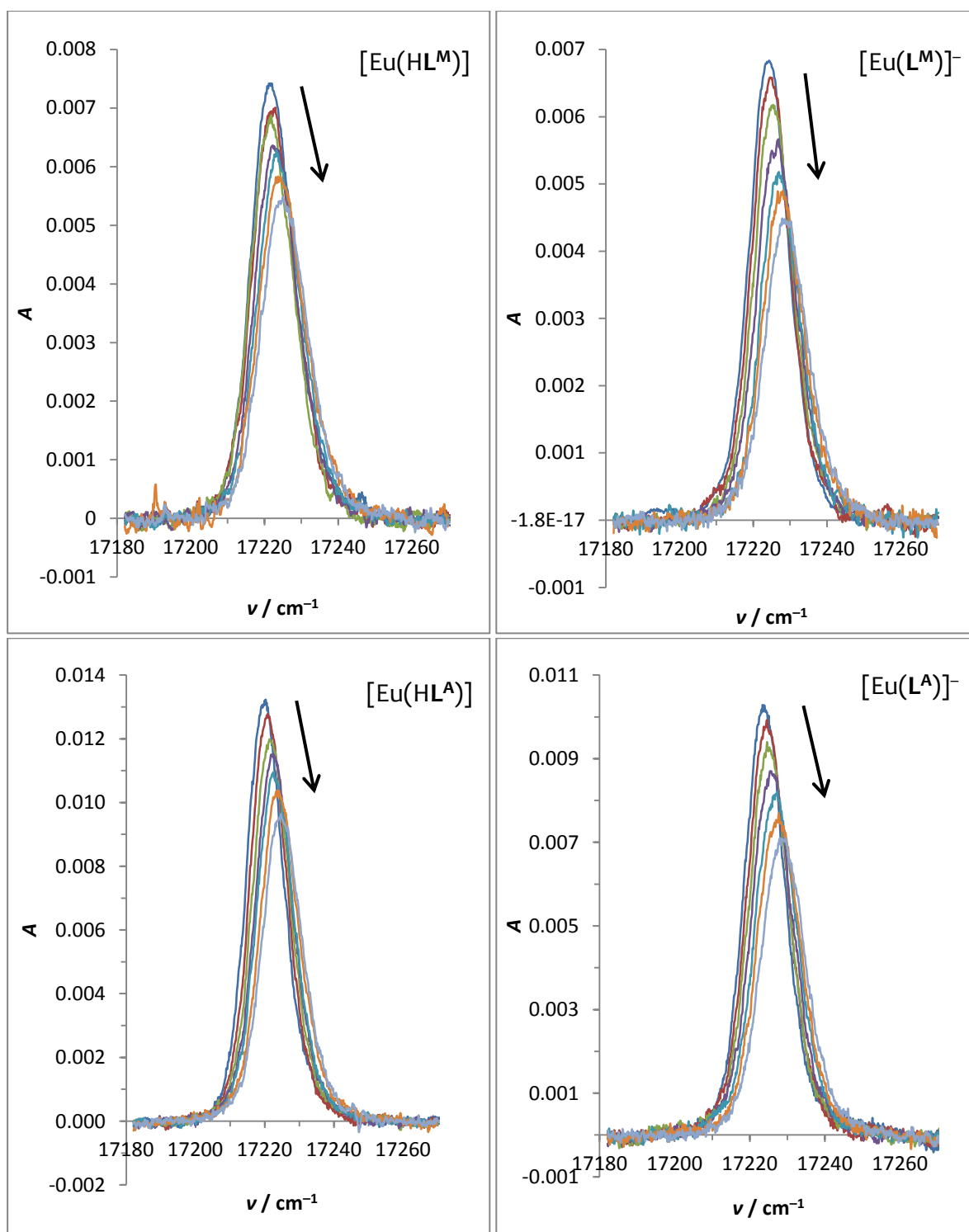
Získané pomery zastúpenia izomérov, ktoré boli získané integračne z plôch signálov z ${}^{31}\text{P-NMR}$ a UV-VIS, pre teplotu $T = 25$ °C sú porovnané v tabuľke 24. Vzhľadom ku chybám stanovenia sú hodnoty získané oboma metódami vo veľmi dobrej zhode.

Tabuľka 24

Metóda	Forma komplexu	SA(Eu-L ^M)	TSA(Eu-L ^M)	SA(Eu-L ^A)	TSA(Eu-L ^A)
UV-VIS	[Eu(HL)]	43 %	57 %	45 %	55 %
	[Eu(L)] ⁻	20 %	80 %	53 %	47 %
³¹ P-NMR	[Eu(HL)]	42 %	58 %	50 %	50 %
	[Eu(L)] ⁻	28 %	72 %	60 %	40 %



Obrázok 49 – porovnanie pomeru intenzity signálu TSA ku signálu SA (Eu-L^M vľavo a Eu-L^A vpravo) meniaceho sa s teplotou



Obrázok 50 – experimentálne UV-VIS spektrá vodných roztokov Eu–L^M (hore) a Eu–L^A (dolu) vo forme [Eu(HL)] (vľavo) a vo forme [Eu(L)][–] (vpravo), šípka znázorňuje zvyšujúcu sa teplotu

Tabulka 25

Eu-L^M

pH	T / °C	Δ / cm^{-1}	$\nu_{\text{TSA}} / \text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{SA}} / \text{cm}^{-1}$	I_{TSA}	I_{SA}	$I_{\text{TSA}} / I_{\text{SA}}$
4,0	25	16,05	17220,63	17224,69	0,0761	0,0583	1,31
	35	15,95	17221,00	17224,58	0,0679	0,0566	1,20
	45	16,25	17220,78	17223,94	0,0682	0,0537	1,27
	55	16,23	17221,90	17225,09	0,0640	0,0512	1,25
	65	16,46	17222,56	17225,95	0,0606	0,0521	1,16
	75	17,09	17222,98	17227,14	0,0618	0,0503	1,23
	85	17,13	17223,85	17227,26	0,0525	0,0517	1,02
8,5	25	17,01	17223,95	17225,94	0,1004	0,0252	3,99
	35	16,61	17224,38	17227,17	0,0949	0,0241	3,94
	45	16,73	17224,87	17228,99	0,0905	0,0233	3,89
	55	17,21	17225,78	17229,11	0,0840	0,0212	3,97
	65	16,86	17226,68	17231,35	0,0789	0,0169	4,66
	75	17,56	17227,32	17233,19	0,0789	0,0164	4,82
	85	18,37	17228,28	17233,01	0,0730	0,0174	4,20

Tabulka 26

Eu-L^A

pH	T / °C	Δ / cm^{-1}	$\nu_{\text{TSA}} / \text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{SA}} / \text{cm}^{-1}$	I_{TSA}	I_{SA}	$I_{\text{TSA}} / I_{\text{SA}}$
6,4	25	14,71	17219,27	17221,51	0,1182	0,0952	1,24
	35	15,07	17220,22	17222,60	0,1234	0,0874	1,41
	45	15,46	17221,01	17223,56	0,1216	0,0824	1,48
	55	15,50	17221,89	17224,10	0,1125	0,0812	1,39
	65	15,79	17222,15	17224,84	0,1128	0,0749	1,51
	75	16,09	17223,22	17226,16	0,1095	0,0734	1,49
	85	16,47	17223,96	17227,30	0,1074	0,0660	1,63
10,9	25	14,77	17223,28	17224,76	0,0777	0,0861	0,90
	35	15,21	17223,98	17225,63	0,0782	0,0829	0,94
	45	15,19	17224,83	17225,64	0,0774	0,0741	1,04
	55	15,67	17225,18	17226,81	0,0734	0,0730	1,00
	65	16,18	17226,32	17227,73	0,0728	0,0684	1,06
	75	16,29	17226,91	17228,84	0,0701	0,0646	1,08
	85	16,82	17228,10	17229,98	0,0690	0,0599	1,15

4.4.3 Dyspróziom indukovaný ^{17}O -NMR posun komplexov Dy–L

Počet priamo koordinovaných vôd k centrálnemu atómu komplexu (hodnota q) je možné zistiť i meraním koncentračných závislostí ^{17}O -NMR posunov v roztokoch komplexov Dy–L. Závislosť posunu signálu od referencie ($c(\text{Dy–L}) = 0 \text{ m}$) s nutnou korekciou na BMS efekt (rovnica [26] a [27]) je priamo úmerná koncentrácii Dy^{3+} častíc a hodnote q . Z pomeru priebehov vynesenej lineárnych závislostí (smerníc, rovnica [28]) meraného Dy^{3+} komplexu ku komplexu Dy^{3+} so známou hodnotou q (často $[\text{Dy}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}$) je možné hodnotu q meraného Dy–L vypočítať s relatívne nízkou chybou.

Získané údaje pre merané Dy^{3+} komplexy ligandov L^{M} a L^{A} pri dvoch hodnotách pH (forma $[\text{Dy}(\text{HL})]$ a $[\text{Dy}(\text{L})]^-$, $\text{L} = \text{L}^{\text{M}}$ a L^{A}) boli porovnané s Dy^{3+} nona- alebo okta-aqua kationóm (rôzni autori uvádzajú rôzne hodnoty) a komplexom Dy–EDTA (pripravený zmiešaním Dy^{3+} vodného roztoku a disodnej soli EDTA v pomere 1 : 1,1, hodnota pH bola upravená na $\sim 9,5$ s 5% vodným roztokom NaOH a roztok bol prefiltrovaný cez 0,2 μm PTFE filter) a sú uvedené v tabuľke 27 a na obrázku 51.

Z tabuľky 27 je zrejmé, že obe formy Dy^{3+} komplexu ligandu L^{M} sú v rovnováhe s hodnotou $q < 1$ (za predpokladu, že $q([\text{Dy}(\text{HL}^{\text{A}})]) = 1$). Hodnota parametru q je pre formu komplexu $[\text{Dy}(\text{HL}^{\text{M}})]$ väčšia než pre formu $[\text{Dy}(\text{L}^{\text{M}})]^-$, čo je v zhode s NMR titračnými experimentami látok Ln–L^{M} (tvar krivky zastúpenia izomérov SA a TSA + TSA' na forme Ln–L^{M} a výrazná zmena pomeru zastúpenia izomérov medzi týmito formami) a z luminiscenčných meraní Eu^{3+} a Tb^{3+} komplexov ligandu L^{M} . Zmena hodnoty q po (de)protonizácii amino skupiny pendantu Dy– L^{A} je v rámci chyby merania nulová, a teda sa dá predpokladať, že obe formy komplexu ($[\text{Dy}(\text{HL}^{\text{A}})]$ a $[\text{Dy}(\text{L}^{\text{A}})]^-$) majú $q \sim 1$, čo je v zhode s pozorovaním z priebehu zastúpenia izomérov z NMR titrácií látok Ln–L^{A} .

$$\Delta\delta_{\text{O,DIS}} = \delta_{\text{O}}(\text{Dy–L}) - \delta_{\text{O}}(\text{H}_2\text{O}) - \delta_{\text{BMS}} \quad [26]$$

$$\Delta\delta_{\text{BMS}} = \frac{4\pi c(\text{Dy–L}) \mu_{\text{eff}}^2 s}{2,84^2 T} \cong 0,199 c^{293\text{K}}(\text{Dy–L}) \quad [27]$$

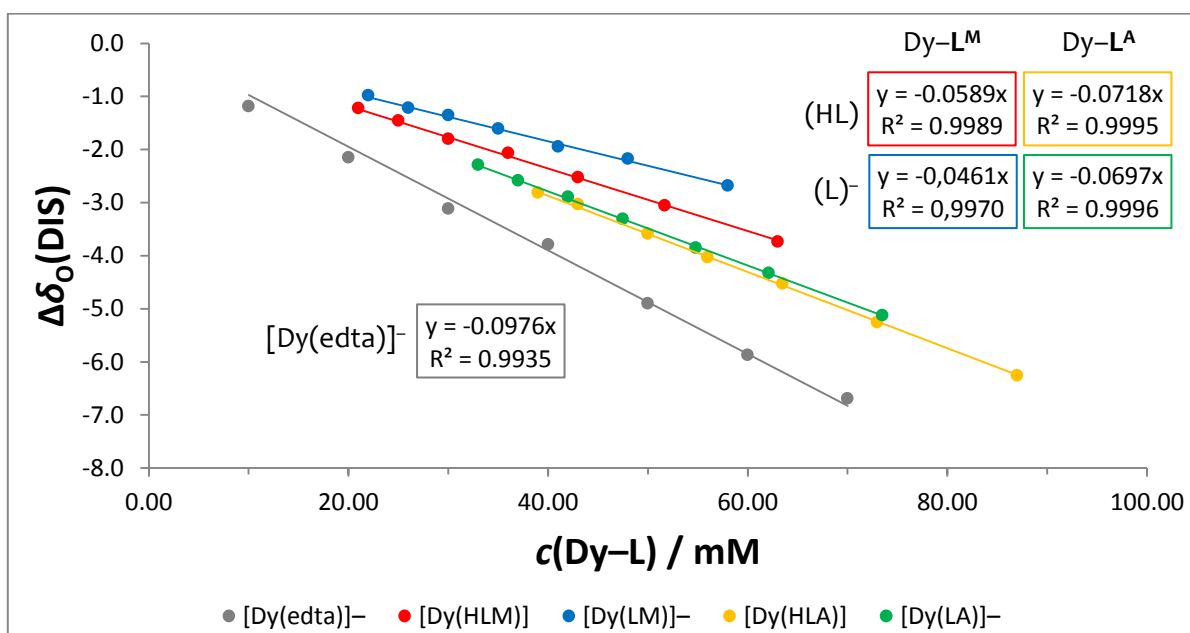
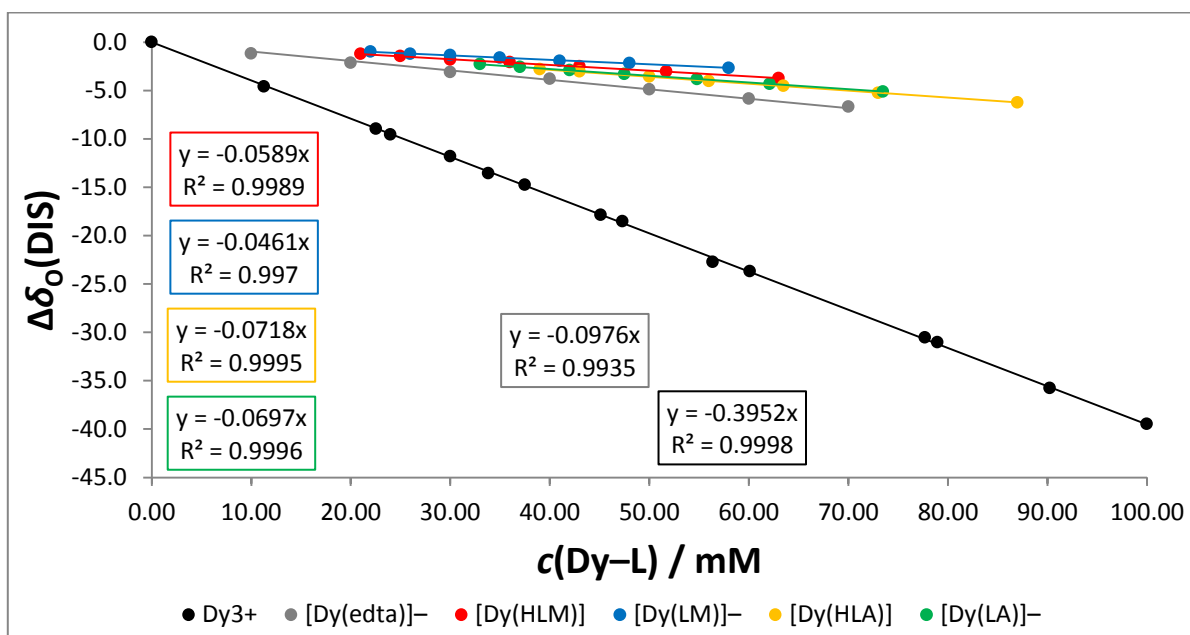
$$\frac{q(\text{Dy}^{3+})}{k(\text{Dy}^{3+})} = \frac{q(\text{Dy–L})}{k(\text{Dy–L})} \quad [28]$$

$\Delta\delta_{\text{O,DIS}}$ je dyspróziom indukovaný ^{17}O -NMR posun, $\delta_{\text{O}}(\text{Dy–L})$ je ^{17}O -NMR posun vodného roztoku Dy^{3+} komplexu, $\delta_{\text{O}}(\text{H}_2\text{O})$ je ^{17}O -NMR posun vodného rozpúšťadla, δ_{BMS} je ^{17}O -NMR posun zapríčinený efektom BMS, $c(\text{Dy–L})$ je koncentrácia udaná v mM, μ_{eff} je efektívny magnetický moment Dy^{3+} (rovný 10,60), s je geometrický faktor (pre cylindrické kyvety rovný 1/3), T je termodynamická teplota, q je počet priamo koordinovaných vôd a k je smernica lineárnej regresie bodov závislosti $\Delta\delta_{\text{O,DIS}}$ voči $c(\text{Dy–L})$.

Tabuľka 27

Komplex	Smernica k	q	q	$q(\text{Dy-L}) / q([\text{Dy}(\text{HL}^{\text{A}})])$
Dy^{3+}	-0,3952	9,00*	8,00*	-
$[\text{Dy}(\text{edta})]^-$	-0,0976	2,23	1,98	-
$[\text{Dy}(\text{HL}^{\text{M}})]$	-0,0589	1,35	1,20	0,82
$[\text{Dy}(\text{L}^{\text{M}})]^-$	-0,0461	1,05	0,94	0,64
$[\text{Dy}(\text{HL}^{\text{A}})]$	-0,0718	1,64	1,46	1,00*
$[\text{Dy}(\text{L}^{\text{A}})]^-$	-0,0697	1,59	1,42	0,97

* fixovaná hodnota



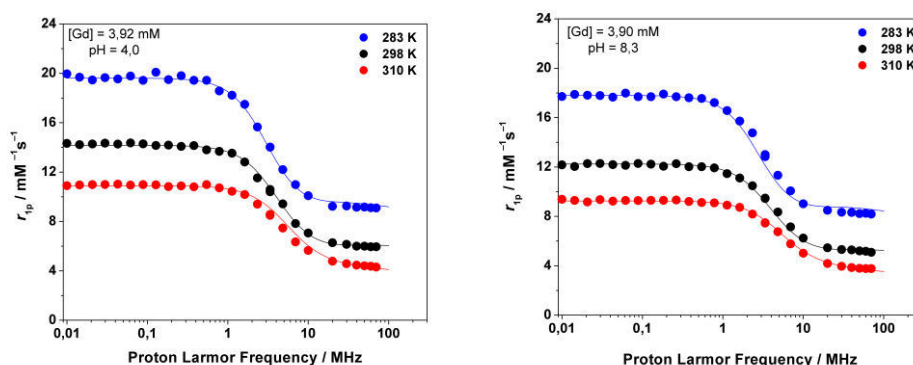
Obrázok 51 – závislosť dyspróziom indukovaného ^{17}O -NMR posunu na koncentrácií Dy^{3+} (hore) a detail na oblasť s $\Delta\delta_{\text{O, DIS}} < -8$ ppm (dolu), hodnoty $\Delta\delta_{\text{O, DIS}}$ boli korigované na veľkosť BMS (rovnica [27])

4.5 Relaxometrické titračné a ^{17}O -NMR experimenty Gd-L

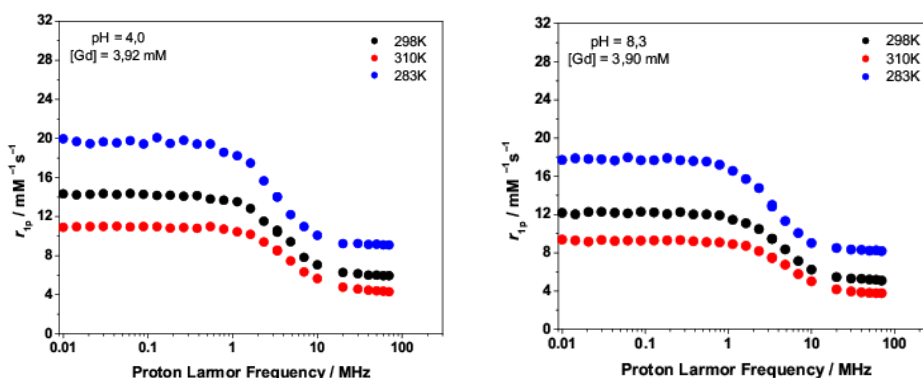
Potenciálnym T_1 -kontrastným látkam Gd-L^M a Gd-L^A boli zmerané rýchlosti pozdĺžnej ^1H relaxácie na relaxometroch s premenlivým magnetickým poľom a teplotou na 3 rôzne teploty. Získané paramagnetické príspevky relaxivity r_{1p} , resp. relaxácie R_{1p} , boli vynesené voči protónovej Larmorovej frekvencii (resp. intenzite magnetického poľa) a sú zobrazené pre jednotlivé hodnoty pH (odpovedajúce dvom rôznym formám komplexov $[\text{Gd}(\text{HL})]$ a $[\text{Gd}(\text{L})]^-$, $\text{L} = \text{L}^{\text{M}}$ alebo L^{A}) na obrázkoch 52 a 53 (profily komplexu Gd-L^M boli preložené fitom).

Obe kontrastné látky dosahujú len mierne navýšených hodnôt relaxív v porovnaní s dnes klinicky využívanými. Látka Gd-L^M má zvýšenú relaxivitu oproti látke Gd-L^A pre jej vyššiu molekulárnu hmotnosť (predĺžený korelačný čas τ_R). Veľké rozdiely hodnôt relaxív sú spôsobené prítomnou blízkou molekulou vody v druhej hydratačnej sfére pre látku $[\text{Gd}(\text{HL}^{\text{M}})]$ a pravdepodobne i pre látku $[\text{Gd}(\text{HL}^{\text{A}})]$. Z metód zistenia hodnoty q (NMR titrácie Ln-L, luminiscencie, UV-VIS a DIS) sa dá usúdiť, že obe formy komplexov Gd-L^A koordinujú práve jednu molekulu H_2O a komplexy Gd-L^M majú hodnotu $q \leq 1$ a zároveň $q([\text{Gd}(\text{HL}^{\text{M}})]) < q([\text{Gd}(\text{L}^{\text{M}})]^-)$.

Ďalej bola skúmaná len látka Gd-L^M pre jej potenciálnu interakciu s makromolekulou HSA, čím sa relaxačné parametre Gd³⁺ suprakomplexu významne ovplyvnia.

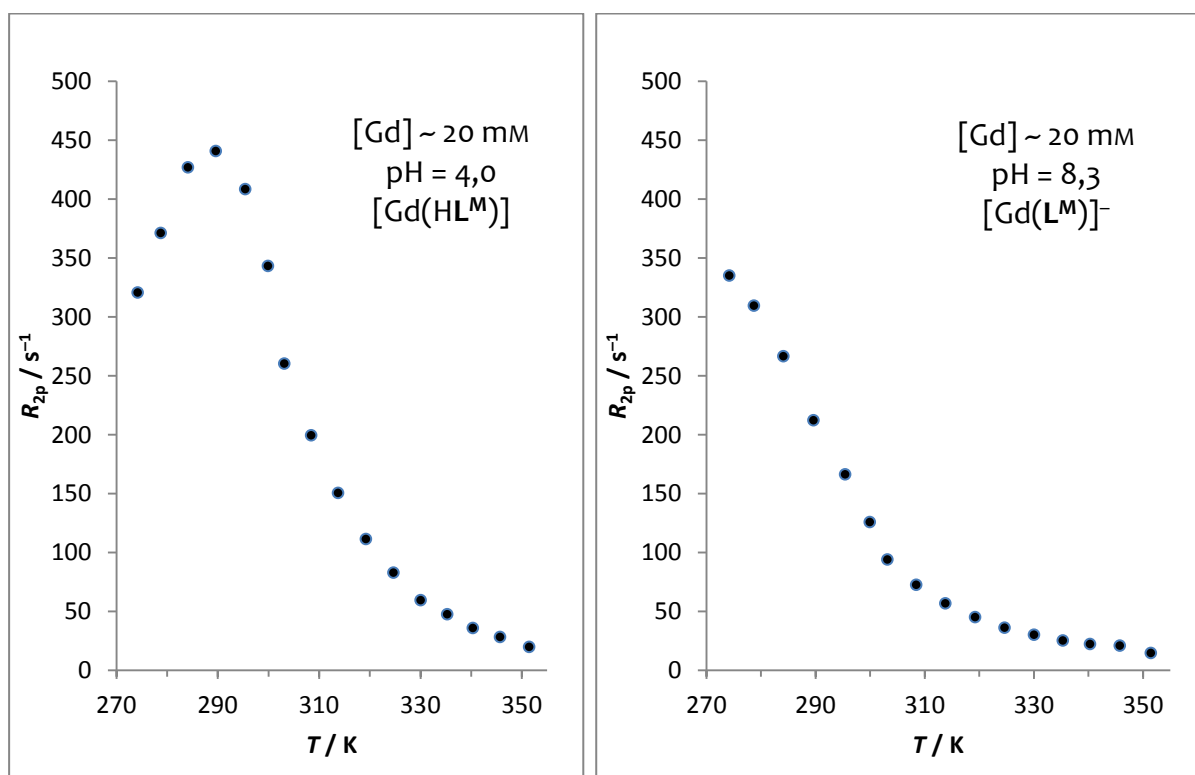


Obrázok 52 – ^1H -NMRD profily látky Gd-L^M vo forme $[\text{Gd}(\text{HL}^{\text{M}})]$ (vľavo) a $[\text{Gd}(\text{L}^{\text{M}})]^-$ (vpravo) preložené fitom



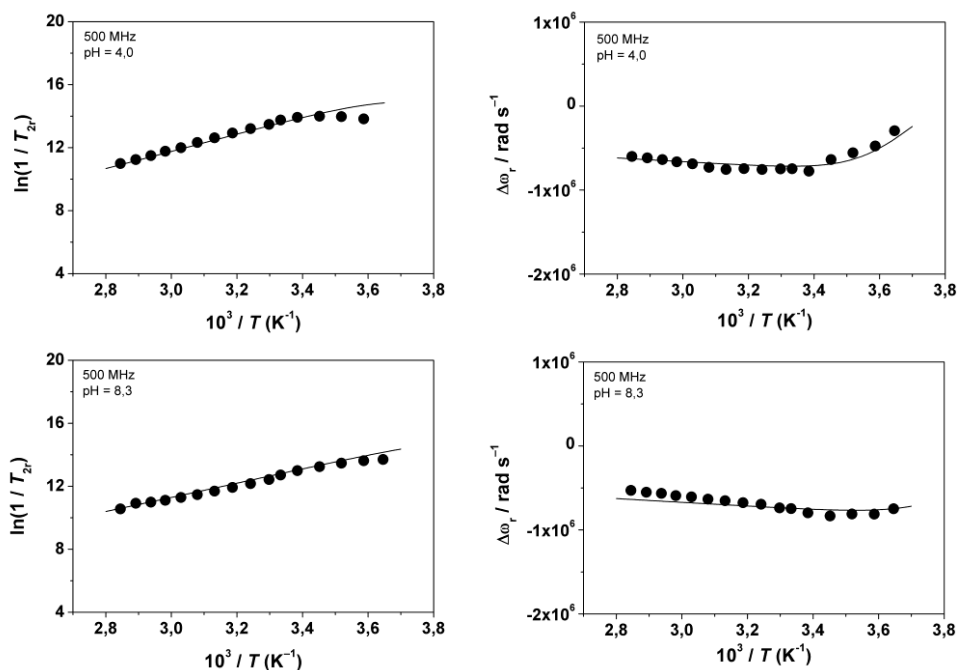
Obrázok 53 – ^1H -NMRD profil látky Gd-L^A vo forme $[\text{Gd}(\text{HL}^{\text{A}})]$ (vľavo) a $[\text{Gd}(\text{L}^{\text{A}})]^-$ (vpravo)

Pre získanie relaxometrických parametrov T_1 -kontrastnej látky Gd-L^{M} boli vykonané teplotne závislé ^{17}O -NMR experimenty pri dvoch hodnotách pH (obrázok 54). Z priebehu experimentálnych bodov je vidieť, že komplex vo forme $[\text{Gd}(\text{HL}^{\text{M}})]$ vymieňa koordinovanú vodu pomalšie (menšia hodnota τ_{M}) než vo forme $[\text{Gd}(\text{L}^{\text{M}})]^-$ (zistené podľa polohy maxima). Príčinou zmeny veľkosti τ_{M} môže byť prítomnosť iného typu vodíkovej väzby amínu s koordinovanou molekulou vody alebo zmena zastúpenia izomérov SA a TSA. U formy $[\text{Gd}(\text{L}^{\text{M}})]^-$ sa pravdepodobne začína tvoriť izomér TSA' (blízky hydratačný zlom, vid' NMR titrácie Ln-L^{M}), koordinovaná molekula vody ku Gd^{3+} izoméru TSA je labilizovaná, a tým je rýchlosť výmeny koordinovanej vody navýšená (diskutované už v teoretickom úvode).



Obrázok 54 – teplotne závislé ^{17}O -NMR profily látky Gd-L^{M} vo forme $[\text{Gd}(\text{HL}^{\text{M}})]$ (vľavo) a $[\text{Gd}(\text{L}^{\text{M}})]^-$ (vpravo)

Kombináciou experimentálnych dát (^1H -NMRD profilov pri rôznych teplotách a teplotne závislých ^{17}O -NMR meraní) látky Gd-L^{M} pri dvoch hodnotách pH (forma $[\text{Gd}(\text{HL}^{\text{M}})]$ a $[\text{Gd}(\text{L}^{\text{M}})]^-$) je možné podľa rovníc uvedených v teoretickom úvode získať relaxačné parametre tejto T_1 -kontrastnej látky. Fitovacia krivka údajov je zobrazená na obrázku 52 a 55 a získané údaje týmto fitovaním sú uvedené v tabuľke 28.



Obrázok 55 – experimentálne dáta (údaj o relaxačnom čase T_{2r} – vľavo a údaj o posune – vpravo) získané z teplotne závislých ^{17}O -NMR meraní látky Gd-L^{M} vo forme $[\text{Gd}(\text{HL}^{\text{M}})]$ (hore) a $[\text{Gd}(\text{L}^{\text{M}})]^-$ (dolu) preložené fitom

Tabuľka 28 – relaxačné parametre boli získané súčasným fitovaním ^1H -NMRD profilov a ^{17}O -NMR údajov

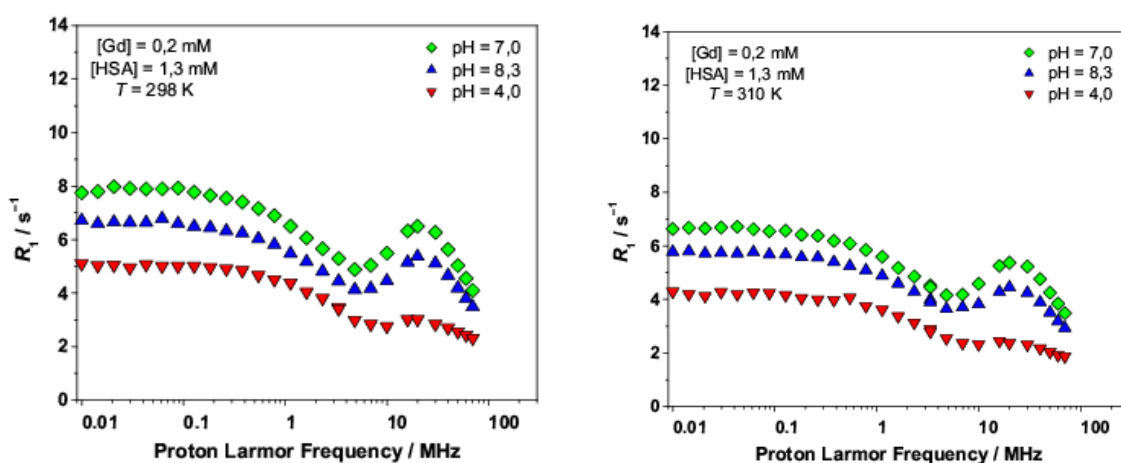
Relaxačný parameter	$[\text{Gd}(\text{L}^{\text{M}})]^-$	$[\text{Gd}(\text{HL}^{\text{M}})]$	Gd-DOTA^a	Gd-(MS-325)^b
$^{20}\text{r}_{\text{ip}}^f / \text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	5,5	6,3	4,7	$5,6 \pm 0,1$
$^{20}\text{r}_{\text{ip}}^b / \text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$		$52,0 \pm 1,4^c$	–	$48,0 \pm 6,7$
$\Delta^2 / 10^{19}\text{s}^{-2}$	$4,1 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$5,22 \pm 0,24$
τ_V^{298} / ps	10 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	$18,7 \pm 0,9$
$k_{\text{ex}}^{298} / 10^6\text{s}^{-1}$	166 ± 5	63 ± 3	$4,1 \pm 0,2$	$5,13 \pm 0,72$
τ_R^{298} / ps	93 ± 4	95 ± 6	77 ± 4	142
q	1^d	1^d	1	1
$r_{\text{Gd-H}} / \text{Å}$	$3,0^d$	$3,0^d$	3,15	3,1
$E_V / \text{kJ mol}^{-1}$	$1,0^d$	$1,0^d$	1,0	$6,4 \pm 2,7$
$\Delta H_M^* / \text{kJ mol}^{-1}$	$37,0 \pm 0,6$	$45,3 \pm 1,3$	$49,8 \pm 1,5$	$51,3 \pm 0,3$
$A / \hbar / 10^6\text{rad s}^{-1}$	$-3,5 \pm 0,1$	$-3,3 \pm 0,2$	$-3,7 \pm 0,2$	$-4,1 \pm 0,1$

^a údaje z literatúry (75); ^b údaje z literatúry (69); ^c pre plne naviazanú formu látky Gd-L^{M} k HSA pri pH = 7,0; ^d fixovaná hodnota

Najlepší fit pre údaje pre Gd-L^M pri pH = 4,0 bol získaný pri zahrnutí príspevku vody v druhej hydratačnej sfére. Vzďialenosť H₂O^{SS} od Gd³⁺ je rovná 3,6 Å a jej korelačný čas $\tau_M(298\text{ K}) = 56\text{ ps}$. Už bolo pozorované, že T₁-kontrastné látky obsahujúce fosfínovú alebo fosfónovú funkčnú skupinu často majú nemalý príspevok R₁ druhej hydratačnej sféry (96).

Všetky získané hodnoty boli očakávané (Δ^2 , τ_R , A / ħ potvrdzujúce $q \sim 1$, ...) až na rýchlosť výmeny koordinovanej molekuly H₂O. Veľkosť k_{ex}^{298} pre [Gd(L^M)]⁻ je extrémne vysoká ($\tau_M = 6\text{ ns}$). Príčinou môže byť prítomnosť koordinujúceho sa fosfinátu a labilizovaný izomér TSA (zvýšená fluxionalita pre možný začiatok tvorby izoméru TSA'), ktorý výmenu H₂O o to viac urýchľuje, ako už bolo spomenuté v teoretickej úvode.

¹H-NMRD profil zmesi Gd-L^M s HSA (vzorky boli pripravené z roztokov po zmeraní posledného titračného bodu, viď ďalej) potvrdzuje vznik pH senzitívneho suprakomplexu Gd³⁺ komplexu s HSA kvôli vzniku lokálneho maxima u Larmorovej frekvencie ~ 20 MHz (obrázok 56), kde sú najcitlivejšie prejavované zmeny veľkosti parametru τ_R . Forma komplexu [Gd(HL^M)] je schopná len minimálnej interakcie s HSA (τ_R zvýšené len nepatrne) a pri pH = 8,3 forma [Gd(L^M)]⁻ má ďalej ovplyvnenú hodnotu τ_R pre zvýšenie flexibility HSA pri hodnote pH > 8,0 (zmena konformácie HSA (97)). Pri podmienkach blízkych fyziologickému prostrediu (pH = 7,0 a T = 37 °C) pozorovaná relaxácia R₁(H₂O) odpovedá relaxivite „r_{1p} ~ 30 mM⁻¹ s⁻¹“, no toto vyjadrenie nie je správne, lebo v meranom prostredí je v nemalom zastúpení prítomná voľná i viazaná forma Gd³⁺ komplexu (pozorovaná R₁ odpovedá lineárnej kombinácii r_{1p} [Gd(L^M)]⁻ a r_{1p} suprakomplexu [Gd(L^M)]⁻-HSA).

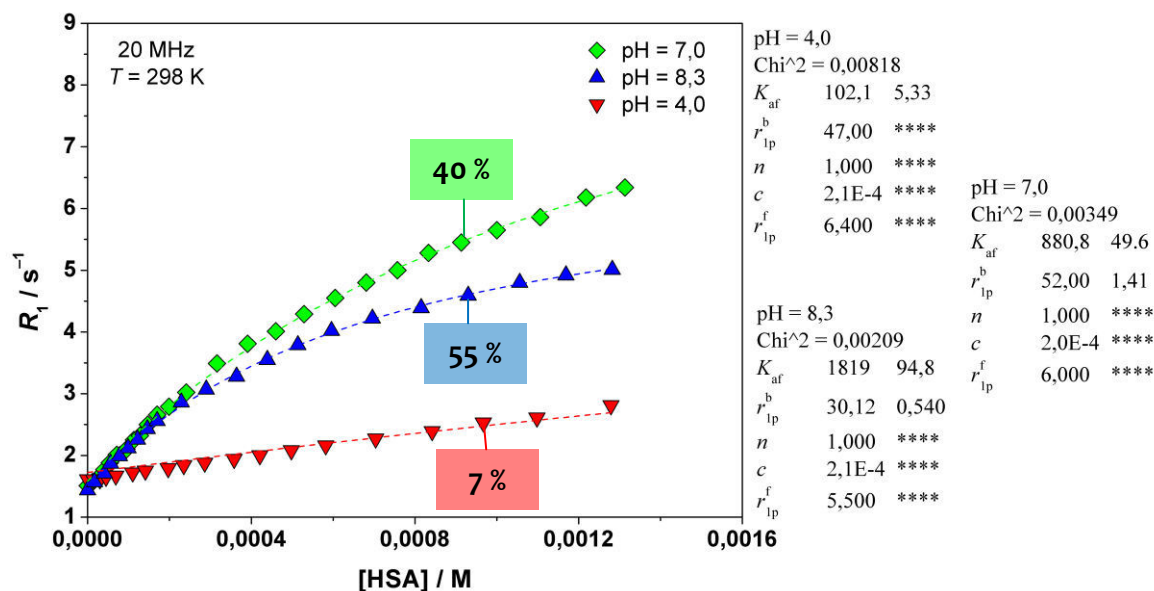


Obrázok 56 – ¹H-NMRD profil látky Gd-L^M s prítomným HSA pri rôznych hodnotách pH a teplote T = 25 °C (vľavo) a T = 37 °C (vpravo)

Z relaxometrickej titrácie látky Gd-L^M s HSA pri rôznych hodnotách pH (T = 298 K) je vidieť rôzne silná interakcia týchto dvoch látok. Preložením experimentálnych bodov funkciou hydrofóbnej interakcie (rovnica [29] (98)) boli získané afinitné konštanty K_{af} a r_{1p}^b naviazaného komplexu Gd-L^M k HSA. Predpokladom bol počet väzobných miest n = 1 a známa relaxivita r_{1p}^f voľného komplexu. Boli zvolené tri rôzne hodnoty pH odpovedajúce prítomnosti častice [Gd(HL^M)] (pH = 4,0), [Gd(L^M)]⁻ (pH = 7,0) a rozvolneniu štruktúry HSA (pH = 8,3).

Z hodnôt vyplýva existencia (pri pH = 7,0) slabej interakcie ($K_{af} \sim 10^3$) látky $[Gd(L^M)]^-$ s HSA a navýšenie relaxivity r_{1p} voľnej T_1 -kontrastnej látky z $6 \text{ mm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ po vytvorení suprakomplexu s HSA na $52 \text{ mm}^{-1} \text{ s}^{-1}$, čo predstavuje takmer až 8,5-násobný nárast relaxivity (obrázok 57). Takéto extrémne navýšenie r_{1p} ešte nebolo doposiaľ pozorované. Žiaľ, podiel naviazanej kontrastnej látky k HSA (zistené rovnicou [30]) bol dosiahnutý len 40 % (pri pH = 7,0, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, bez kontroly iónovej sily, $[Gd(L^M)]^- = 0,2 \text{ mM}$ a $[HSA] \sim 0,9 \text{ mM}$) pri 4,5-násobnom nadbytku HSA voči $Gd-L^M$. Avšak táto vlastnosť je výhodná z pohľadu farmakokinetiky, resp. vylučovania T_1 -kontrastnej látky z tela (diskutované v sekcii experimentov *in vivo*).

Interakcia komplexu $Gd-L^M$ s HSA je pH senzitívna. Forma komplexu $[Gd(HL^M)]$ má veľkosť afinitnej konštanty takmer o jeden rád nižší a podiel naviazanej T_1 -kontrastnej látky bol len 7% (pri pH = 4,0, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, bez kontroly iónovej sily, $[Gd(L^M)]^- = 0,21 \text{ mM}$ a $[HSA] \sim 0,9 \text{ mM}$), a to pri 4,5-násobnom prebytku HSA voči $Gd-L^M$. Relaxivita suprakomplexu $r_{1p}^b([Gd(HL^M)]-HSA)$ nie je príliš rozdielna, ale schopnosť tvorby tohto komplexu je minimálna. Forma komplexu $[Gd(L^M)]^-$ pri pH = 8,3 má veľkosť afinitnej konštanty k HSA vyššiu, čo je zapríčinené rozvoľnením terciárnej štruktúry HSA. Podiel naviazanej T_1 -kontrastnej látky vzrástol na 55 % (pri pH = 8,3, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, bez kontroly iónovej sily, $[Gd(L^M)]^- = 0,21 \text{ mM}$ a $[HSA] \sim 0,9 \text{ mM}$) opäť pri 4,5-násobnom prebytku HSA voči $Gd-L^M$, no relaxivita aduktu klesla na $r_{1p}^b = 30 \text{ mm}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Vysvetlením pozorovania by mohla byť zvýšená flexibilita makromolekuly HSA pri tomto pH (97), a tým je znížená hodnota τ_R suprakomplexu, a schopnosť makromolekuly HSA viazať hydrofílné častice je navýšená.



Obrázok 57 – relaxometrická titrácia roztoku $Gd-L^M$ s HSA(s) pri rôznych hodnotách pH, zvýraznený je podiel naviazanej látky $Gd-L^M$ k HSA χ_b vypočítaný rovnicou [32], hodnota R_1^{HSA} ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 MHz) bola získaná z $^1\text{H-NMRD}$ profilu vodného roztoku HSA o koncentracii 60 mg/ml (čo odpovedá $\sim 0,9 \text{ mM}$)

$$\xi^* = (R_1^b - 1) \frac{(K_{af}[GdL]_t + K_{af}[n \text{ HSA}]_t + 1) - \sqrt{(K_{af}[GdL]_t + K_{af}[n \text{ HSA}]_t + 1)^2 - 4K_{af}^2[n \text{ HSA}]_t[GdL]_t}}{2K_{af}[GdL]_t} + 1 \quad [29]$$

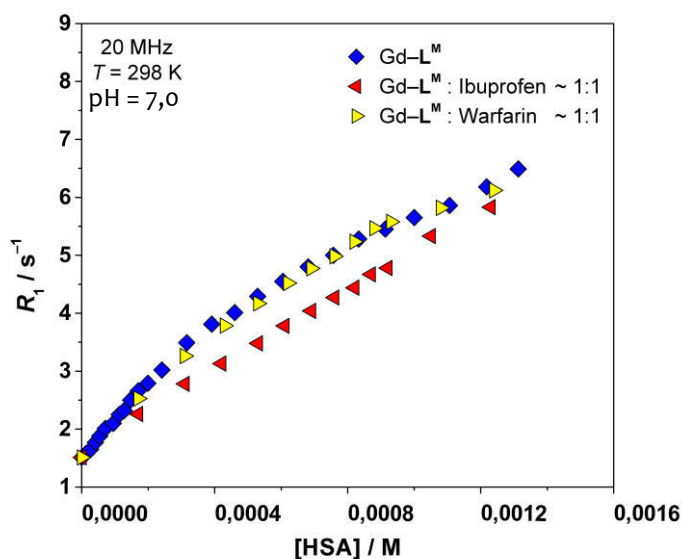
$$\xi^* = \frac{R_1^*}{R_1} = \frac{R_{1,obs}^* - R_{1d}^*}{R_{1,obs} - R_{1d}} \quad [30]$$

$$R_1^* = \chi_f R_1^f + \chi_b R_1^b = (1 - \chi_b) R_1^f + \chi_b R_1^b \quad [31]$$

$$\chi_b = \frac{R_1^* - R_1^f}{R_1^b - R_1^f} \quad [32]$$

ξ^* značí faktor protónového relaxačného zosilnenia (PRE efekt – Proton Relaxation Enhancement), R_1^b značí relaxáciu suprakomplexu Gd(L)–HSA, K_{af} je afinitná konštanta, $[n \text{ HSA}]$ značí koncentráciu väzobných miest, index „t“ značí totálnu koncentráciu, R_1^* je pozorovaná (zosilnená) relaxácia (v prítomnosti HSA), R_1 je relaxácia samotného komplexu (vo vode), index „obs“ značí pozorovanú veličinu, index „d“ diamagnetický príspevok (HSA alebo H₂O roztok), χ_f je molárna frakcia nenaivazanej (voľnej) látky Gd–L, R_1^f je relaxácia samotného komplexu Gd–L, χ_b je molárna frakcia suprakomplexu Gd(L)–HSA ku celkovému Gd–L.

K stanoveniu presného miesta interakcie látky Gd–L^M s HSA bola využitá relaxometrická inhibičná titrácia. Do dvoch hydrofóbných kavití HSA sa viaže viacero látok a pre identifikačné účely boli použité látky Warfarin, ktorá sa viaže do miesta I (97), a látka Ibuprofen, ktorá sa viaže do miesta II (97), obe s veľkosťou $K_{af} > 10^6$. Roztok Gd–L^M a inhibítora v pomere približne 1 : 1 bol titrovaný prídavkami pevného HSA a merané relaxácie H₂O boli medzi sebou porovnané (obrázok 58). K poklesu hodnôt R_1 došlo s prítomným Ibuprofenom, kým priebeh experimentálnych údajov u titrácie s prítomným Warfarinom a bez inhibítora bol navzájom veľmi podobný. Z toho sa dá usudzovať, že látka [Gd(L^M)]⁻ sa viaže do hydrofóbnej kavity HSA, konkrétne do miesta II. Do toho istého miesta sa viaže i T₁-kontrastná látka Ablavar[®] (80).



Obrázok 58 – relaxometrická titrácia roztoku látky [Gd(L^M)]⁻ a inhibítora s pevným HSA

4.6 Fluorescenčné titračné experimenty komplexu Gd-L^M

Pre potvrdenie suprakomplexu a určenie presného miesta hydrofóbnej interakcie komplexu Gd-L^M, resp. jeho dibenzylamino skupiny, s HSA boli od štruktúry namerané vyhasínania fluorescence určitých aminokyselín HSA a fluorescenčných látok viažucich sa do určitých miest HSA.

Základným experimentom bolo potvrdenie interakcie komplexu Gd-L^M s HSA. Hydrofóbne kavity HSA majú na povrchu zvyšky aminokyselín obsahujúce aromatické jadro (histidín a tyrozín (99)), ktoré po excitácii žiarením o vlnovej dĺžke cca $\lambda_{EX} = 290$ nm emitujú žiarenie o vlnovej dĺžke $\lambda_{EM} = 345$ nm (100). Pri zachovaní nízkej koncentrácie HSA (potlačenie autofluorescencie) je možné sledovať zhášanie tejto fluorescence prídavkom látky, ktorá sa viaže v blízkosti daných aminokyselín.

Vodný roztok HSA o koncentrácii $\sim 10 \mu\text{M}$ bol titrovaný malými prídavkami (vo výsledku do 10 % celkového objemu) komplexu Gd-L^M a pH bolo upravované vodnými roztokmi HCl (1%) a NaOH (1%). Získané spektrá boli následne korigované na zriedňovanie (bol učený samostatný experiment bez prítomnosti Gd-L^M). Sledované emisné maximá (obrázok 59 a 60) boli vyhodnotené pomocou upravenej Scatchardovej rovnice (101), ktorá je uvedená ako rovnica [33], a získané počty väzobných miest a veľkosti afinitných konštánt sú porovnané v tabuľke 29. Hodnoty zaťažené hrubou chybou (veľkosť intenzity fluorescence vyššia s Gd-L^M než bez prídavku zhášadla i po korekčných úpravách) boli vylúčené z vyhodnotenia. Výhodou upraveného Scatchardového vynesenia je, že výpočet zahŕňa len celkové koncentrácie prídavaných zložiek a nie koncentrácie voľných zložiek.

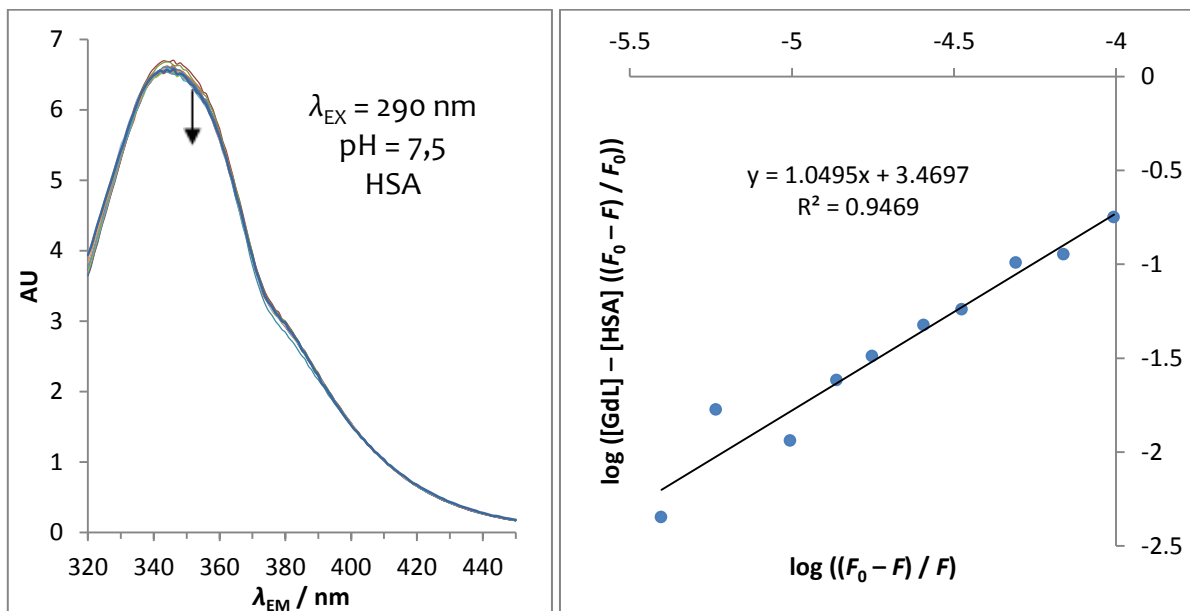
$$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \log K_{af} + n \log \left\{ [\text{Gd(L)}]_t - [\text{HSA}]_t \left(\frac{F_0 - F}{F_0} \right) \right\} \quad [33]$$

F_0 je hodnota maxima fluorescence (bez prídavku zhášadla Gd-L alebo údaj s najmenšou koncentráciou zhášadla), F je hodnota maxima fluorescence, n je počet väzobných miest, K_{af} je afinitná konštanta interakcie, index „t“ značí celkovú koncentráciu, $[\text{Gd(L)}]$ je koncentrácia zhášadla a $[\text{HSA}]$ značí koncentráciu proteínu (miesta fluorescence).

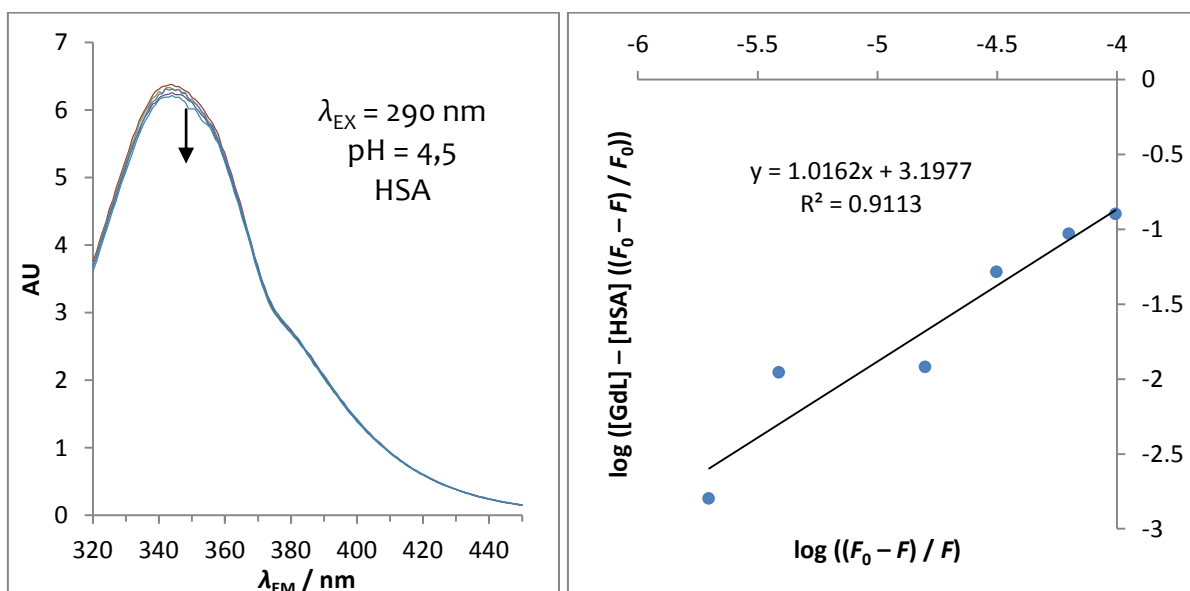
Zo získaných hodnôt (tabuľka 29) sa dá usúdiť, že komplex Gd-L^M interaguje s jedným miestom HSA a veľkosť tejto interakcie je závislá na hodnote pH. Pri hodnote pH = 7,5 (fyziologické pH) je komplex vo forme $[\text{Gd(L}^{\text{M}})]^-$ a látka, resp. jej dibenzylamino skupina, je schopná slabej interakcie s HSA, a pri pH = 4,5, kde je komplex prítomný vo forme $[\text{Gd(HL}^{\text{M}})]$, afinita komplexu, resp. dibenzylamónnej skupiny, k HSA je znížená o tretinu. Tieto údaje sú kvalitatívne zhodné s výsledkami relaxometrickej titrácie roztoku HSA s komplexom Gd-L^M, a teda potvrdzujú pH senzitivnú interakciu týchto dvoch foriem látky.

Tabuľka 29

pH (bez pufrovania pH)	Forma komplexu	n	K_{af} (Gd-L ^M s HSA)
7,5	[Gd(L ^M)] ⁻	1,05	2023
4,5	[Gd(HL ^M)]	1,02	1402



Obrázok 59 – pokles intenzity fluorescence HSA po konsekutívnom prídavku [Gd(L^M)]⁻ pri pH = 7,5 (vľavo) a upravené Scatchardovo vynesenie interakcie [Gd(L^M)]⁻ s HSA pri pH = 7,5 (vpravo)



Obrázok 60 – pokles intenzity fluorescence HSA po konsekutívnom prídavku [Gd(HL^M)] pri pH = 4,5 (vľavo) a upravené Scatchardovo vynesenie interakcie [Gd(HL^M)] s HSA pri pH = 4,5 (vpravo)

Pre určenie konkrétneho miesta interakcie komplexu $Gd-L^M$ s HSA boli využité fluorescenčné molekuly viažuce sa do špecifického miesta HSA a fluorescenčná inhibičná titrácia. Zmes fluorescenčnej látky a HSA v pomere 1 : 1 bola titrovaná konsekutívnymi prídavkami $Gd-L^M$, čím bola zapríčinená disociácia fluorescenčnej látky (kompetícia o väzobné miesto) a posun jej fluorescenčného maxima mimo sledovanú oblasť, t.j. zníženie sledovej intenzity fluorescencie.

Látka ANS (8-anilíno-1-naftalénsulfonát amónny, obrázok 28) je schopná interagovať s hydrofóbnymi miestami I a zároveň II HSA (s oboma hydrofóbnymi kavitami, $K_{af} \sim 10^6$ (102)). Znížením intenzity fluorescencie látky ANS viazanej k HSA pridaním $Gd-L^M$ bolo dokázané, že gadolinitý komplex sa viaže práve do hydrofóbného miesta HSA (obrázok 61 a 65). Analýzov kompetitívnych inhibičných titrácií pri dvoch hodnotách pH (dva pufrý) upraveným Scatchardovým vynesím bola potvrdená pH senzitivna veľkosť afinitnej konštanty (tabuľka 30). Avšak z vyhodnotenia museli byť vylúčené body o najnižšej koncentrácii $Gd-L^M$ (pod 0,3 ekv. k HSA, resp. ANS) pre dosiahnutie zmyslupnosti výsledkov ($n > 0,7$). Tieto body obsahujú príliš veľkú chybu a sú nevhodné pre ich definovanie ako F_0 , a tým pre ďalšie výpočty.

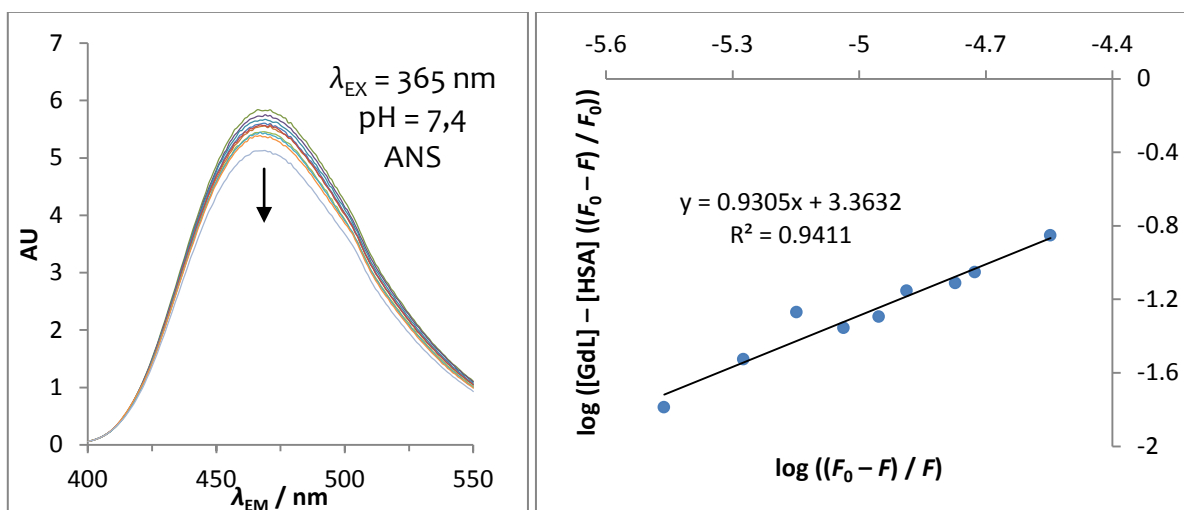
Výber kavity HSA, s ktorou $Gd-L^M$ hydrofóbné interaguje, bolo učené fluorescenčnou inhibičnou titráciou s prítomnou látkou DSa (dansylamid, obrázok 28), ktorý sa viaže do hydrofóbného miesta I ($K_{af} \sim 10^5$ (103)), alebo DSg (dansylglycín, obrázok 28), schopný interakcie s hydrofóbnym miestom II ($K_{af} \sim 10^5$ (104)). Intenzita fluorescenčného maxima poklesla po konsekutívnych prídavkoch Gd^{3+} komplexu do zmesi HSA : DSg = 1 : 1 (obrázok 63 a 67) a naopak vzrástla po pridaní do zmesi HSA : DSa = 1 : 1 (obrázok 62 a 66). Pozorované skutočnosti potvrdzujú interakciu látky $Gd-L^M$ s hydrofóbnym miestom II HSA, ktorá bola získaná z relaxometrickej inhibičnej titrácie. Vzrast intenzity fluorescencie DSa po pridaní $Gd-L^M$ je zapríčinený alosterickou modifikáciou proteínu a už bol pozorovaný (naviazanie látky do miesta II viedlo k zvýšeniu intenzity fluorescencie fluorescenčnej látky viazanej v mieste I (105)). Vyhodnotením titrácií s upraveným Scatchardovým vynesím boli opäť potvrdená pH závislosť veľkosti afinitnej konštanty K_{af} . Z vyhodnotenia boli opäť vylúčené body s $[Gd-L^M] < 0,3$ ekvivalentov k HSA.

Obdobný titračný experiment so sledovaním fluorescencie bol učený i bez prítomnosti inhibítora, no v roztoku s pufrom (obrázok 64 a 68). Po vyhodnení (tabuľka 30) a porovnaní s tabuľkou 29 je možné tvrdiť, že zvýšenie iónovej sily roztoku má za následok zníženie afinitnej konštanty $Gd-L^M$ k HSA pri oboch hodnotách pH. Dôvodom by mohli byť zmeny na molekule HSA zapríčinené iónovými interakciami, ktoré sú prítomné i *in vivo*, alebo spomalenou kinetikou vzniku asociátu (t.j. meranie neprebehlo na zmesi v rovnováhe).

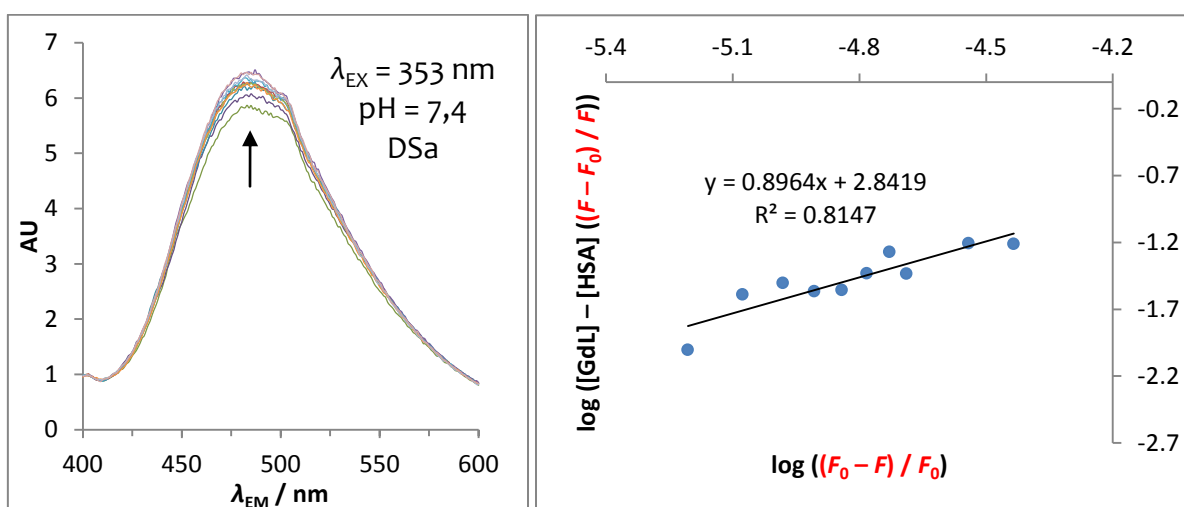
Tabuľka 30 (nie sú uvedené chyby, pre K_{af} sú približne rádovo 10^2-10^3)

Pufor	Inhibítor	Miesto interakcie látky s HSA	n	K_{af} (miesto II, Gd-L ^M s HSA)
PBS (pH = 7,4)	ANS	I + II	0,93	4115
	DSa	I	(0,90)*	(1480)*
	DSg	II	0,91	1450
	Bez inhibítora	(I + II)	0,86	1227
SSC (pH = 4,5)	ANS	I + II	0,71	784
	DSa	I	(0,87)*	(1151)*
	DSg	II	0,94	1254
	Bez inhibítora	(I + II)	0,57	4

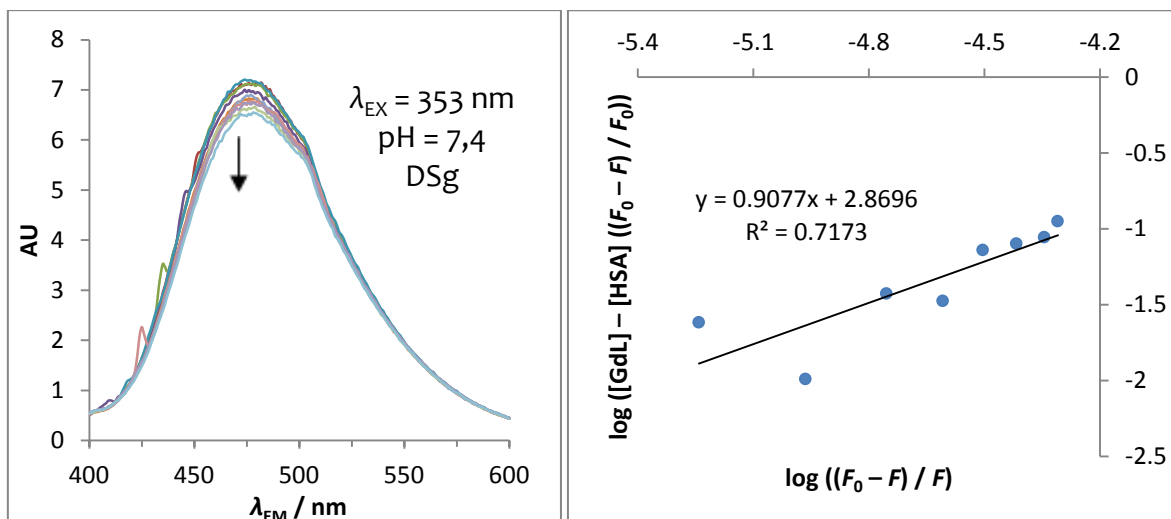
* modifikovaný výpočet afinity k miestu II vďaka princípu alosterickej inhibície



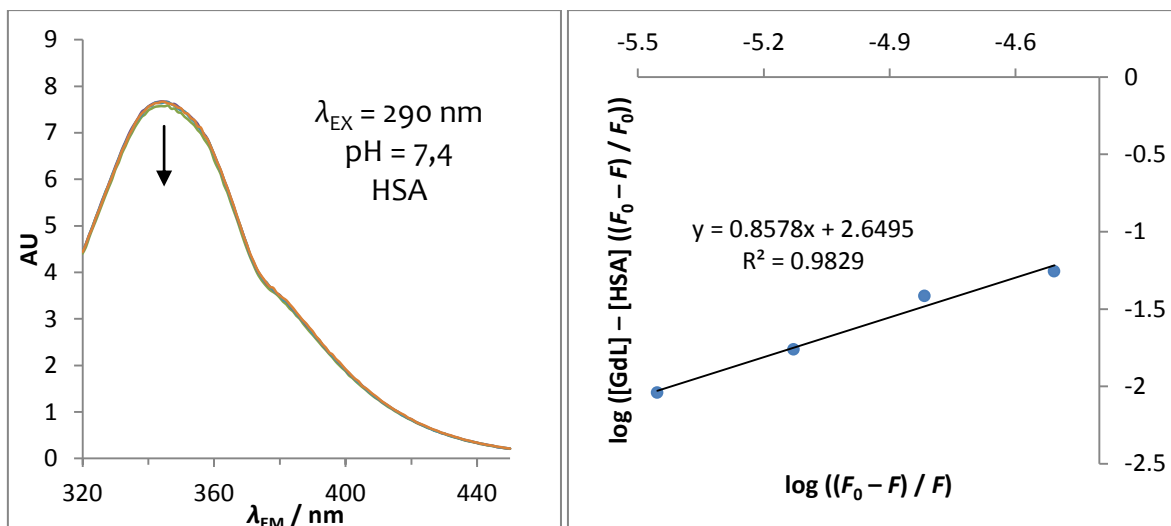
Obrázok 61 – znižovanie intenzity fluorescence látky ANS viazanej k HSA (miesto I a miesto II) prídavkom $[Gd(L^M)]^-$ v roztoku pufovanom s PBS (vľavo) a bilancia pozorovaného deja upraveným Scatchardovým vyhodnotením (vpravo)



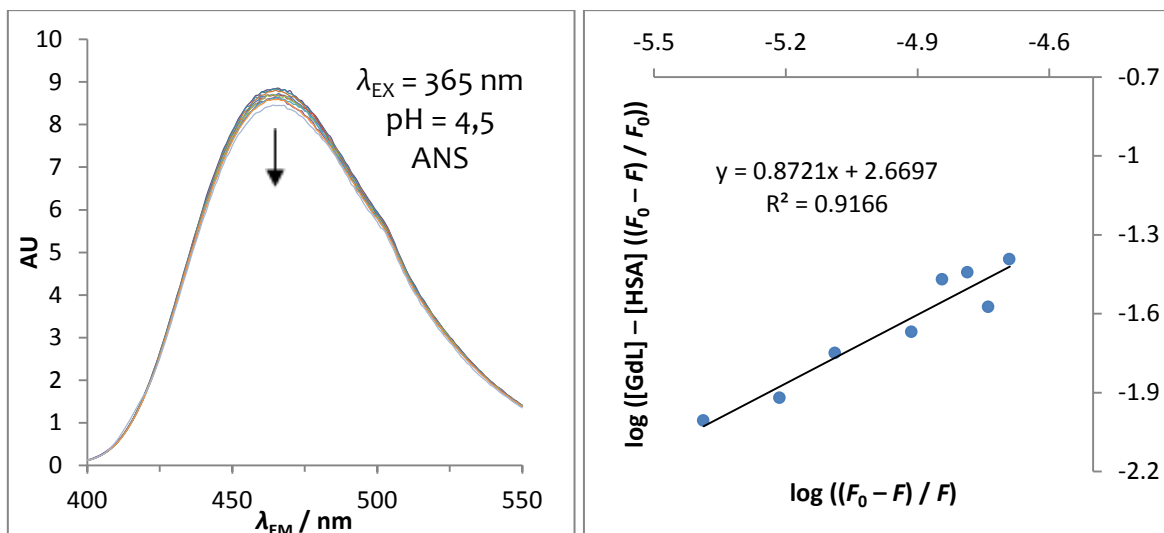
Obrázok 62 – zvyšovanie intenzity fluorescence látky DSa viazanej k HSA (miesto I) prídavkom $[Gd(L^M)]^-$ v roztoku pufovanom s PBS (vľavo) a bilancia pozorovaného deja novo upraveným Scatchardovým vyhodnotením pre alosterickú inhibíciu (vpravo)



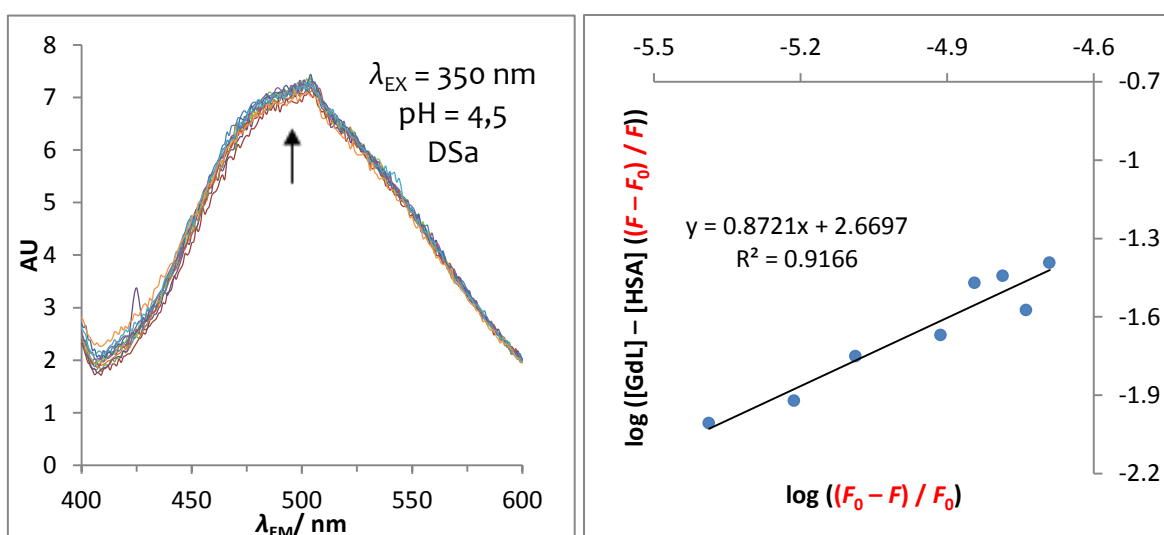
Obrázok 63 – znižovanie intenzity fluorescence látky DSg viazanej k HSA (miesto II) prídavkom $[\text{Gd}(\text{L}^{\text{M}})]^-$ v roztoku pufovanom s PBS (vľavo) a bilancia pozorovaného deja upraveným Scatchardovým vyhodnotením (vpravo)



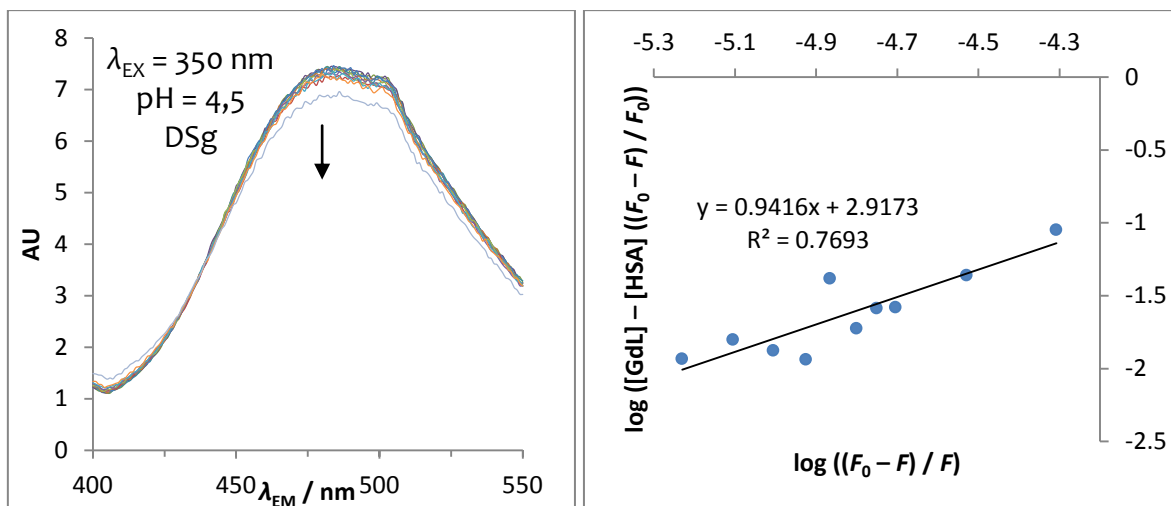
Obrázok 64 – znižovanie intenzity fluorescence HSA prídavkom $[\text{Gd}(\text{L}^{\text{M}})]^-$ v roztoku pufovanom s PBS (vľavo) a bilancia pozorovaného deja upraveným Scatchardovým vyhodnotením (vpravo)



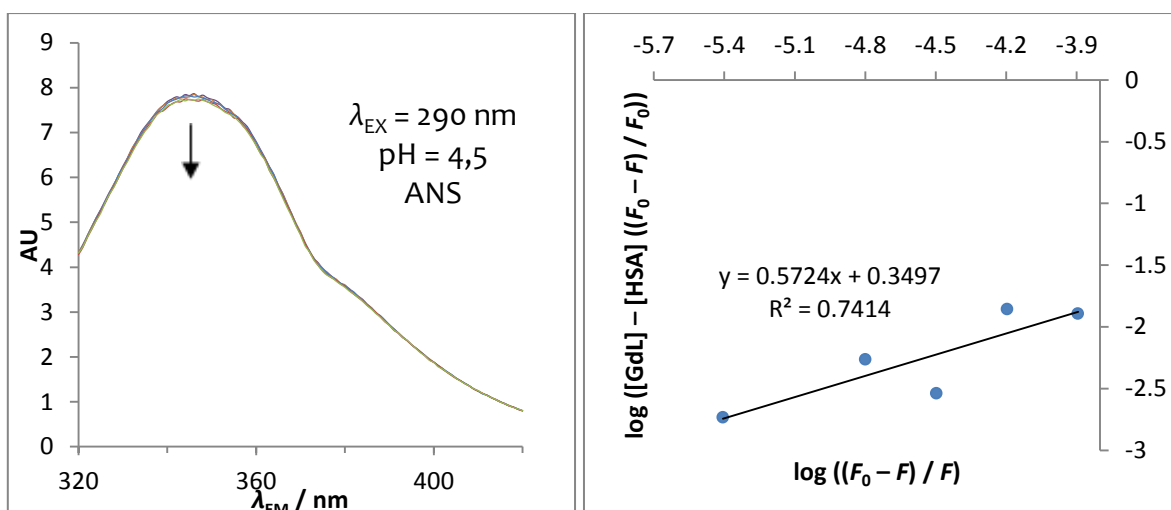
Obrázok 65 – znižovanie intenzity fluorescence látky ANS viazanej k HSA (miesto I a miesto II) prídavkom $[Gd(HL^M)]$ v roztoku pufovanom s SSC (vľavo) a bilancia pozorovaného deja upraveným Scatchardovým vyhodnotením (vpravo)



Obrázok 66 – zvyšovanie intenzity fluorescence látky DSa viazanej k HSA (miesto I) prídavkom $[Gd(HL^M)]$ v roztoku pufovanom s SSC (vľavo) a bilancia pozorovaného deja novo upraveným Scatchardovým vyhodnotením pre alosterickú inhibíciu (vpravo)



Obrázok 67 – znižovanie intenzity fluorescence látky DSG viazanej k HSA (miesto II) prídavkom $[Gd(HL^M)]$ $Gd-L^M$ v roztoku pufovanom s SSC (vľavo) a bilancia pozorovaného deja upraveným Scatchardovým vyhodnotením (vpravo)

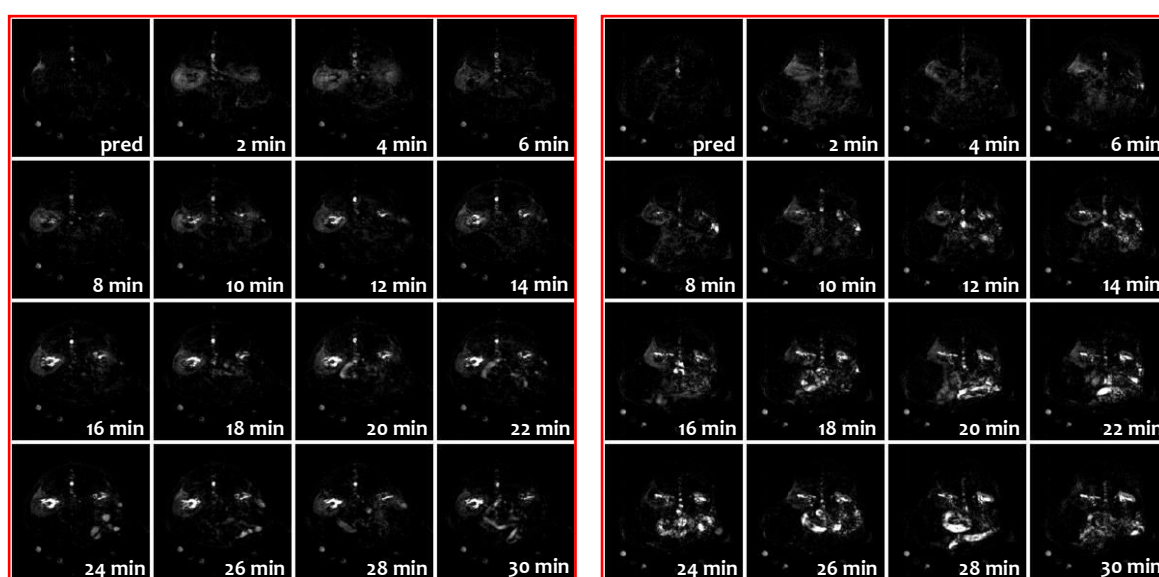


Obrázok 68 – znižovanie intenzity fluorescence HSA prídavkom $[Gd(HL^M)]$ v roztoku pufovanom s SSC (vľavo) a bilancia pozorovaného deja upraveným Scatchardovým vyhodnotením (vpravo)

Z fluorescenčných (inhibičných) titrácií HSA (a inhibítora) s $Gd-L^M$ sa dá vo výsledku usúdiť, že Gd^{3+} komplex interaguje s hydrofóbnou kavitou II HSA a afinita k tomuto miestu je pH závislá. Veľkosť K_{af} je vo fyziologickom pH rovná 10^2 – 10^3 (omnoho nižšia než hodnota K_{af} pre použité fluorescenčné látky) a pri zníženom pH, čo odpovedá forme komplexu $[Gd(HL^M)]$, je K_{af} približne polovičná. Za zmenu veľkosti K_{af} môže výlučne len protonizácia pendantnej amino skupiny a je známe, že protonizované alifatické amíny majú veľmi nízku afinitu k hydrofóbnym kavitám HSA (106). Vysvetlením by bola prítomnosť kladne nabitých zvyškov aminokyselín na povrchu hydrofóbných miest (konkrétne Arg218, Arg220 a Arg 257 v mieste I a Arg410 v mieste II (99)), a tým sú protonizované amino skupiny elektrostaticky vypudzované z daného miesta. Naopak, záporne nabité skupiny s blízkym hydrofóbnym pendantom (viď štruktúra látky Ablavar[®]) môžu zvýšiť afinitu (veľkosť K_{af}) k týmto miestam.

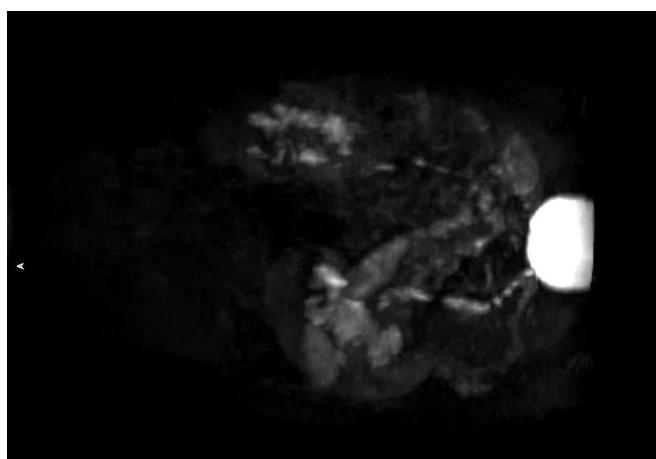
4.7 Experimenty in vivo

Teoretické vlastnosti T_1 -kontrastnej látky Gd- L^M , t.j. vyššia relaxivita r_{1p} než klinicky používané T_1 -kontrastné látky (napr. Dotarem[®]) a polčas vylučovania oproti nim predĺžený, no nie tak dlhý ako pre látku Ablavar[®], boli testované na zvieracom modeli in vivo. Z porovnania MR snímok na obrázku 69 boli tieto predikované vlastnosti potvrdené. Nešpecifická T_1 -kontrastná látka Dotarem[®] má nižšiu relaxivitu r_{1p} a je vylučovaná najrýchlejšie spomedzi porovnávaných (107). Látka Ablavar[®] má relaxivitu r_{1p} porovnateľnú s Gd- L^M in vivo, no jej rýchlosť vylučovania je omnoho nižšia. Komplex Gd- L^M kombinuje stabilitu a inertnosť látky Dotarem[®] (merania in vitro) a zvýšenú relaxivitu a predĺžený exkrekčný čas látky Ablavar[®] (merania in vivo).



Obrázok 69 – abdominálne MR snímky myši pred podaním a po 2, 4, 6,..., 30 min od podania T_1 -kontrastnej látky Ablavar[®] (vľavo) a Gd- L^M (vpravo), zvýraznená je vylučovacia sústava myši (obličky, močovody a močový mechúr)

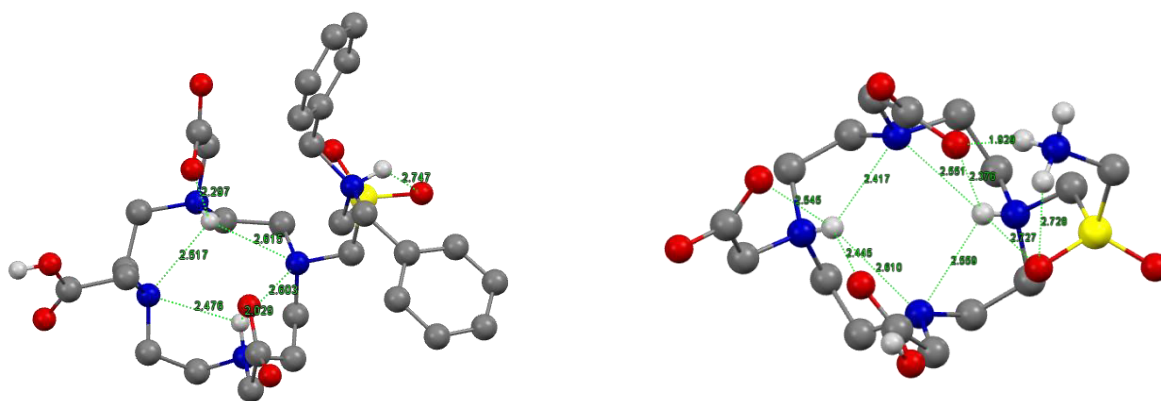
Od T_1 -kontrastnej látky Gd- L^M bol nameraný prvý MRA snímok zameraný na vylučovaciu sústavu (obrázok 70). Z projekcie maximálnej intenzity (MIP) sú zreteľne vidieť obličky (s rozlíšenými glomerulami – miestom aktívnej filtrácie krvi), močovody a močový mechúr.



Obrázok 70 – MR snímok vylučovacej sústavy myši po podaní T_1 -kontrastnej látky Gd- L^M (MIP, z angl. Maximum Intensity Projection)

4.8 Analýza pripravených monokryštálov ligandov a komplexov

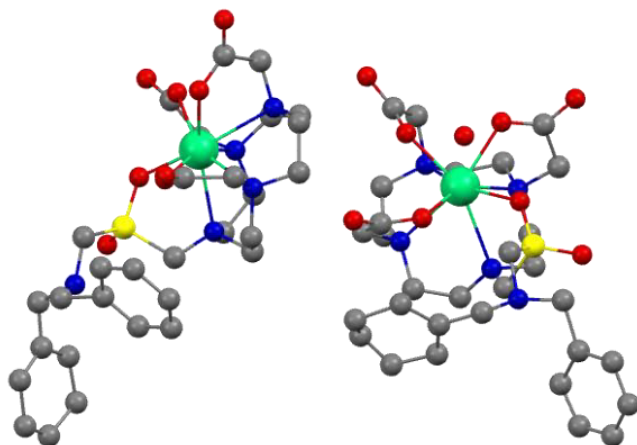
Štruktúru pripravených ligandov v roztoku je možné korelovať so štruktúrou nájdenou v pevnom stave. Systém intramolekulárnych vodíkových väzieb prítomných v monokryštáloch látok nie je presným obrazom toho, čo sa nachádza v roztoku (v roztoku je prítomná rovnováha s inými stavmi). Na obrázku 71 sú znázornené štruktúry ligandov L^M a L^A získané z XRD so zvýraznenými prítomnými H-väzbami. U oboch štruktúr je prítomná typická stabilizácia konformácie makrocyklu protonizáciou dvoch (protiľahlých) amino skupín, ktoré sú navyše pútané H-väzbami s ich pendatnými kyselinami.



Obrázok 71 – štruktúry ligandov $H_4L^M \cdot 7,4H_2O$ (vľavo, zobrazená je jedna poloha prítomného disorderu jednej benzylovej skupiny) a $H_4L^A \cdot HCl \cdot 9,5H_2O$ (vpravo) získané z XRD monokryštálov. Intramolekulárne H-väzby sú zvýraznené zeleno.

U ligandu L^M je vidieť protonizovaný protiľahlý karboxylát a protonizované susedné amino skupiny makrocyklu voči fosforovému pendantu, no ligand L^A má odlišné protonizačné miesta. To môže byť spôsobené primárnou amino skupinou, ktorá dominuje interakcii s príľahlým karboxylátom a ten potom nemôže tvoriť efektívnu H-väzbu s amino skupinou makrocyklu, na ktorú je kovalentne viazaný. Tým je spôsobený presun protónov a protonizačných miest v rámci makrocyklu.

Analýzou XRD štruktúr komplexov $Ln-L^M$ (forma $[Ln(L^M)]^-$ a látky $[Tb(HL^M)]$) a $Ln-L^A$ (vždy forma $[Ln(HL^A)]$) je možné priamo sledovať trendy spôsobené lanthanoidovou kontrakciou. Zmenšovaním komplexovaného Ln^{3+} s pribúdajúcim počtom 4f elektrónov je preferované usporiadanie izoméru SA, ktorý má väčší torzný uhol φ (pootočenie roviny O_4 oproti rovine N_4 , obrázok 75). Avšak približne za polovicou lanthanoidovej série (cca u Dy^{3+}) sa mení koordinačné číslo z 9 na 8 a molekula H_2O prestáva byť koordinovaná k centrálnemu atómu. Tento prechod nie je skokový, ale plynulý. Torzné uhly φ izoméru TSA' odpovedajú izoméru TSA (resp. trendu), no otváracie uhly ω sú pod hodnotou 135° , čo je limitná pre koordináciu H_2O (obrázok 76). Neobyčajným porovnaním hranice medzi izomérom TSA a TSA' je XRD štruktúra komplexu $Er-L^M$ s dvoma nezávislými podjednotkami zobrazená na obrázku 72.



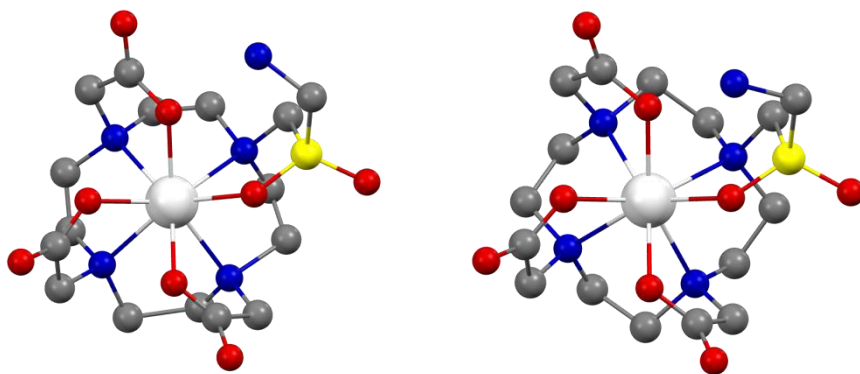
Obrázok 72 – XRD štruktúra Er–L^M s dvoma nezávislými podjednotkami (TSA a TSA')

Izomér TSA prítomný v štruktúre Er–L^M má dĺžku koordinačnej väzby centrálnemu atómu k molekule H₂O až $d = 2,871 \text{ \AA}$, a tým je prítomná skôr pozorovaná slabá interakcia než koordinácia. Otvárací uhol tohto izoméru je $\omega_{\min} = 129,53^\circ$ (menej ako 135° , čo je hraničná hodnota pre koordináciu molekuly H₂O). Už bola pozorovaná postupná zmena izoméru TSA k TSA', resp. zväčšovanie dĺžky „koordinačnej vzdialenosti“ v XRD štruktúrach Ln³⁺ komplexov derivátov ligandu DO₃P (108).

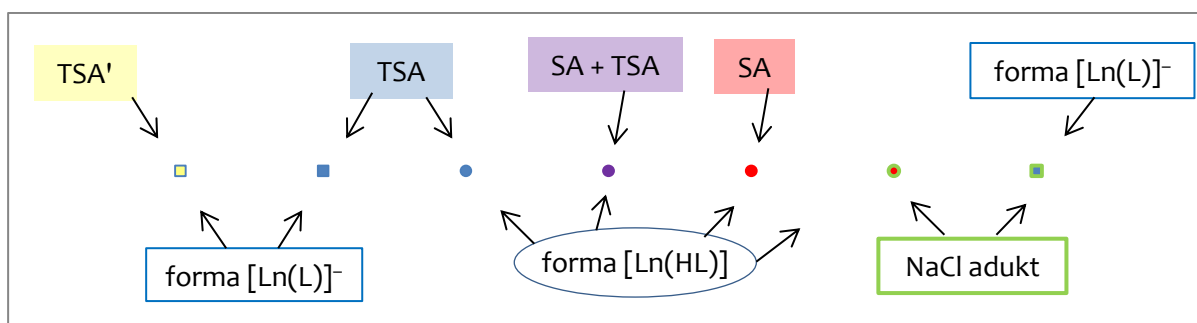
Zmena vzdialenosti koordinovanej molekuly vody od centrálnemu atómu diskutovaných komplexov (graficky zobrazené na obrázku 77) závisí na zmene veľkosti Ln³⁺. Čím sa polomer Ln³⁺ znižuje, tým je povrchový náboj Ln³⁺ väčší a koordinačná väzba s molekulou H₂O skrátaná. Prítomnosť látky NaCl v XRD štruktúre má vplyv na pozorovanú dĺžku väzby (na usporiadanie kryštálu). Labilizácia koordinovanej molekuly H₂O, t.j. zvýšené zastúpenie izoméru TSA', sa prejaví i predĺžením tejto koordinačnej väzby. XRD štruktúry potvrdzujú vyššie diskutovaný hydratačný zlom prítomný v rade komplexov [Ln(L^M)]⁻ medzi [Gd(L^M)]⁻ a [Tb(L^M)]⁻ a v rade [Ln(HL^A)] u [Dy(HL^A)] a [Ho(HL^A)].

Vzdialenosť pendantného ramena u komplexov Ln–L^A s primárnou amino skupinou sa od centrálnemu atómu a koordinovanej molekuly H₂O prakticky nemení a zmena vzdialenosti nebola pozorovaná ani medzi izoméromi SA a TSA v rámci jedného komplexu.

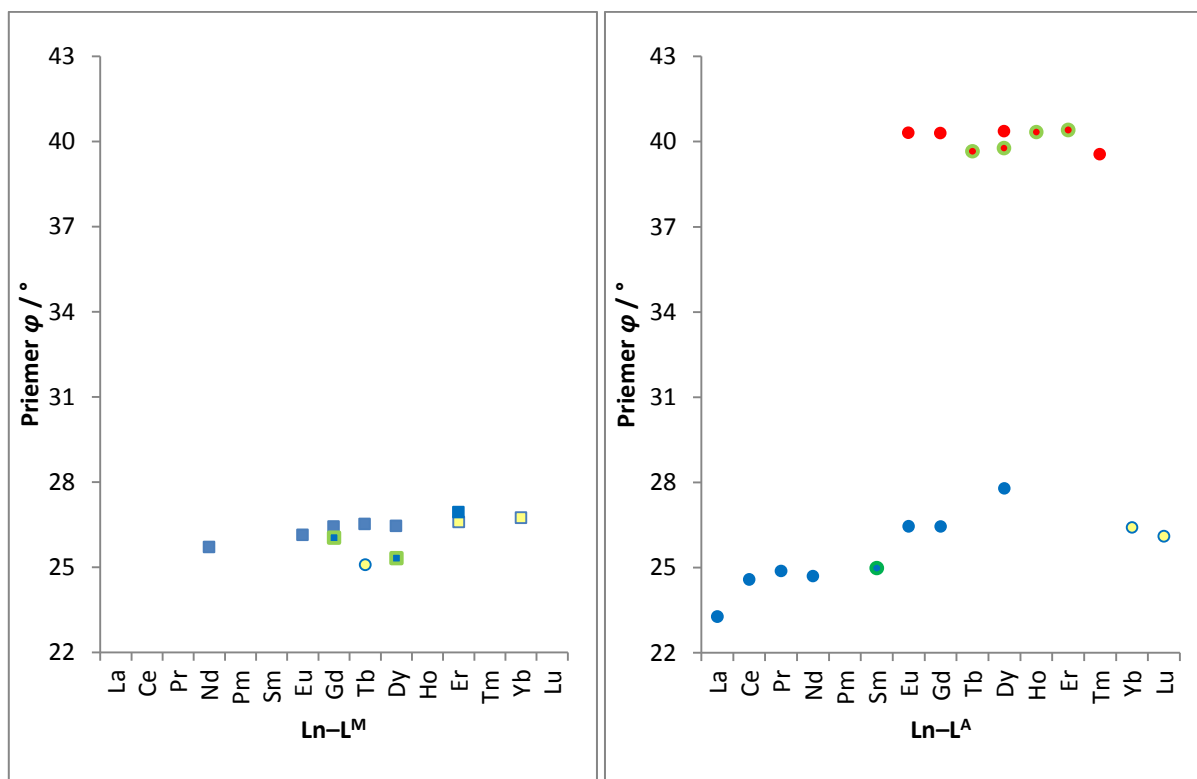
Taktiež boli získané i XRD štruktúry komplexov ligandu L^A s lanthanoidom podobnými kationmi – Y³⁺ a Sc³⁺. Y³⁺ je veľkostne podobné s Dy³⁺ a i ich XRD štruktúry komplexov s ligandom L^A sú si veľmi podobné (takmer totožné väzobné vzdialenosti a torzné a otváracie uhly). Raritou je XRD štruktúra komplexu Sc–L^A, ktorá obsahuje dve nezávislé podjednotky, a to izoméry SA' a TSA' (Sc³⁺ je ďaleko menší ako Lu³⁺). Toto je vzácny prípad pozorovanej TSA' štruktúry Sc³⁺ komplexu makrocyclického ligandu (109), iba druhýkrát pozorovaný izomér SA' Sc³⁺ komplexu makrocyclického ligandu (110) a prvý prípad vôbec súčasného pozorovania izomérov SA' a TSA' v rámci jedného komplexu v jednej XRD štruktúre.



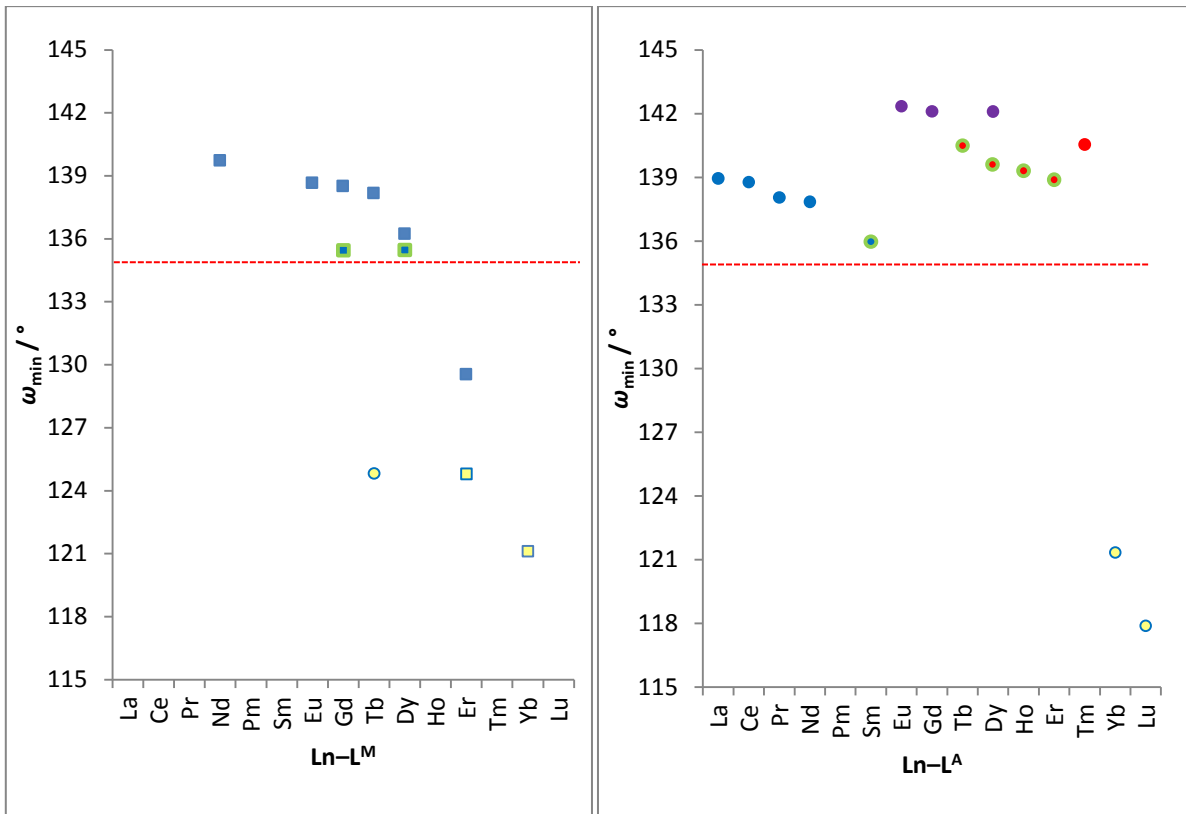
Obrázok 73 – XRD štruktúra Sc-L^A s dvoma nezávislými podjednotkami – SA' (vľavo) a TSA' (vpravo)



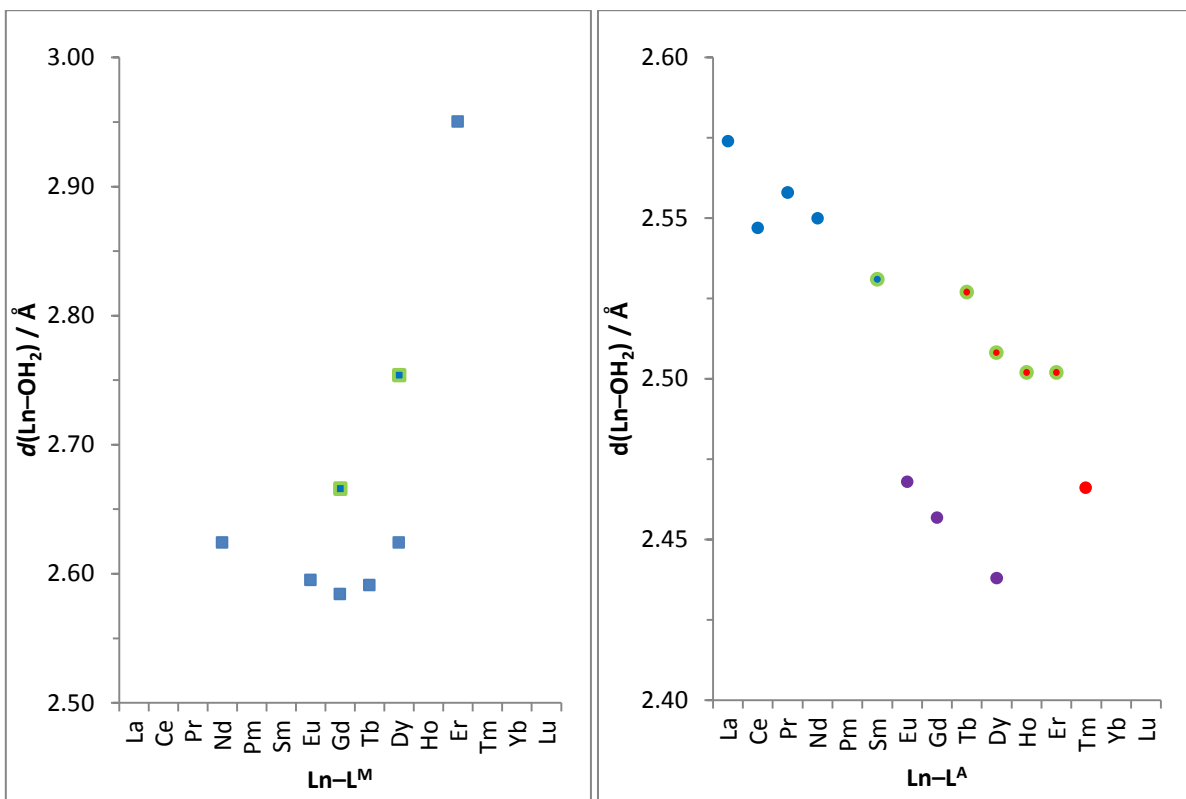
Obrázok 74 – spoločná legenda k obrázkom 77-79



Obrázok 75 – vyhodnotenie torzných uhlov φ z XRD štruktúr Ln-L^M (vľavo) a Ln-L^A (vpravo)



Obrázok 76 – vyhodnotenie otváracích uhlov ω z XRD štruktúr Ln-L^M (vľavo) a Ln-L^A (vpravo)

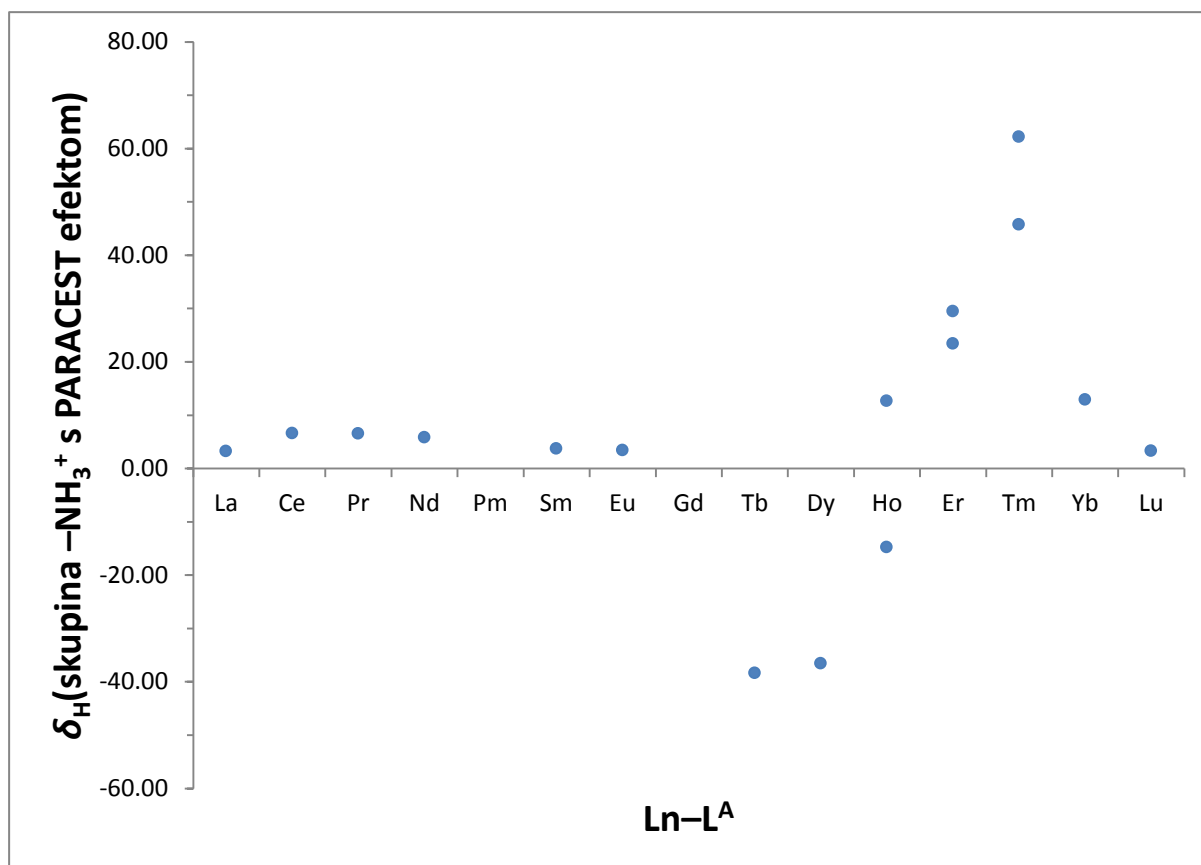


Obrázok 77 – vyhodnotenie dĺžky koordinačnej väzby Ln^{3+} k H_2O z XRD štruktúr Ln-L^M (vľavo) a Ln-L^A (vpravo)

4.9 PARACEST experimenty

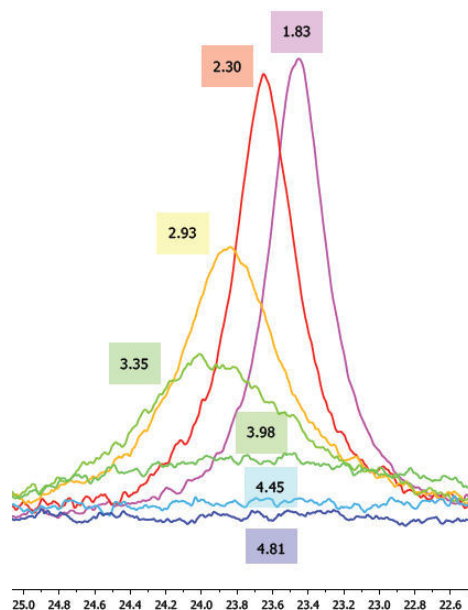
Z diferencie $^1\text{H-NMR}$ spektier komplexov Ln-L^{A} rozpustených v H_2O a v D_2O ($\text{pH} \sim 3,5$) bola určená pozícia primárnej amino skupiny (skupina $-\text{NH}_3^+$ poskytuje $^1\text{H-NMR}$ signál, ale skupina $-\text{ND}_3^+$ nie, obrázok 78). Z priebehu je vidieť, že δ_{H} sú ovplyvnené lanthanoidom indukovaným posunom (LIS, z angl. Lanthanide Induced Shift) a skupina s vymeniteľnými protónmi je najviac vzdialená od signálu rozpúšťadla (H_2O) u komplexov Ln^{3+} s najväčšími hodnotami magnetických momentov, t.j. Tb^{3+} – Tm^{3+} .

Avšak od Ho^{3+} , Er^{3+} a Tm^{3+} komplexu ligandu L^{A} rozpusteného v H_2O sú v $^1\text{H-NMR}$ spektre pozorované dva signály neprítomné v $^1\text{H-NMR}$ s D_2O (pH a $\text{pD} \sim 3,5$, obrázok 78). Vysvetlením môže byť zmena geometrie komplexu po strate koordinovanej molekuly H_2O (hydratačný zlom je medzi Dy-L^{A} a Ho-L^{A} vo forme komplexu $[\text{Ln}(\text{HL}^{\text{A}})]$), a tým je pendantné rameno reorientované do inej pozície a chemický posun mierne modifikovaný. Integračné hodnoty týchto $^1\text{H-NMR}$ signálov veľmi dobre odpovedajú zastúpeniu izomérov SA a TSA + TSA', ktoré bolo zistené z $^{31}\text{P-NMR}$ spektier. U komplexov Yb-L^{A} a Lu-L^{A} je pozorovaný len jeden signál skupiny $-\text{NH}_3^+$ pravdepodobne pre prekryv jedného s blízkym signálom H_2O (u Yb-L^{A} sú náznaky jeho polohy s $\delta_{\text{H}} \sim 2$ ppm).



Obrázok 78 – chemický posun δ_{H} primárnej amino skupiny, resp. signálu s PARACEST efektom, komplexov Ln-L^{A} , referencované na $\delta_{\text{H}}(\text{H}_2\text{O}) = 0,00$ ppm

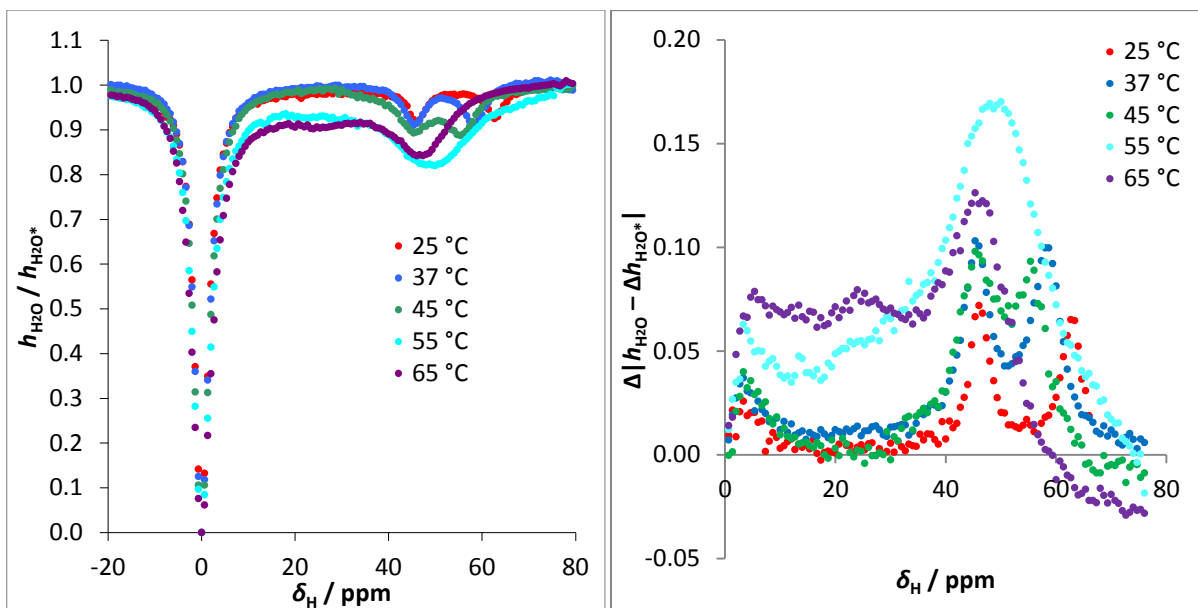
Už (^1H -)NMR titrácie komplexov Ln-L^{A} predpovedali pH závislý výskyt PARACEST efektu. ^1H -NMR signál skupiny $-\text{NH}_3^+$ komplexu Yb-L^{A} sa mení so zmenou hodnoty pH (obrázok 79). Variabilná pološírka signálu naznačuje rôznu veľkosť rýchlosti výmeny vymeniteľných protónov. Pod pH cca 2 je výmena ^1H s okolitou H_2O príliš pomalá (úzky signál) a nad pH cca 5 je výmena príliš rýchla (široký signál). Toto pozorovanie odpovedá i PARACEST experimentom, kde je tento efekt sledovaný len v rozmedzí hodnôt pH ~ 2 – 5 . Zjavne pri týchto hodnotách pH je optimálna rýchlosť výmeny ^1H amino skupiny s okolitými molekulami vody a PARACEST efekt je pozorovaný.



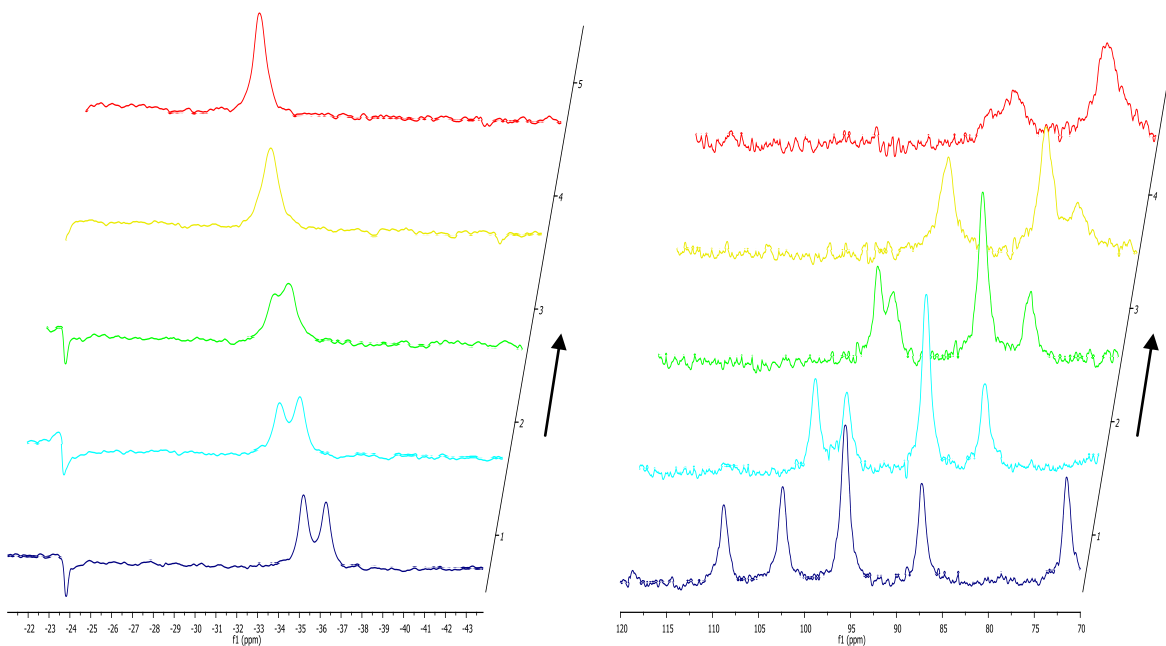
Obrázok 79 – ^1H -NMR signál skupiny $-\text{NH}_3^+$ komplexu Yb-L^{A} v roztoku s meniacou sa hodnotou pH (zvýraznená), závislosť intenzity signálu na δ_{H} / ppm

Veľkosť PARACEST efektu (spočítaná z MTR vyhodnotenia) je pre amino skupiny dostatočne vzdialené od signálu H_2O (t.j. Ln-L^{A} , kde $\text{Ln} = \text{Ho-Yb}$) len niekoľko percentná (do 10 % zníženia intenzity signálu H_2O po saturácii $-\text{NH}_3^+$ skupiny). Zmena intenzity H_2O je nízka a nutná hodnota pH je mimo fyziologickej oblasti, a teda využiteľnosť PARACEST efektu týchto látok *in vivo* je minimálna.

Intenzívnejšie bol skúmaný PARACEST efekt komplexu Tm-L^{A} s dvoma veľmi odľahlými signálmi $-\text{NH}_3^+$ skupiny od signálu H_2O . Po zahriatí vzorky je možné sledovať koalescenciu týchto signálov pri teplote $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$ (obrázok 80). Že sa skutočne jedná o koalescenciu izomérov SA a TSA + TSA' bolo sa uistené z teplotne závislých ^1H -NMR spektier (obrázok 81). Avšak i po tejto koalescencii PARACEST efekt dosahuje stále malého zníženia intenzity signálu H_2O , i keď chemický posun δ_{H} primárnej amino skupiny je ohromný.



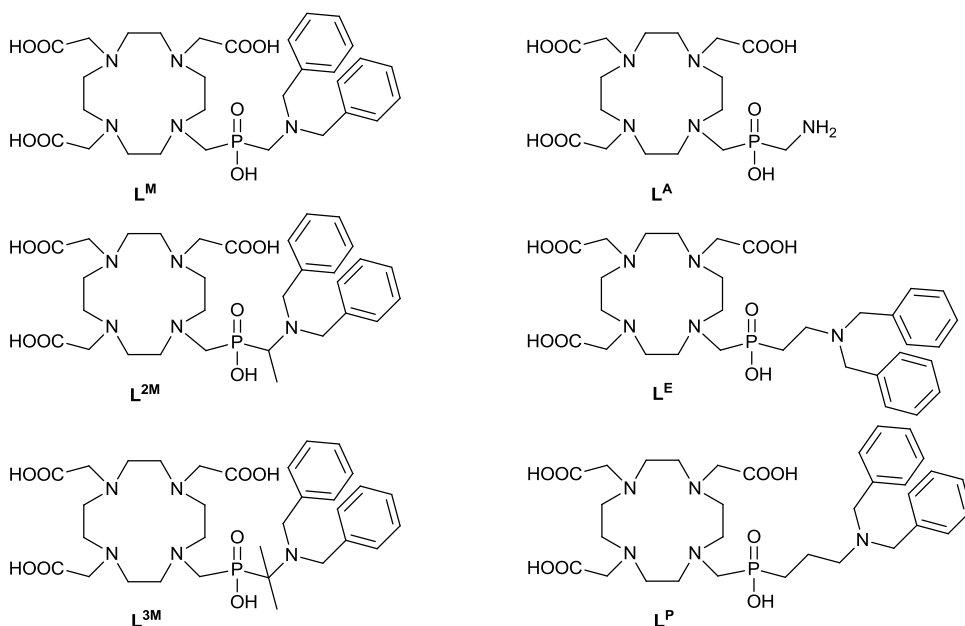
Obrázok 80 – Z-spektrá látky Tm-L^A s variabilnou teplotou (vľavo) a MTR vyhodnotenie (vpravo)



Obrázok 81 – teplotne závislé ¹H-NMR spektrá komplexu Tm-L^A, kde je pozorovateľná koalescencia izomérov SA a TSA + TSA', šípka znázorňuje zvyšujúcu sa teplotu

5. Záver

Počas tejto diplomovej práce boli synteticky pripravené ligandy L^M , L^A , L^E a L^P v dostatočnom množstve a čistote pre ich charakterizáciu a ligandy L^M a L^A boli taktiež pripravené vo forme monokryštálov vhodných na röntgenoštruktúrnú analýzu. Ligandy L^{2M} a L^{3M} , resp. prekurzory ligandu L^{3M} , sú pravdepodobne hydrolyticky veľmi nestabilné.



Pripravené ligandy L^M , L^A a L^E boli charakterizované NMR titráciou a potenciometrickou analýzou. Jednotlivé sety hodnôt pK_A získané oboma metódami sú vo veľmi dobrej zhode. Pre ligand L^P boli získané hodnoty pK_A len NMR titráciou pre jeho nedostatočné množstvo a čistotu pre potenciometrickú titráciu.

Lanthanoidité komplexy odvodené od ligandov L^M a L^A a Sc^{3+} a Y^{3+} od ligandu L^A boli pripravené, charakterizované röntgenodifrakčnou analýzou a získané NMR spektrá pri rôznych hodnotách pH. Zo získaných údajov boli zistené zastúpenia izomérov SA a TSA + TSA' a pravdepodobný zlom hydratácie v Ln^{3+} sérii komplexov. Ďalej od europitých komplexov (formy $[Eu(HL)]$ a $[Eu(L)]^-$) boli namerané vysokorozlíšené UV-VIS spektrá, kde boli potvrdené častice s hodnotou parametru $q = 1$, a spolu s terbitými komplexami ligandov boli látky skúmané luminiscenčne. Vypočítané hodnoty parametru q z luminiscenčných meraní neodpovedajú približne jednej koordinovanej molekuly vody, no to je pravdepodobne spôsobené interferenciou koordinovanej molekuly vody s blízkou amino skupinou (môže nastávať prenos energie cez intramolekulárnu vodíkovú väzbu). Dy^{3+} komplexy ligandov L^M a L^A boli skúmané ^{17}O -NMR a veľkosť smernice sklonu lineárnej regresie hodnôt δ_0 na koncentrácii Dy^{3+} naznačuje, že formy komplexov ($[Dy(HL^M)]$ a $[Dy(L^M)]^-$) majú rôzne hodnoty $q \leq 1$ a komplexy $[Dy(HL^A)]$ a $[Dy(L^A)]^-$ majú $q \sim 1$. Skúmané metódy zistenia hodnoty q ukazujú na zlom hydratačnej izomérie medzi $[Tb(HL^M)]$ a $[Dy(HL^M)]$, medzi $[Gd(L^M)]^-$ a $[Tb(L^M)]^-$, medzi $[Dy(HL^A)]$ a $[Ho(HL^A)]$ a medzi $[Tb(L^A)]^-$ a $[Dy(L^A)]^-$.

Od gadolinitých komplexov ligandov L^M a L^A boli namerané 1H -NMRD profily pri dvoch hodnotách pH (forma látok $[Gd(HL^M)]$ a $[Gd(L^M)]^-$). Z fitovania teplotne závislých 1H -NMRD profilov a ^{17}O -NMR boli získané relaxačné parametre T_1 -kontrastnej látky $Gd-L^M$. Komplex má v jeho deprotonizovanej forme $[Gd(L^M)]^-$ extrémne rýchlu výmenu koordinovanej vody ($\tau_M = 6$ ns), čo môže byť zapríčinené stericitou blízkej pendantnej amino skupiny, flexibilitou počiatku premeny TSA na TSA' alebo disociatívnym mechanizmom výmeny koordinovanej molekuly vody. Rozdiely nameraných relaxív $Gd-L^M$ v jeho formách $[Gd(HL^M)]$ a $[Gd(L^M)]^-$ sú ovplyvnené rozdielnou rýchlosťou výmeny vody (teplotné ^{17}O -NMR), odlišným zastúpením izomérov SA a TSA + TSA' (NMR titrácie $Ln-L^M$) a prítomnou blízkou molekulou vody v druhej hydratačnej sfére komplexu $[Gd(HL^M)]$.

U látky $Gd-L^M$ bola potvrdená hydrofóbná interakcia s makromolekulou HSA, konkrétne s kavitou miesta II, relaxometricky s prítomným inhibítorom aj fluorescenčným meraním. Relaxivita suprakomplexu $[Gd(L^M)]^-$ -HSA $r_1^b = 52 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a je teoreticky 8,5-násobná pri 20 MHz, 25 °C a pH = 7,0, avšak látka $[Gd(L^M)]^-$ je pri koncentrácii 0,2 mM a $[HSA] \sim 0,9$ mM viazaná len zo 40 % (čo odpovedá priemernej relaxivite „ $r_1 = 24 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ “).

pH-senzitívny chemický posun ^{31}P komplexov $Ln-L^A$ je markatný, no hodnoty pK_A (cca 8,6) sú mimo fyziologickej oblasti a teda látky sú ako pH senzory nevyužiteľné *in vivo*. Tieto komplexy vykazujú PARACEST efekt primárnej amino skupiny, no jeho použitie je veľmi obmedzené. Merateľný PARACEST efekt je len rozmedzí pH 2–5. Pravdepodobnou príčinou je práve optimálna rýchlosť výmeny 1H skupiny $-NH_3^+$ s protónmi molekúl H_2O práve v tomto rozmedzí pH.

Navrhnuté ligandy L^E a L^P majú hodnotu pK_A pendantnej amino skupiny príliš vysokú ($pK_A([H_3L^E]) = 8,1$ a $pK_A([H_3L^P]) \sim 8,3$). Je možné predpokladať, že Gd^{3+} komplexy odvodené od týchto ligandov by boli už pri fyziologickej hodnote pH prítomné vo forme $[Gd(HL)]$, ktorá neinteraguje s hydrofóbnymi kavitami HSA. Avšak tieto ligandy sú prekursorami pre ligandy s primárnou amino skupinou, ktoré okrem bifunkčnosti a možnému PARACEST efektu primárnej amino skupiny komplexov s Ln^{3+} môžu mať zaujímavé koordinačné vlastnosti pendantnej amino skupiny k centrálnemu atómu. Toho môže byť využité napríklad ako T_1 -kontrastné látky typu „on/off“.

Röntgenoštruktúrna analýza pripravených komplexov (7 pre ligand L^M a 16 pre ligand L^A) potvrdila trendy pozorované v roztoku, akými sú napríklad zlom hydratačnej izomérie (odpovedá meraniam roztokov týchto látok). Ďalej boli získané XRD štruktúry komplexov so súčasťou prítomnosťou izomérov SA a TSA ($[Ln(HL^A)]$, $Ln = Eu, Gd$ a Dy) a XRD štruktúra $[Er(L^M)]^-$ obsahovala dve nezávislé podjednotky a to izomér TSA (s veľmi dlhou koordinačnou väzbou k H_2O) a TSA'. Vzácnosťou je XRD štruktúra Sc^{3+} komplexu látky L^A s dvoma nezávislými podjednotkami – izoméry SA' a TSA'.

Pod'akovanie

Veľké ďakujem patrí rodičom, ktorý ma priviedli na svet, a dovedli až k mojim štúdiám na Přírodovědeckej fakulte Univerzity Karlovy v Praze. Z osadenstva tejto inštitúcie veľmi, v skutku veľmi, ďakujem môjmu školiteľovi doc. Honzovi Kotkovi za vedenie (a vytrpenie / utrpenie / strpenie) mojej práce, niekoľkonásobné opravy nudných cudzojazyčných románov pod názvom Bakalárska a Diplomová práca a, s veľkým dôrazom, pre množstvo XRD dát monokryštálov, ktoré každá jedna prešla (prejde) jeho niekoľkonásobným vypresňovaním. A taktiež sa zároveň ospravedlňujem za (ne)spočetné naliehania (rozumej otravovania) pre posun vpred niektorých experimentov / vypresnení / interpretácii a za „Tam sú neni.“. Ďalej ďakujem prof. Petrovi Hermannovi za postupné prevzatie vedenia mojej práce, za podporu (mnou veľmi cenenú), záujem a motiváciu, cenné konzultácie (medzi ktoré patrilo i, čo sa zatiaľ urobilo, robiť bude, robiť malo, robilo by sa) a počiatočnú ideu ligandov L^M a L^A (t.j. za môj chemický vzostup).

Kolektívu malého labu ďakujem (mimo iné) za spríjemnenie pracovného (občas „pracovného“, ale za to bujného a tvorivého) prostredia – nevymenil by som žiadneho z vás za nikoho iného. Menovite abecedne k našemu kamennému jadru: Honzovi Blahutovi, Honzovi Kotkovi, Terke Krchovej, Maruš Martiniskovej a Monče Paúrovej; a blízkeho okoliu, t.j. veľkému labu (abecedne počínajúc BJ-om a končiac Ondrom Zemkom).

Honzovi ďakujem za meranie spektier na 600-vke a za zaučenie na 400-vke. Maruš a Ondrovi za hmotníky. Zuzke za všetky potenciometrické analýzy. A Terke špeciálne ďakujem i za nameranie všetkých PARACEST experimentov, ktoré boli sčasti publikované v tejto práci a ďalej, hádam, v impaktovanom časopise a pod jej menom. I táto práca by mala mať skôr hlavného autora a podieľajúcich sa.

Doktorke Ivane Císařovej ďakujem a veľmi sa ospravedlňujem za meranie toľkých monokryštálov (a ježkov, tenkých placiiek, zlepenčov,...), prakticky s takmer totožnou štruktúrou (aby som parafrázoval: „Neříkal jste, že byl poslední?!“). A to nehovoriac o večne dizordrovaných benzyloch (rotačno-translačne).

Ďakujem oponentovi, doc. Pavlovi Vojtíškovovi, už i za to, že sa dočítal až sem, na stránku 133, a to v slovenčine. Dúfam, že kvalita tejto práce je (ešte) o niečo vyššia, než si to o nej myslím ja.

Moje ďakujem smeruje i za Aply, konkrétne Prof. Maurovi Bottovi a Dr. Fabiovi Carniatovi, za zámienu napísania ďalších 6 strán (asi tých najpodstatnejších) tejto práce – za získanie 1H -NMRD profilov a ^{17}O -NMR spektier a teda i relaxometrických parametrov látok, ktoré túto prácu (a mňa) významne posunuli vpred (i publikačne). A ďakujem COSTu za financovanie tohto dvojtýžňového zájazdu.

A v neposlednej rade ďakujem (poznámka: 12. ďakujem prítomné na tejto stránke) Vám, milým čitateľom, ktorí ste siahli po tejto publikácii a hádam Vám napokon bola i užitočná.

Bibliografia

1. OECD Health Statistics 2014. [Online] 28. 10 2014. [Datum: 30. 3 2015.] <http://oecd.org/els/health-systems/OECD-Health-Statistics-2014-Frequently-Requested-Data.xls>.
2. The Grove Veterinary Group. [Online] 3. 5 2007. [Datum: 30. 3 2015.] http://www.grovevet.co.uk/assets/images/autogen/a_dogsheadmri.jpg.
3. **De Decker, S., et al.** Intraobserver and interobserver agreement for results of low-field magnetic resonance imaging in dogs with and without clinical signs of disk-associated wobbler syndrome. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2011, Zv. 238, 1, s. 74–80.
4. **Ribeiro, F. Z., et al.** 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.
5. [Online] 24. 3 2015. [Datum: 30. 3 2015.] <http://static.businessinsider.com/image/4fe4e1a16bb3f7edo2000000/image.jpg>.
6. **Kozel, F. A., et al.** Functional MRI Detection of Deception After Committing a Mock Sabotage Crime. *Journal of Forensic Sciences*. 2009, Zv. 54, 1, s. 220–231.
7. **Fuste, D., et al.** Prospective comparison of whole-body 18F-FDG PET/CT and MRI of the spine in the diagnosis of haematogenous spondylodiscitis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015, Zv. 42, 2, s. 264–271.
8. **Alshits, V. I., et al.** Resonant dislocation motion in NaCl crystals in the EPR scheme in the Earth's magnetic field with pulsed pumping. *Physics of the Solid State*. 2013, Zv. 55, 11, s. 2289–2296.
9. A Hands on Introduction to NMR. [Online] Massachusetts Institute of Technology, 9. 1 1997. [Datum: 30. 3 2015.] <http://web.mit.edu/22.920/www/lecture2/lecture02.html>.
10. **Reiser, M. F., Semmler, W. a Hricak, H.** Magnetic Resonance Tomography. 4. vydanie. s.l.: Springer Science & Business Media, 2008, 2.2, s. 17.
11. [Online] 27. 5 2010. [Datum: 30. 3 2015.] http://www.aboutcancer.com/brain_met_mri_2.htm.
12. **Zhou, Z. a Lu, Z.-R.** Gadolinium-based Contrast Agents for Magnetic Resonance Cancer Imaging. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2013, Zv. 5, 1, s. 1–18.
13. **Torres, S., et al.** Gd(III)-EPTAC16, a new self-assembling potential liver MRI contrast agent: in vitro characterization and in vivo animal imaging studies. *NMR in Biomedicine*. 2008, Zv. 21, 4, s. 322–336.
14. **Kattel, K., et al.** A Facile Synthesis, In vitro and In vivo MR Studies of D-Glucuronic Acid-Coated Ultrasmall Ln₂O₃ (Ln = Eu, Gd, Dy, Ho, and Er) Nanoparticles as a New Potential MRI Contrast Agent. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2011, Zv. 3, 9, s. 3325–3334.
15. Department of Radiology. [Online] [Datum: 30. 3 2015.] <https://www.radiology.wisc.edu/fileShelf/contrastCorner/gadcalc.php>.
16. **Van Vleck, J. H.** *The Theory of Electric and Magnetic Susceptibilities*. Oxford: Oxford University Press, 1932. s. 239–261. ISBN-10:0198512430.
17. **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, Series A*. 1996, Zv. 122, 2, s. 179–191.
18. **Kim, H.-K., et al.** Determination of Correlation Times of New Paramagnetic Gadolinium MR Contrast Agents by EPR and 17O NMR. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2009, Zv. 30, 4, s. 849–852.
19. **Funk, A. M.** *Dissecting the theories of lanthanide magnetic resonance*. Durham University. Durham, 2014. s. 57–58, Doctoral Thesis.
20. **Bousquet, J. C., et al.** Gd-DOTA: characterization of a new paramagnetic complex. *Radiology*. 1988, Zv. 166, 3, s. 693–698.
21. **Idee, J.-M., et al.** 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. **Dhingra, K., et al.** Synthesis and characterization of a smart contrast agent sensitive to calcium. *Chemical Communications*. 2008, 29, s. 3444–3446.
23. **Chang, Y.-T., et al.** Synthesis and Characterization of a New Bioactivated Paramagnetic Gadolinium(III) Complex [Cd(DOTA-FPG)(H₂O)] for Tracing Gene Expression. *Bioconjugate Chemistry*. 2007, Zv. 18, 6, s. 1716–1727.
24. **Martell, A. E., Smith, R. M. a Motekaitis, R. J.** *Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database*. 2004.
25. **Brittain, H. G., Mantha, S. a Tweedle, M. 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.
26. **Merbach, A., Helm, L. a Toth, E.** *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. 2. vydanie. s.l.: Wiley, 2013, 4.3.2, s. 168.
27. **Aime, S., et al.** [Gd-AAZTA]: A New Structural Entry for an Improved GAEATION of MRI Contrast Agents. *Inorganic Chemistry*. 2004, Zv. 43, 24, s. 7588–7590.
28. **Lang, L., et al.** Comparison Study of [18F]FAI-NOTA-PRGD₂, [18F]FPPRGD₂, and [68Ga]Ga-NOTA-PRGD₂ for PET Imaging of U87MG Tumors in Mice. *Bioconjugate Chemistry*. 2011, Zv. 22, 12, s. 2415–2422.
29. **Osvath, P., Weatherburn, D. C. a Robinson, W. T.** The crystal and molecular structures of aqua(1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane)nickel(II) nitrate perchlorate [Ni¹⁵]aneN₅-H₂O](NO₃)(ClO₄) and (1,5,9,13,17-pentaazacycloicosane)-nikel(II) nitrate hydrate [Ni²⁰]aneN₅(NO₃)₂·H₂O. *Transition Metal Chemistry*. 1991, Zv. 16, 3, s. 344–347.
30. **Smith, R. M. a Martell, A. E.** *Critical Stability Constants*. New York, 1974–1989. Zv. 1–6.

31. **Paurova, M., et al.** Bifunctional Cyclam-Based Ligands with Phosphorus Acid Pendant Moieties for Radiocopper Separation: Thermodynamic and Kinetic Studies. *Chemistry - A European Journal*. 2015, Zv. 21, 12, s. 4671–4687.
32. **Toth, E., et al.** Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide(III)-DOTA Complexes. *Inorganic Chemistry*. 1994, Zv. 33, 18, s. 4070–4076.
33. **Hermann, P., et al.** Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. *Dalton Transactions*. 2008, 23, s. 3027–3047.
34. **Rudovsky, J., et al.** Lanthanide(III) complexes of a mono(methylphosphonate) analogue of H₄dota: The influence of protonation of the phosphonate moiety on the TSAP/SAP isomer ratio and the water exchange rate. *Chemistry - A European Journal*. 2005, Zv. 11, 8, s. 2373–2384.
35. **Polasek, M., et al.** Lanthanide(III) Complexes of Pyridine-N-Oxide Analogues of DOTA in Solution and in the Solid State. A New Kind of Isomerism in Complexes of DOTA-like Ligands. *Inorganic Chemistry*. 2009, Zv. 48, 2, s. 466–475.
36. **Merbach, A., Helm, L. a Toth, E.** The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2. vydanie. s.l. : Wiley, 2013, 4.2.1, s. 158–159.
37. **Cacheris, W. P., Quay, S. C. a Rocklage, S. M.** The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *Magnetic Resonance Imaging*. 1990, Zv. 8, 4, s. 467–481.
38. **Pasha, A., et al.** Synthesis and characterization of DOTA-(amide)₄ derivatives: equilibrium and kinetic behavior of their lanthanide(III) complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2007, 27, s. 4340–4349.
39. **Baranyai, Z., et al.** Equilibrium and kinetic properties of the lanthanoids (III) and various divalent metal complexes of the heptadentate ligand AAZTA. *Chemistry - A European Journal*. 2009, Zv. 15, 7, s. 1696–1705.
40. **Xu, J., et al.** Gadolinium complex of tris[(3-hydroxy-1-methyl- 2-oxo-1,2-didehydropyridine-4-carboxamido)ethyl]-amine: A New Class of gadolinium magnetic resonance relaxation agents. *Journal of the American Chemical Society*. 1995, Zv. 117, 27, s. 7245–7246.
41. **Clarke, E. T. a Martell, A. E.** Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles. *Inorganica Chimica Acta*. 1991, Zv. 190, 1, s. 37–46.
42. **Foersterova, M., et al.** Thermodynamic study of lanthanide(III) complexes with bifunctional monophosphinic acid analogues of H₄dota and comparative kinetic study of yttrium(III) complexes. *Dalton Transactions*. 2007, 5, s. 535–549.
43. **Sherry, A. D., et al.** Characterization of Lanthanide(III) DOTP Complexes: Thermodynamics, Protonation, and Coordination to Alkali Metal Ions. *Inorganic Chemistry*. 1996, Zv. 35, 16, s. 4604–4612.
44. **Kutina, A. V., Kuznetsova, A. A. a Natochin, Iu. V.** Cations in the human blood serum. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk*. 2005, Zv. 36, 3, s. 3–32.
45. **Tweedle, M. F.** Physicochemical properties of gadoteridol and other magnetic resonance contrast agents. *Investigative Radiology*. 1992, Zv. 27, 1, s. 2–6.
46. **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.
47. **Marckmann, P., et al.** 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.
48. **Ting, W. W., et al.** Nephrogenic fibrosing dermopathy with systemic involvement. *Archives of dermatology*. 2003, Zv. 139, 7, s. 903–906.
49. **Griffiths, J.R.** Are cancer cells acidic? *British Journal of Cancer*. 1991, Zv. 64, 3, s. 425–427.
50. **Rodriguez-Rodriguez, A., et al.** Lanthanide(III) Complexes with a Reinforced Cyclam Ligand Show Unprecedented Kinetic Inertness. *Journal of the American Chemical Society*. 2014, Zv. 136, 52, s. 17954–17957.
51. **Merbach, A., Helm, L. a Toth, E.** The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2. vydanie. s.l. : Wiley, 2013, 4.3.3, s. 176.
52. **Merbach, A., Helm, L. a Toth, E.** The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2. vydanie. s.l. : Wiley, 2013, 2.1, s. 28.
53. **Merbach, A., Helm, L. a Toth, E.** The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2. vydanie. s.l. : Wiley, 2013, 2.2, s. 28–30.
54. **Werner, E. J., et al.** High-Relaxivity MRI Contrast Agents: Where Coordination Chemistry Meets Medical Imaging. *Angewandte Chemie, International Edition*. 2008, Zv. 47, 45, s. 8568–8580.
55. **Lowe, M. P., et al.** pH-Dependent Modulation of Relaxivity and Luminescence in Macrocyclic Gadolinium and Europium Complexes Based on Reversible Intramolecular Sulfonamide Ligation. *Journal of the American Chemical Society*. 2001, Zv. 123, 31, s. 7601–7609.
56. **Li, W.-H., Fraser, S. E. a Meade, T. J.** A Calcium-Sensitive Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *Journal of the American Chemical Society*. 1999, Zv. 121, 6, s. 1413–1414.
57. **Boros, E., et al.** Gd(DOTAlaP): Exploring the Boundaries of Fast Water Exchange in Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Inorganic Chemistry*. 2014, Zv. 53, 13, s. 6985–6994.
58. **Powell, D. H., et al.** High-pressure NMR kinetics. Part 74. Structural and Dynamic Parameters Obtained from ¹⁷O NMR, EPR, and NMRD Studies of Monomeric and Dimeric Gd³⁺ Complexes of Interest in Magnetic Resonance Imaging: An Integrated and Theoretically Self-Consistent Approach. *Journal of the American Chemical Society*. 1996, Zv. 118, 39, s. 9333–9346.
59. **Aime, S., et al.** Prototropic vs. whole water exchange contributions to the solvent relaxation enhancement in the aqueous solution of a cationic Gd³⁺ macrocyclic complex. *Journal of the American Chemical Society*. 1997, Zv. 119, 20, s. 4767–4768.

60. **Vander Elst, L., et al.** 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.
61. **Battistini, E., et al.** High-relaxivity magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent based on supramolecular assembly between a gadolinium chelate, a modified dextran, and poly- β -cyclodextrin. *Chemistry - A European Journal*. 2008, Zv. 14, 15, s. 4551–4561.
62. **Mulder, W. J. M., et al.** Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging. *NMR in Biomedicine*. 2006, Zv. 19, 1, s. 142–164.
63. **Wiener, E. C., et al.** Dendrimer-based metal chelates: a new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1994, Zv. 31, 1, s. 1–8.
64. **Caravan, P.** Protein-Targeted Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents: Design and Mechanism of Action. *Accounts of Chemical Research*. 2009, Zv. 42, s. 851–862.
65. **Lauffer, R. B., et al.** Bioactivated diagnostic imaging contrast agents. WO 9736619 Epix Medical, Inc., USA, 25. 3 1997.
66. **Livramento, J. B., et al.** High relaxivity confined to a small molecular space: A metallostar-based, potential MRI contrast agent. *Angewandte Chemie, International Edition*. 2005, Zv. 44, 10, s. 1480–1484.
67. **Merbach, A., Helm, L. a Toth, E.** The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2. vydanie. s.l. : Wiley, 2013, 2.2.2, s. 37–38.
68. **Watanabe, K., et al.** Case study of a 20 T- ϕ 400 mm room temperature bore superconducting outsert for a 45 T hybrid magnet. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*. 2008, Vol. 18, 2, pp. 552–555.
69. **Koenig, S. H. a Brown, R. D., III.** Field-cycling relaxometry of protein solutions and tissue: implications for MRI. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 1990, Zv. 22, 6, s. 487–567.
70. **Muller, R. N., et al.** Physicochemical Characterization of MS-325, a New Gadolinium Complex, by Multinuclear Relaxometry. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 1999, 11, s. 1949–1955.
71. **Merbach, A., Helm, L. a Toth, E.** The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2. vydanie. s.l. : Wiley, 2013, 2.2.3.1, s. 39–40.
72. **Beeby, A., et al.** 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.
73. **Supkowski, R. M. a Horrocks, W. DeW., Jr.** On the determination of the number of water molecules, q , coordinated to europium(III) ions in solution from luminescence decay lifetimes. *Inorganica Chimica Acta*. 2002, Zv. 340, s. 44–48.
74. **Graepi, N., et al.** Coordination equilibria and water exchange kinetics of lanthanide(III) propylenediaminetetraacetates and other magnetic resonance imaging related complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 1995, Zv. 235, 1–2, s. 311–326.
75. **Alpoim, M. C., et al.** Determination of the number of inner-sphere water molecules in lanthanide(III) polyaminocarboxylate complexes. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions: Inorganic Chemistry (1972–1999)*. 1992, 3, s. 463–467.
76. **Ghuman, J., et al.** Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. *Journal of Molecular Biology*. 2005, Zv. 353, 1, s. 38–52.
77. **Er, J. C., et al.** Fluorescent Dye Cocktail for Multiplex Drug-Site Mapping on Human Serum Albumin. *ACS Combinatorial Science*. 2013, Zv. 15, 9, s. 452–457.
78. **Parmelee, D. J., et al.** Preclinical evaluation of the pharmacokinetics, biodistribution, and elimination of MS-325, a blood pool agent for magnetic resonance imaging. *Investigative Radiology*. 1997, Zv. 32, 12, s. 741–747.
79. **Eldredge, H. B., et al.** Species Dependence on Plasma Protein Binding and Relaxivity of the Gadolinium-Based MRI Contrast Agent MS-325. *Investigative Radiology*. 2006, Zv. 41, 3, s. 229–243.
80. **Caravan, P., et al.** The Interaction of MS-325 with Human Serum Albumin and Its Effect on Proton Relaxation Rates. *Journal of the American Chemical Society*. 2002, Zv. 124, 12, s. 3152–3162.
81. **Encinas, M. V., Lissi, E. a Vergara, C.** Association of Valdecoxib, a Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug, with Human Serum Albumin. *Photochemistry and Photobiology*. 2013, Zv. 89, 6, s. 1399–1405.
82. **Aime, S., et al.** Paramagnetic Lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2002, Zv. 47, 4, s. 639–648.
83. **Zhang, S., Wu, K. a Sherry, A. D.** A Novel pH-Sensitive MRI Contrast Agent. *Angewandte Chemie, International Edition*. 1999, Zv. 38, 21, s. 3192–3194.
84. **Aime, S., et al.** A new ytterbium chelate as contrast agent in chemical shift imaging and temperature sensitive probe for MR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1996, Zv. 35, 5, s. 648–651.
85. **Merbach, A., Helm, L. a Toth, E.** The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. 2. vydanie. s.l. : Wiley, 2013, 9.2, s. 389.
86. **Krchova, T., et al.** Lanthanide(III) complexes of aminoethyl-DO₃A as PARACEST contrast agents based on decoordination of the weakly bound amino group. *Dalton Transactions*. 2013, Zv. 42, 44, s. 15735–15747.
87. **Urbanovský, P.** *Nové ligandy pre nukleárnu magnetickú tomografiu – pH responzivne kontrastné látky*. Bakalárska práca. Praha : Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, 2013.
88. **Fourgeaud, P., et al.** Oxaphospholene and oxaphosphinene heterocycles via RCM using unsymmetrical phosphonates or functional phosphinates. *Tetrahedron*. 2010, Zv. 66, 3, s. 758–764.
89. **Deprele, S. a Montchamp, J.-L.** Triethylborane-Initiated Room Temperature Radical Addition of Hypophosphites to Olefins: Synthesis of Monosubstituted Phosphinic Acids and Esters. *Journal of Organic Chemistry*. 2001, Zv. 66, 20, s. 6745–6755.

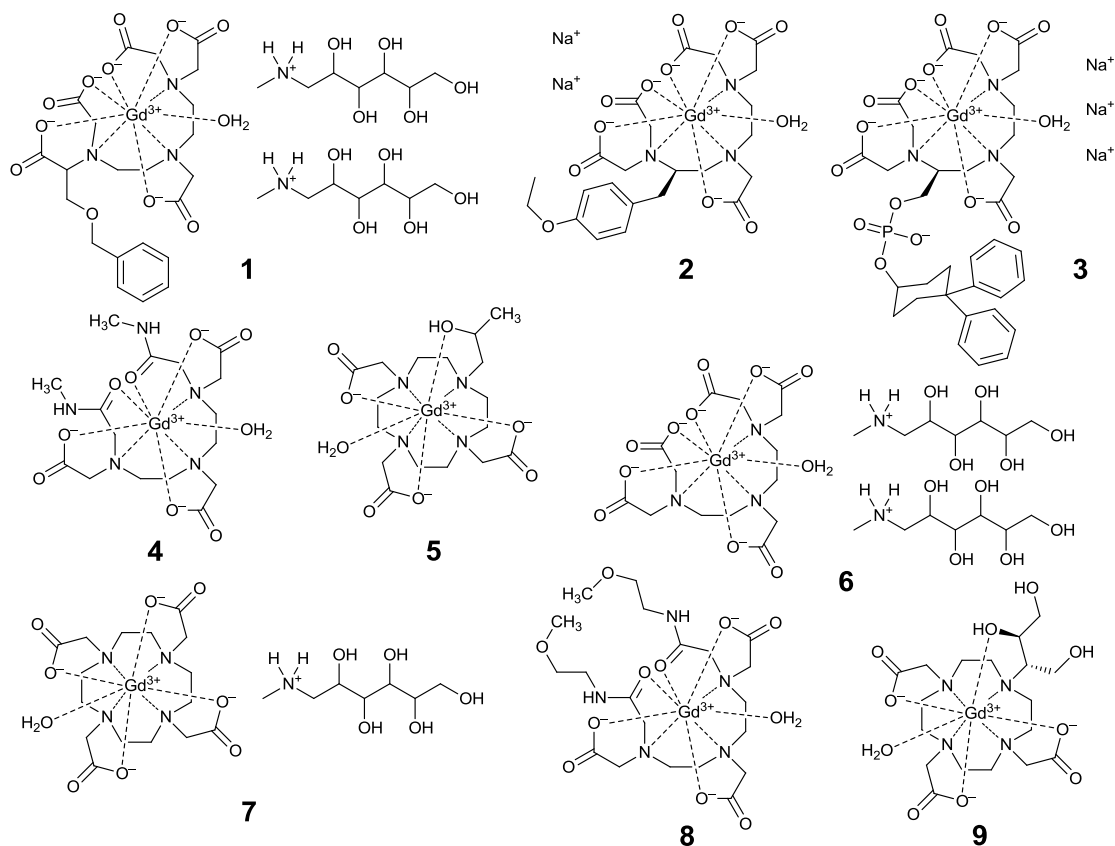
90. Solution Equilibria Analysis with the OPIUM Computer Program. [Online] 26. 10 2004. [Datum: 25. 4 2015.] <https://web.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>.
91. **Khomutov, R. M., Khurs, E. N. a Osipova, T. I.** Synthesis of alkyl hydrogen (1-aminoalkyl)phosphonates. *Mendeleev Communications*. 2011, Zv. 21, 2, s. 106–107.
92. **Queffelec, C., Ribiere, P. a Montchamp, J.-L.** Synthesis of P,N-heterocycles from ω -amino-H-phosphinates: conformationally restricted α -amino acid analogs. *Journal of Organic Chemistry*. 2008, Zv. 73, 22, s. 8987–8991.
93. **Barral, K., et al.** Synthesis, in Vitro Antiviral Evaluation, and Stability Studies of Novel α -Borano-Nucleotide Analogues of 9-[2-(Phosphonomethoxy)ethyl]adenine and (R)-9-[2-(Phosphonomethoxy)propyl]adenine. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006, Zv. 49, 26, s. 7799–7806.
94. **Caravan, P., et al.** 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.
95. **Dunand, F. A. a Merbach, A. E.** UV-Vis observation of different $7F_0$ $5D_0$ transitions for both isomeric species in Eu(III) DOTA-like complexes. *Inorganic Chemistry Communications*. 2001, Zv. 4, 12, s. 719–722.
96. **Lebduskova, P., et al.** Gadolinium(III) complexes of mono- and diethyl esters of mono-phosphonic acid analogue of DOTA as potential MRI contrast agents: solution structures and relaxometric studies. *Dalton Transactions*. 2007, 4, s. 493–501.
97. **Fanali, G., Ascenzi, P. a Fasano, M.** Effect of prototypic drugs ibuprofen and warfarin on global chaotropic unfolding of human serum heme-albumin: A fast-field-cycling $1H$ -NMR relaxometric study. *Biophysical Chemistry*. 2007, Zv. 129, 1, s. 29–35.
98. **Aime, S., et al.** Gd(III) complexes as contrast agents for magnetic resonance imaging: a proton relaxation enhancement study of the interaction with human serum albumin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 1996, Zv. 1, 4, s. 312–319.
99. **Yamasaki, K., et al.** Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects*. 2013, Zv. 1830, 12, s. 5435–5443.
100. **Kasai, S., et al.** Fluorescence energy transfer study of the relationship between the lone tryptophan residue and drug binding sites in human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1987, Zv. 76, 5, s. 387–392.
101. **Jayabharathi, J., et al.** Displacement Reaction Using Ibuprofen in a Mixture of Bioactive Imidazole Derivative and Bovine Serum Albumin—a Fluorescence Quenching Study. *Journal of Fluorescence*. 2011, Zv. 21, 4, s. 1825–1830.
102. **Bagatolli, L. A., et al.** Two distinguishable fluorescent modes of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate bound to human albumin. *Journal of Fluorescence*. 1996, Zv. 6, 1, s. 33–40.
103. **Pandey, R. K., et al.** Synthesis, Photophysical Properties, in Vivo Photosensitizing Efficacy, and Human Serum Albumin Binding Properties of Some Novel Bacteriochlorins. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997, Zv. 40, 17, s. 2770–2779.
104. **Enyedy, E. A., et al.** Interactions of the carrier ligands of antidiabetic metal complexes with human serum albumin: A combined spectroscopic and separation approach with molecular modeling studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011, Zv. 19, 14, s. 4202–4210.
105. **Abuin, E., Calderon, C. a Lissi, E.** Interaction of alkylpyridinium chlorides with human serum albumin studied by fluorescence techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*. 2008, Zv. 195, 2-3, s. 295–300.
106. **Wanwimolruk, S., Birkett, D. J. a Brooks, P. M.** Structural requirements for drug binding to site II on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*. 1983, Zv. 24, 3, s. 458–463.
107. **Jiráček, D.** Ústne podanie. 2015.
108. **Rohovec, J., et al.** Derivative of cyclen with three methylene(phenyl)phosphinic acid pendant arms. Synthesis and crystal structures of its lanthanide complexes. *Dalton*. 2000, 2, s. 141–148.
109. **Pniok, M., et al.** Thermodynamic and Kinetic Study of Scandium(III) Complexes of DTPA and DOTA: A Step Toward Scandium Radiopharmaceuticals. *Chemistry - A European Journal*. 2014, Zv. 20, 26, s. 7944–7955.
110. **Benetollo, F., et al.** Structural Variations Across the Lanthanide Series of Macrocyclic DOTA Complexes: Insights into the Design of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Inorganic Chemistry*. 2003, Zv. 42, 1, s. 148–157.
111. Department of Radiology. [Online] [Datum: 14. 5 2015.] <https://www.radiology.wisc.edu/fileShelf/contrastCorner/files/GadoliniumBasedContrastDosingCharts.pdf>.
112. **Frenzel, T., et al.** Stability of Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents in Human Serum at 37 °C. *Investigative Radiology*. 2008, Zv. 43, 12, s. 817–828.
113. **Caravan, P., et al.** Albumin Binding, Relaxivity, and Water Exchange Kinetics of the Diastereoisomers of MS-325, a Gadolinium(III)-Based Magnetic Resonance Angiography Contrast Agent. *Inorganic Chemistry*. 2007, Zv. 46, 16, s. 6632–6639.
114. **Zech, S. G., et al.** Protein Binding to Lanthanide(III) Complexes Can Reduce the Water Exchange Rate at the Lanthanide. *Inorganic Chemistry*. 2007, Zv. 46, 9, s. 3576–3584.
115. **Blockley, N. P., et al.** Field strength dependence of R_1 and R_2^* relaxivities of human whole blood to ProHance, Vasovist, and deoxyhemoglobin. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2008, Zv. 60, 6, s. 1313–1320.
116. **Henrotte, V., et al.** Comprehensive investigation of the non-covalent binding of MRI contrast agents with human serum albumin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2007, Zv. 12, 6, s. 929–937.
117. **Corsí, D. M., et al.** Determination of paramagnetic lanthanide(III) concentrations from bulk magnetic susceptibility shifts in NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2001, Zv. 39, 11, s. 723–726.

6. Prílohy

6.1 Klinicky používané T_1 -kontrastné látky

Tabuľka A (111)

Číslo	Meno	Obchodný názov	Dávka v mmol kg ⁻¹	Max. dávka v mmol kg ⁻¹	Koncentrácia v mM	Objem dávky na 100 kg v ml
1	Gadobenate Dimeglumine	Multihance [®]	0,1 (0,05) (hepatálne MRI)	0,2	500	20
2	Gadoxetate Disodium	Eovist [®]	0,05	0,05	250	20
3	Gadofosveset Trisodium	Ablavar [®]	0,03	0,05	250	12
4	Gadodiamide	Omniscan [®]	0,1	0,2	500	20
5	Gadoteridol	Prohance [®]	0,1	0,2	500	20
6	Gadopentetate Dimeglumine	Magnevist [®]	0,1	0,2	500	20
7	Gadoterate Meglumine	Dotarem [®]	0,1	0,2	500	20
8	Gadoversetamide	Optimark [®]	0,1	0,2	500	20
9	Gadobutrol	Gadavist [®]	0,1	0,2	1000	10



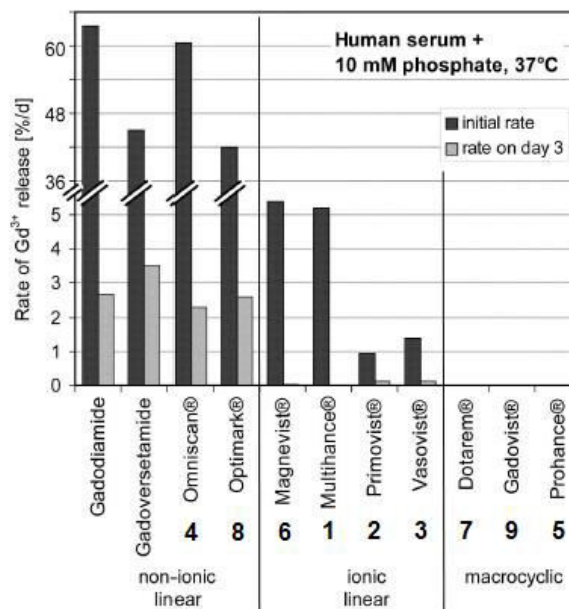
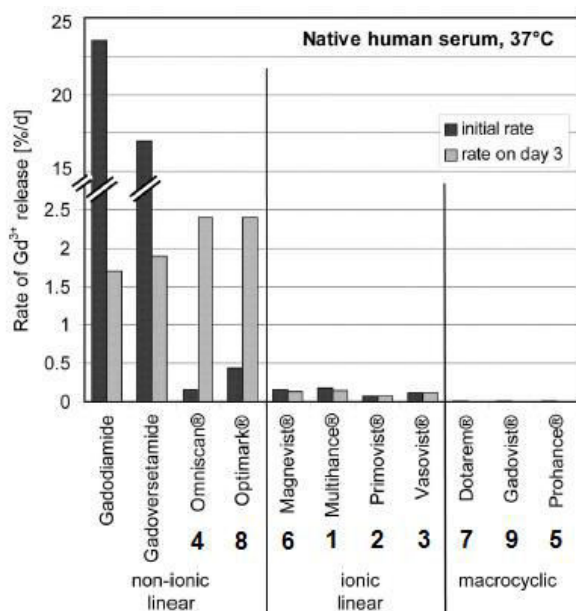
Obrázok A – súčasne klinicky používané T_1 -kontrastné látky na báze Gd^{3+} komplexov

Tabuľka B (21)

Číslo	Ligand L	log K (Gd-L)	log K* (Gd-L)	$r_{1,Gd(L)}$ (1,5 T, 37 °C, H ₂ O) v mm ⁻¹ s ⁻¹	Osmomolalita Gd-L pri 37 °C v osmol kg ⁻¹	log P _{Gd(L)} (BuOH-H ₂ O)
1	BOPTA	22,6	18,4	3,8	1,97	-2,33
2	EOB-DTPA	23,5	18,7	4,6	0,69	-2,11
3	MS-325	22,1	18,9	5,0	0,83	-2,11
4	DTPA-BMA	16,9	14,9	3,3	0,79	-2,13
5	HP-DOTA	23,8	17,1	2,9	0,63	-1,98
6	DTPA	22,1	17,7	3,3	1,96	-3,16
7	DOTA	25,6	19,3	3,0	1,35	-2,87
8	DTPA-BMEA	16,6	15,0	3,6	1,11	-
9	BT-DO ₃ A	21,8	14,7	3,3	1,60	-2,00

Tabuľka C (21)

Číslo	Ligand L	$T_{1/2}$ (Gd-L → Gd ³⁺ + L) v hodinách		
		T = 37 °C, pH = 1,2	T = 37 °C, pH = 1,0	T = 25 °C, pH = 1,0
1, 2, 3, 4, 6, 8	(DTPA deriváty)	-	-	< 5 s
5	HP-DOTA	85,0	26,4	338,0
7	DOTA	4,0	2,0	3,9
9	BT-DO ₃ A	18,0	7,9	43,0

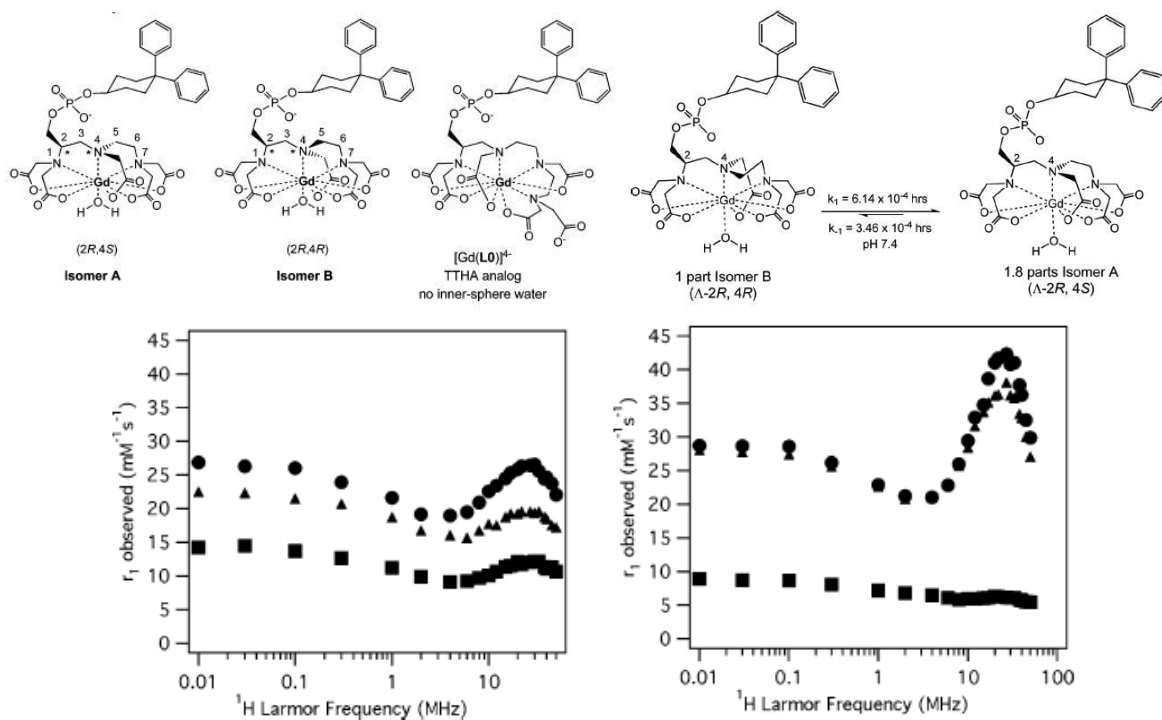


Obrázok B – podiel vylúčeného Gd³⁺ v roztoku krvného séra pri 37 °C a prídavku 1 mmol L⁻¹ T₁-kontrastnej látky (vľavo) a s prítomným fosfátovým pufróm (vpravo), tmavé stĺpce predávajú podiel okamžite vylúčeného Gd³⁺ a svetlé podiel vylúčeného Gd³⁺ po 3 dňoch (112)

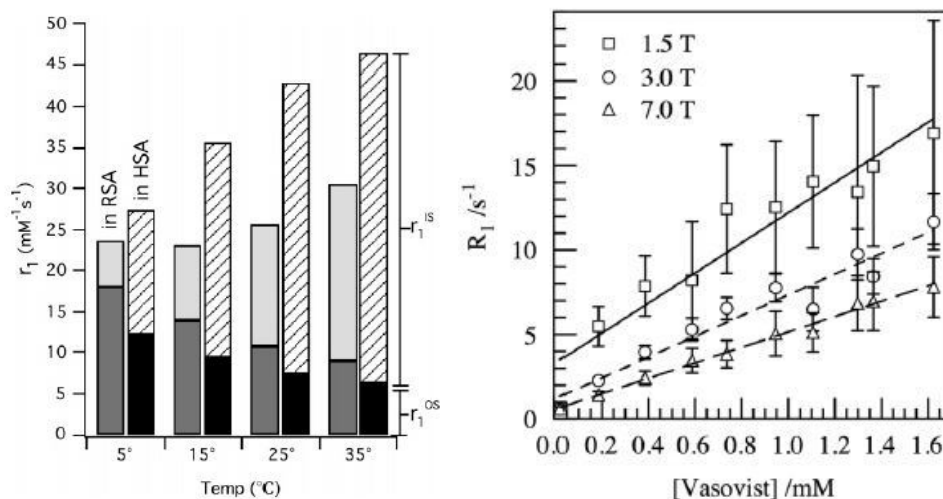
6.2 Charakterizácia látky Ablavar[®]

¹H-NMRD profily látky Ablavar[®] v roztoku vody a HSA sú uvedené na obrázku 23.

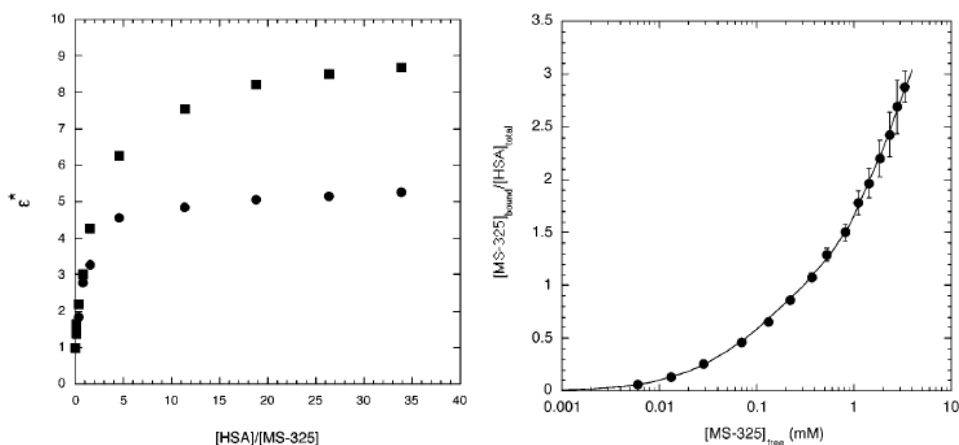
Relaxometrické parametre látky Ablavar[®] sú uvedené v tabuľke 28.



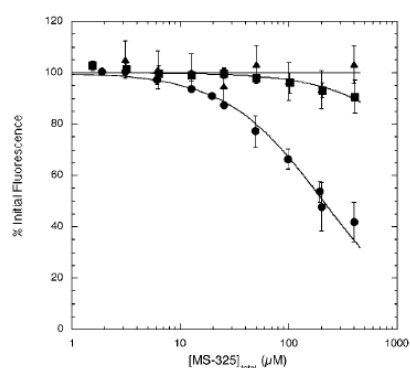
Obrázok C – rôzne stereoizoméry látky Gd–(MS–325) a rovnovážny stav medzi izomérom A a B (hore vpravo), prevzaté z (64), a relaxivita izomérov A (kruh), B (trojuholník) a $q = 0$ (štvorec) v 4,5 % roztoku HSA pri 5 °C (dolu vľavo) a 35 °C (dolu vpravo), prevzaté z (113)



Obrázok D – relaxivita izomérov Ablavar[®] s $q = 1$ (svetlé) a $q = 0$ (tmavé) v roztoku so sérovým albumínom (RSA je zajačí a HSA ľudský) (vľavo), prevzaté z (114), a pozorovaná relaxácia (v kvapke krvi) na koncentrácii látky Ablavar[®] v poli o rôznej veľkosti magnetickej intenzity (vpravo), prevzaté z (115)

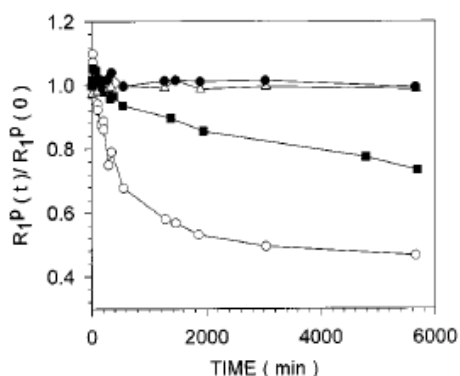


Obrázok E – ξ^* (PRE efekt) vs. $[HSA] / [Gd-(MS-325)]$ pri 37 °C v PBS pufrí (pH = 7,4), titrovaný roztok 0,1 M Ablavar® s HSA(s) (koncentrácia HSA je 0–22,5 %) (vľavo) a väzobná izoterma Ablavar® k HSA (4,5 %) v pufrí PBS pri 37 °C (vpravo), obe prevzaté z (80)



	K ultrafiltration ($10^3 M^{-1}$)	K proton relaxometry ($10^3 M^{-1}$)	K mass spectrometry ($10^3 M^{-1}$)
Gd-EOB-DTPA	0.3 ($n = 1$)	1.5 ($n = 1$)	5.3 ($n = 1$)
Gd-BOPTA	0.2 ($n = 1$)	1.5 ($n = 1$)	5.6 ($n = 1$)
MS-325	11 ($n = 1$)	6.8 ($n = 1$)	46 ($n = 1$)

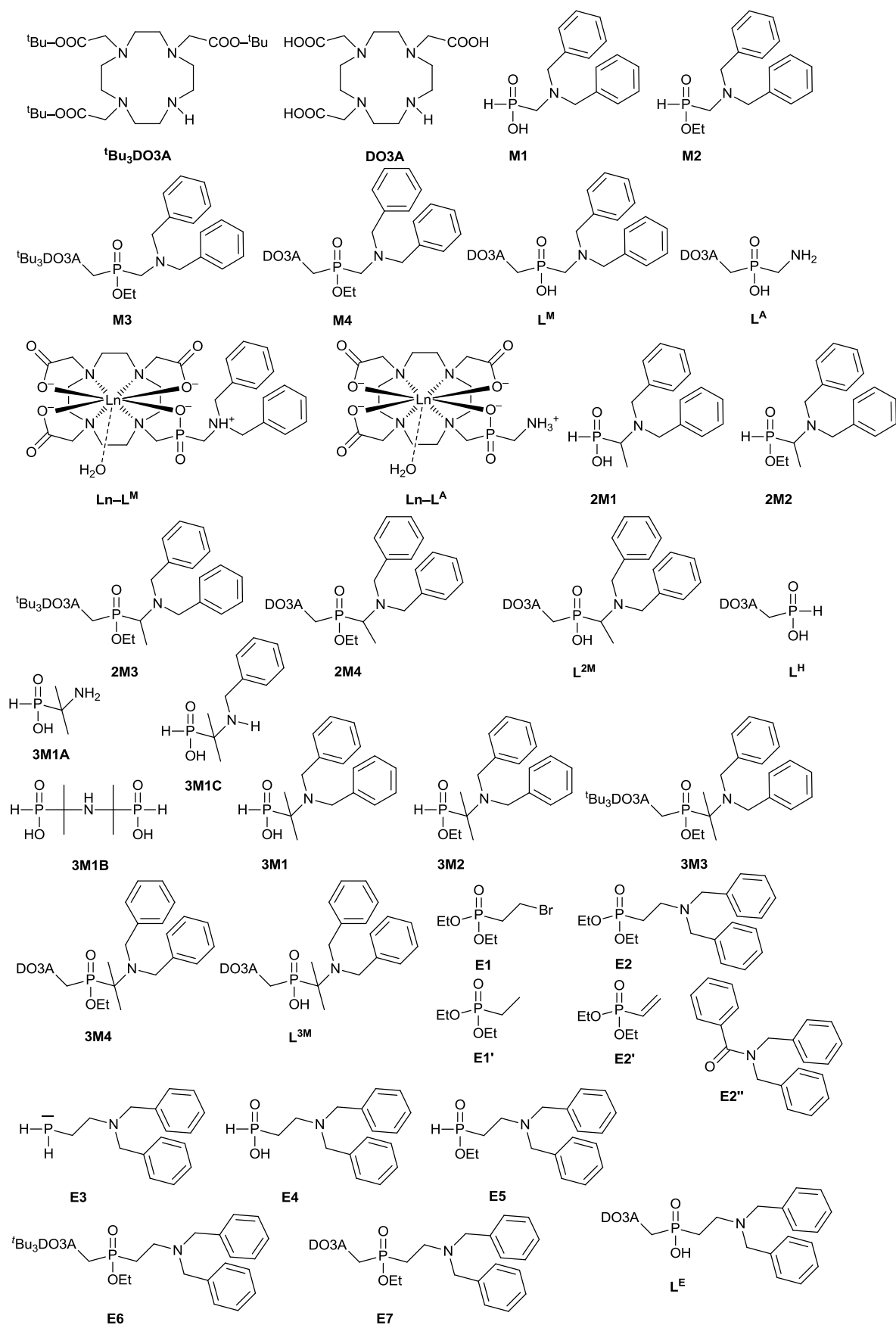
Obrázok F – kompetitívna inhibícia Ablavar® a inhibítora (trojuholník je Warfarin, štvorec dansyl–L–asparagín a kruh dansylsarkosín) v pomere 1 : 1 v roztoku PBS (pH = 7,4) pri titracii s HSA(s) (vľavo), prevzaté z (80), a veľkosť afinitných konštant (K_{af}) kontrastných látok (odvođených od Gd^{3+} komplexov uvedených ligandov) s HSA (vpravo), prevzaté z (116)

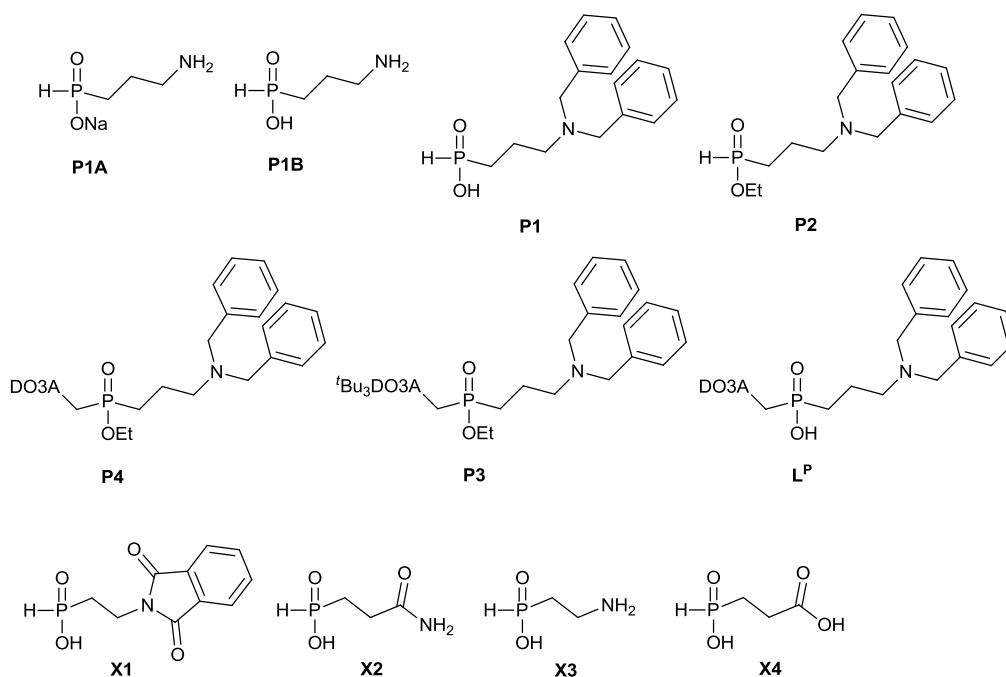


metal ion	pM (M–L)	medium
Ca(II)	8.34	0.1 M NaClO ₄
Zn(II)	15.71	0.1 M NaClO ₄
Cu(II)	19.18	0.1 M NaClO ₄
Fe(III)	24.54	0.1 M NaClO ₄
Eu(III)	20.09	0.1 M NaClO ₄
Gd(III)	19.94	0.1 M NaClO ₄

Obrázok G – závislosť pomeru relaxivity 2,5 mM roztoku Ablavar® (plné štvorce), Magnevist® (prázdne kruhy), Prohance® (plné kruhy) a Dotarem® (prázdne trojuholníky) s 2,5 mM Zn^{2+} na čase ($t = 0$ min až $t = 6000$ min) (vľavo), prevzaté z (70), a tabuľka s hodnotami pM vypočítaných z titracii pri pH = 7,4 ($[L] = [MS-325] = 10$ mM a $[M] = 1$ mM) (vpravo), prevzaté z (94)

6.3 Kódové označenie molekúl





6.4 Stanovenie koncentrácie metódou BMS

Prevzaté z publikácie (117).

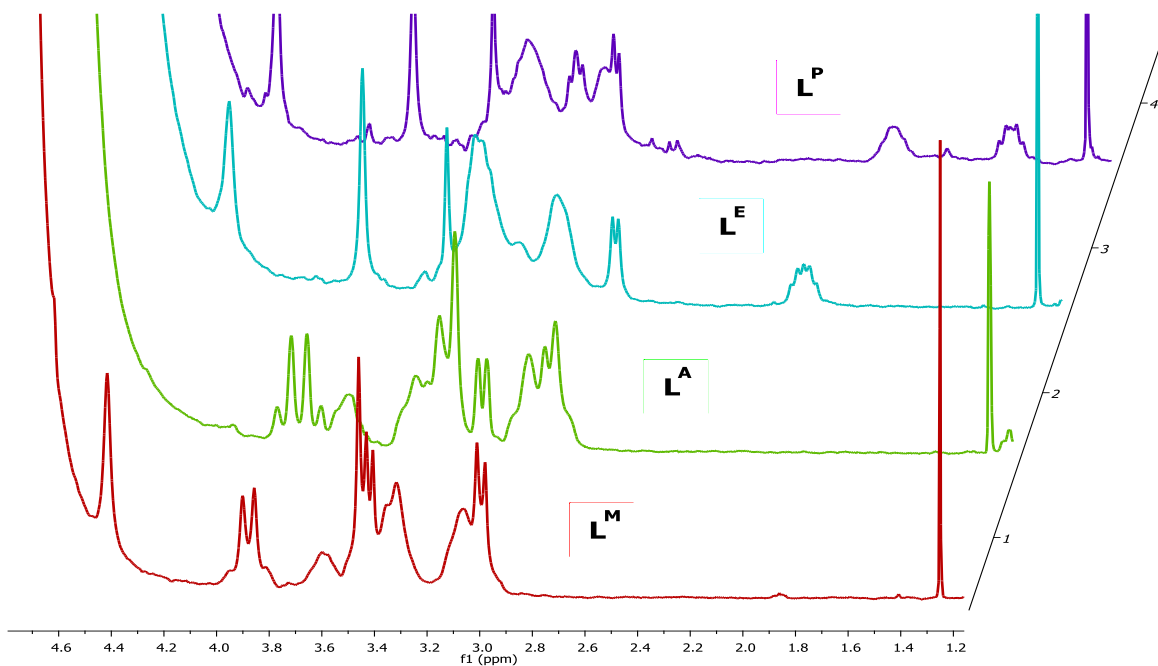
$$c = \frac{2,84^2 \Delta\delta_H T}{4\pi s \mu_{\text{eff}}^2 10^3} \quad [\text{A}]$$

c je koncentrácia paramagnetika v roztoku v jednotkách M, $\Delta\delta_H$ je rozdiel chemických posunov signálov ^tBuOH s a bez prítomnosti paramagnetika, T je termodynamická teplota, s je geometrický faktor (pre cylindickú kyvetu rovný 1/3) a μ_{eff} je efektívny magnetický moment paramagnetika.

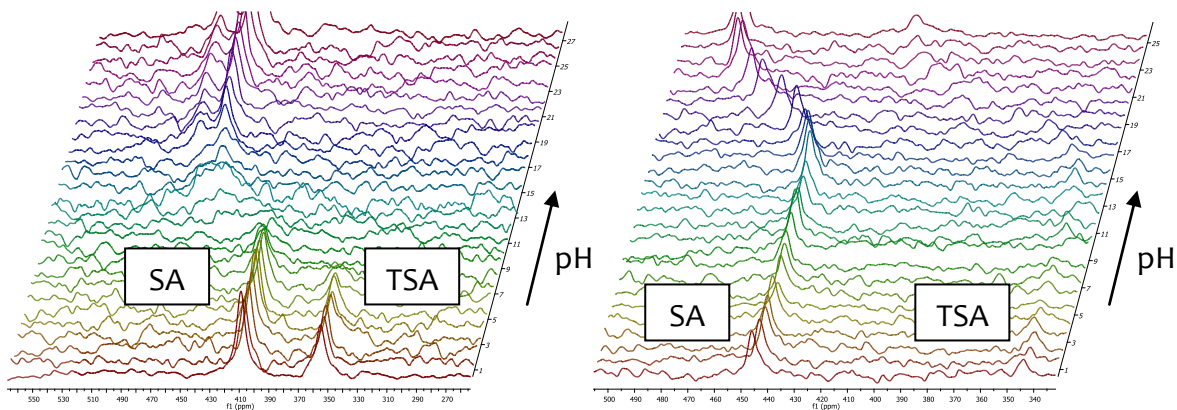
Tabuľka D

Ln	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb
Z	58	59	60	62	63	64	65	66	67	68	69	70
μ_{eff} / μ_B	2,56	3,62	3,68	1,55–1,65	3,40–3,51	7,94	9,70	10,60	10,60	9,60	7,60	4,50

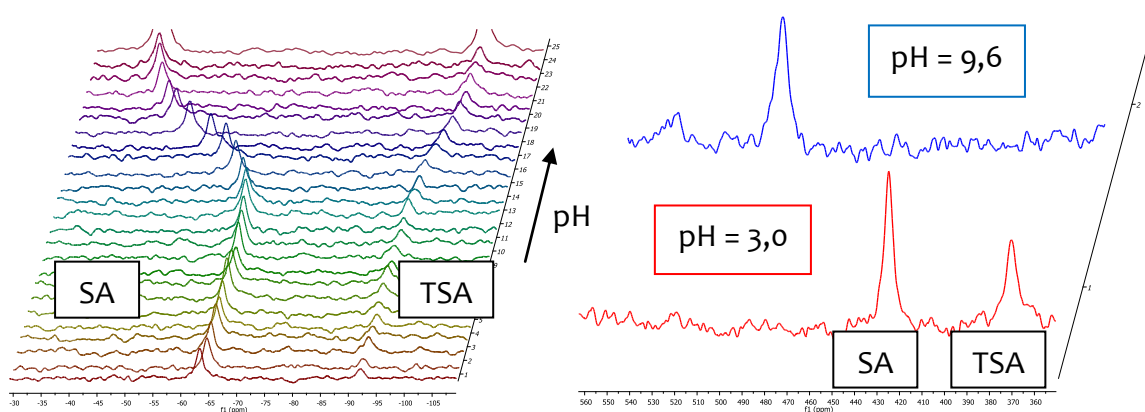
6.5 Výber z NMR titračných spektier a vyhodnotení



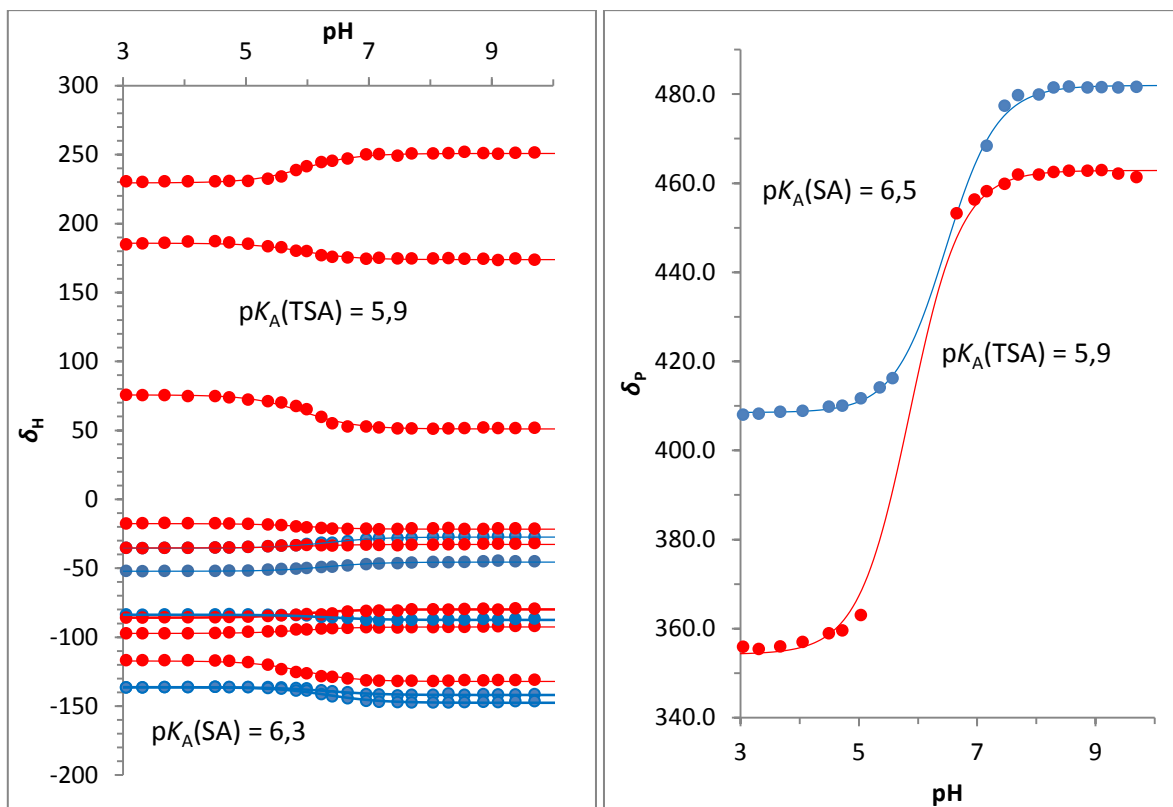
Obrázok I – ^1H -NMR spektrá ligandov v H_2O pri $\text{pH} \sim 4$ s prídavkom $t\text{BuOH}$



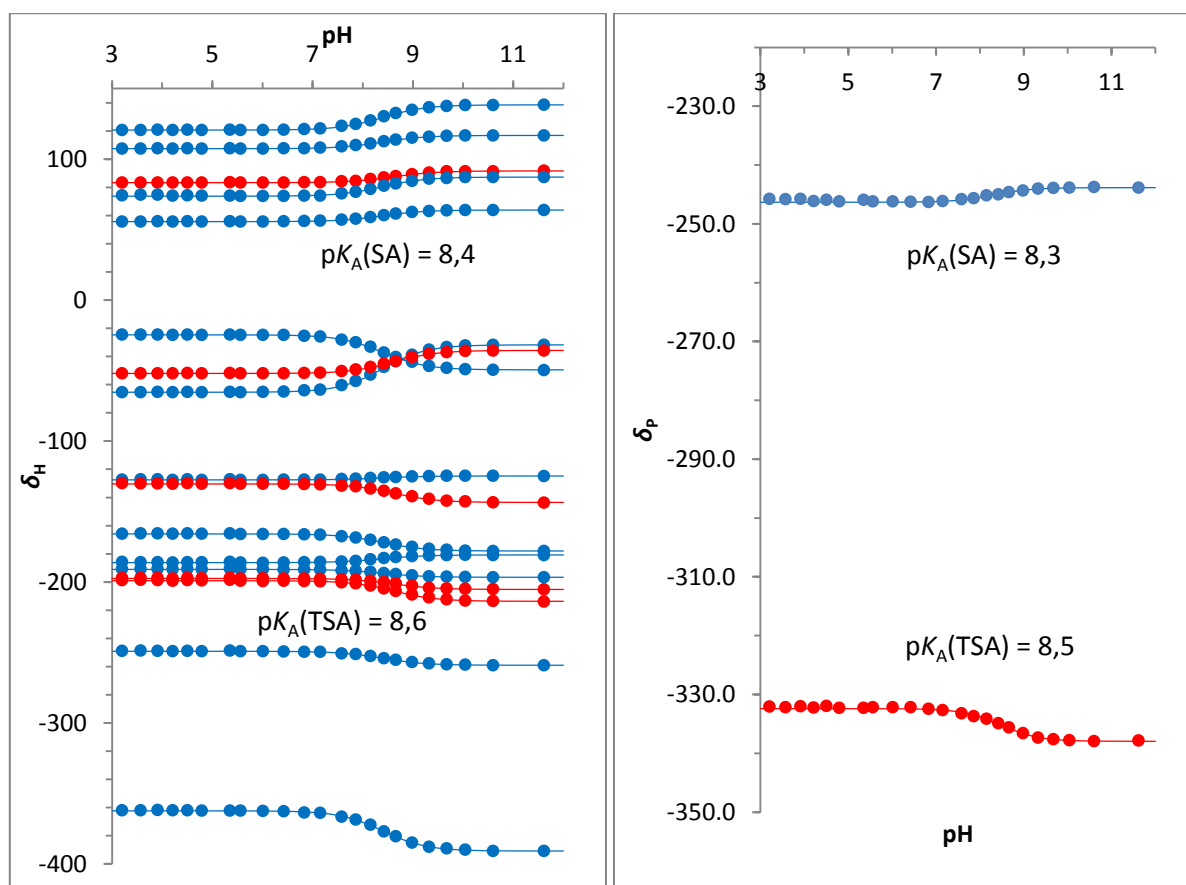
Obrázok J – ^{31}P -NMR spektrá NMR titrácie látky Tb-L^{M} (vľavo) a Dy-L^{A} (vpravo)



Obrázok K – ^{31}P -NMR spektrá NMR titrácie látky Er-L^{A} (vľavo) a Dy-L^{M} (vpravo)



Obrázok L – vyhodnotenie ^1H - (vľavo) a ^{31}P -NMR (vpravo) titrácií látky Tb-L^{M}



Obrázok M – vyhodnotenie ^1H - (vľavo) a ^{31}P -NMR (vpravo) titrácií látky Tm-L^{A}

6.6 Monokryštály charakterizované röntgenoštruktúrnou analýzou

Tabuľka E – štruktúry komplexov, ktorých vypresnenie nie je finálne, majú názov látky vo forme všeobecného zápisu Ln–L

Látka	H ₄ L ^M · 7,4H ₂ O	(NH ₄) [Nd(H ₂ O)(L ^M) · 3H ₂ O]	(NH ₄) [Eu(H ₂ O)(L ^M) · 3H ₂ O]	(NH ₄) [Gd(H ₂ O)(L ^M) · 3H ₂ O]	Gd–L ^M	[Tb(HL ^M)] · (NH ₄)Cl · H ₂ O	Tb–L ^M	Dy–L ^M	
Sumárny vzorec	C ₃₀ H _{58,8} N ₅ O _{15,4} P	C ₃₀ H ₅₂ N ₆ NdO ₁₂ P	C ₃₀ H ₅₂ Eu N ₆ O ₁₂ P	C ₃₀ H ₅₂ Gd N ₆ O ₁₂ P	C ₃₀ H _{54,5} Gd N ₅ Na _{0,5} O ₁₅ P	C ₃₀ H ₄₇ Cl N ₆ O ₉ PTb	C ₃₀ H ₅₂ N ₆ O ₁₂ PTb	C ₆₀ H ₈₀ Dy ₂ N ₉ Na ₂ O ₂₈ P ₂	
M _r	766,99	863,99	871,71	877,00	925,00	861,08	878,67	1808,25	
Tvar	hranol	doska	hranol	doska	doska	doska	hranol	hranol	
Farba	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	rúžový	bezf.	
Kryšt. sústava	triklinická	monoklinická	monoklinická	monoklinická	monoklinická	monoklinická	monoklinická	triklinická	
Priestor. grupa	P-1	C ₂ /c	C ₂ /c	C ₂ /c	P ₂ /c	Pn	C ₂ /c	P-1	
a / Å	9,9765(2)	47,142(2)	47,136(3)	47,084(2)	24,2222(7)	9,9701(2)	47,048(2)	10,2072(2)	
b / Å	12,1735(3)	10,3053(4)	10,3082(5)	10,2936(4)	10,1613(2)	15,3519(3)	10,2943(4)	15,5072(4)	
c / Å	17,7149(4)	15,3151(7)	15,2253(8)	15,2046(6)	15,4093(4)	11,4210(3)	15,2057(7)	23,2994(6)	
α / °	108,402(1)	90	90	90	90	90	90	91,5430(10)	
β / °	90,497(1)	90,722(2)	90,685(2)	90,6877(14)	95,4550(10)	94,9903(8)	90,717(2)	100,3090(10)	
γ / °	112,479(1)	90	90	90	90	90	90	90,0140(10)	
U / Å ³	1865,68(7)	7439,7(5)	7397,3(7)	7368,5(5)	3775,50(16)	1741,47(7)	7363,9(6)	3627,05(15)	
Z	2	8	8	8	4	2	8	2	
D _{calc} / g cm ⁻³	1,365	1,543	1,565	1,581	1,627	1,642	1,585	1,656	
μ / mm ⁻¹	0,149	1,505	1,806	1,910	1,879	2,213	2,031	2,188	
Rotal refl.	8547	7322	8492	8463	8663	6788	7234	14200	
Obsd. refl.	6900	6678	8117	7361	7451	6464	6599	12966	
R(I>2σ(I))	0,0682	0,1053	0,0565	0,0542	0,0650	0,0229	0,0518	0,0581	
R'	0,0822	0,1131	0,0588	0,0650	0,0748	0,0254	0,0563	0,0628	
ωR(I>2σ(I))	0,2040	0,2298	0,1346	0,1054	0,1590	0,0491	0,1128	0,2004	
ωR'	0,2152	0,2330	0,1358	0,1091	0,1657	0,0502	0,1146	0,2045	
Ln–OH ₂	–	2,624	2,595	2,584	2,666	–	2,591	2,754	2,624
Ln–O ₁	–	2,379	2,341	2,332	2,331	2,284	2,315	2,295	2,305
Ln–O ₄	–	2,438	2,397	2,387	2,320	2,341	2,365	2,341	2,324
Ln–O ₇	–	2,441	2,398	2,388	2,378	2,304	2,371	2,355	2,293
Ln–O ₁₀	–	2,379	2,342	2,334	2,374	2,322	2,314	2,279	2,312
Ln–N ₁	–	2,752	2,731	2,722	2,699	2,618	2,711	2,734	2,719
Ln–N ₄	–	2,705	2,677	2,668	2,648	2,611	2,657	2,647	2,624
Ln–N ₇	–	2,731	2,696	2,687	2,671	2,624	2,676	2,613	2,658
Ln–N ₁₀	–	2,747	2,708	2,698	2,649	2,540	2,682	2,656	2,688
Ln–OQ	–	0,796	0,804	0,806	0,861	1,011	0,809	0,833	0,854
Ln–NQ	–	1,746	1,718	1,710	1,669	1,560	1,697	1,676	1,685
OQ–NQ	–	2,541	2,521	2,516	2,530	2,567	2,505	2,509	2,539
O ₁ –Ln–O ₇	–	139,72	138,66	138,50	135,45	124,82	138,17	136,23	135,47
O ₄ –Ln–O ₁₀	–	142,99	141,95	141,50	138,44	131,42	140,97	139,44	138,46
O ₁ –OQ–NQ–N ₁	–	27,23	28,25	28,51	27,49	24,48	28,47	27,14	26,00
O ₄ –OQ–NQ–N ₄	–	23,81	23,86	24,14	26,78	25,91	24,32	24,75	24,21
O ₇ –OQ–NQ–N ₇	–	25,32	26,27	26,66	25,22	24,74	26,69	26,09	23,32
O ₁₀ –OQ–NQ–N ₁₀	–	26,05	26,16	26,43	24,66	25,21	26,59	26,84	26,81
N ₁ –N ₇	–	4,224	4,196	4,187	4,181	4,208	4,177	4,159	4,168
N ₄ –N ₁₀	–	4,191	4,149	4,138	4,138	4,105	4,127	4,334	4,128
O ₁ –O ₇	–	4,525	4,434	4,414	4,358	4,066	4,378	4,315	4,347
O ₄ –O ₁₀	–	4,568	4,480	4,457	4,389	4,250	4,412	4,117	4,335

Tabuľka F – štruktúry komplexov, ktorých vypresnenie nie je finálne, majú názov látky vo forme všeobecného zápisu Ln–L

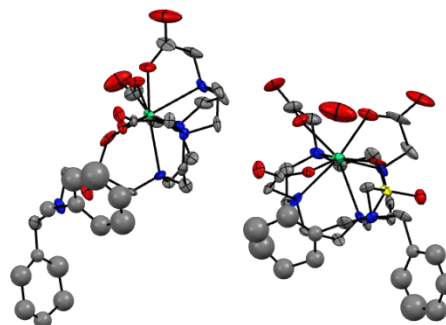
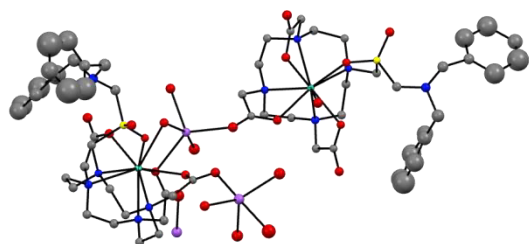
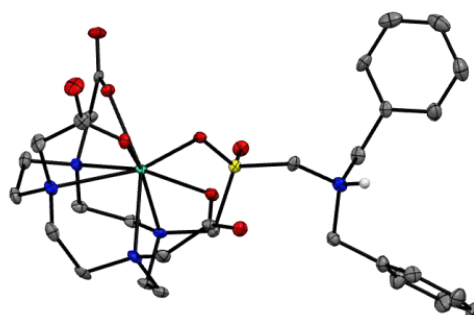
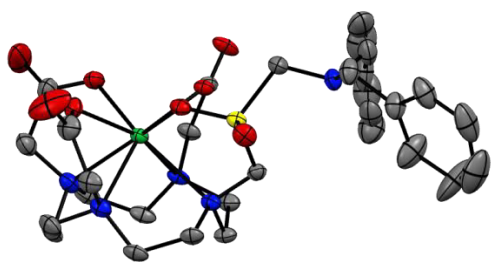
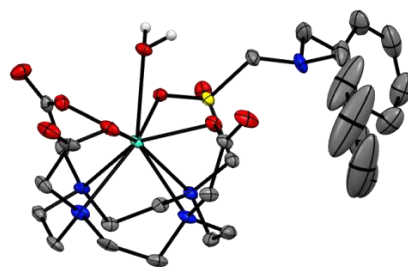
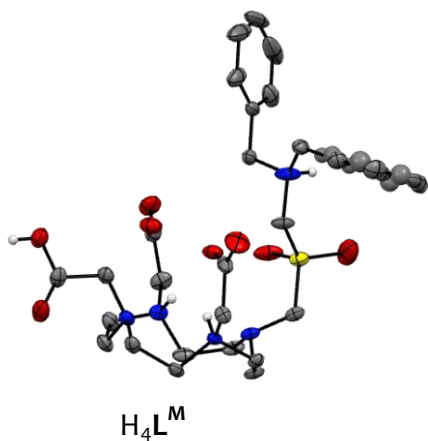
Látka	Er–L ^M	(NH ₄)[Er(L ^M)] · 4H ₂ O	Yb–L ^M	H ₄ L ^A · HCl · 9,5H ₂ O	La–L ^A	[Ce(H ₂ O) (HL ^A)] · 6H ₂ O	[Pr(H ₂ O) (HL ^A)] · 5,5H ₂ O	[Nd(H ₂ O) (HL ^A)] · 6H ₂ O	[Sm(H ₂ O) (HL ^A)] · 6H ₂ O · NaCl	
Sumárny vzorec	C ₃₀ H ₄₀ ErN ₅ O ₁₂ P	C ₃₀ H ₅₂ ErN ₆ O ₁₂ P	C ₃₀ H ₄₀ N ₅ O ₁₅ PYb	C ₃₂ H ₈₄ ClN ₁₀ O _{25,5} P ₂	C ₃₂ H ₆₉ La ₂ N ₉ O ₃₂ P ₂	C ₁₆ H ₄₃ CeN ₅ O ₁₅ P	C ₁₆ H ₄₂ PrN ₅ O _{14,5} P	C ₁₅ H ₃₈ N ₅ NdO ₁₆ P	C ₁₆ H ₄₃ ClN ₅ NaO ₁₅ PSm	
M_r	860,90	887,01	914,28	1114,48	1431,72	716,64	708,43	709,63	785,31	
Tvar	doska	doska	doska	doska	tyč	tyč	tyč	tyč	tyč	
Farba	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	
Kryšt. sústava	triklinická	monoklinická	monoklinická	triklinická	triklinická	triklinická	triklinická	triklinická	triklinická	
Priestor. grupa	P-1	P2 ₁ /c	C2/c	P-1	P-1	P-1	P-1	P-1	P-1	
a / Å	10,2212(10)	24,3204(4)	49,3984(12)	14,2705(4)	9,1195(3)	8,9918(2)	8,9582(2)	8,9737(9)	8,7701(14)	
b / Å	15,3230(13)	10,42140(10)	10,1801(2)	14,4295(5)	17,7482(6)	11,5776(3)	11,6330(3)	11,6110(11)	11,4850(5)	
c / Å	25,162(2)	15,1910(2)	15,3464(4)	27,9446(9)	17,9211(5)	13,9608(4)	13,9667(4)	13,9498(13)	15,0522(6)	
α / °	77,957(3)	90	90	90,7507(13)	79,1120(10)	86,3921(11)	86,3407(12)	86,133(3)	80,389(2)	
β / °	78,577(3)	107,6020(10)	102,544(2)	91,1733(12)	80,0700(10)	78,1473(11)	78,0274(11)	78,013(3)	79,993(2)	
γ / °	89,761(3)	90	90	116,4128(11)	87,1630(10)	74,7822(11)	74,8296(11)	74,489(3)	89,609(2)	
U / Å³	3774,9(6)	3669,93(8)	7533,2(3)	5150,9(3)	2805,30(15)	1372,44(6)	1374,13(6)	1369,9(2)	1471,72(11)	
Z	4	4	8	4	2	2	2	2	2	
D_{calc} / g cm⁻³	1,515	1,605	1,613	1,437	1,695	1,734	1,712	1,720	1,772	
μ / mm⁻¹	2,328	2,397	2,598	0,229	1,657	1,793	1,905	2,032	2,229	
Rotal refl.	14765	8434	7410	20210	12863	6303	6114	5,964	6762	
Obsd. refl.	13320	6985	6343	15454	12225	5377	5492	5554	6415	
R(>2σ(I))	0,1058	0,0301	0,0415	0,0582	0,0419	0,0345	0,0350	0,0372	0,0601	
R'	0,1157	0,0405	0,0509	0,0788	0,0438	0,0458	0,0446	0,0403	0,0620	
ωR(>2σ(I))	0,2511	0,0663	0,1027	0,1579	0,1809	0,0704	0,0793	0,0965	0,0830	
ωR'	0,2593	0,0712	0,1077	0,1689	0,1829	0,0748	0,0836	0,0992	0,0842	
Ln–OH₂	2,950	–	–	–	2,573	2,575	2,547	2,558	2,540	2,531
Ln–O₁	2,278	2,224	2,282	2,247	–	2,435	2,450	2,424	2,400	2,393
Ln–O₄	2,255	2,253	2,273	2,246	–	2,527	2,486	2,475	2,455	2,458
Ln–O₇	2,239	2,288	2,253	2,286	–	2,470	2,461	2,444	2,424	2,420
Ln–O₁₀	2,267	2,328	2,299	2,267	–	2,523	2,526	2,491	2,472	2,441
Ln–N₁	2,664	2,596	2,593	2,574	–	2,803	2,781	2,761	2,751	2,738
Ln–N₄	2,565	2,570	2,555	2,539	–	2,742	2,747	2,740	2,728	2,712
Ln–N₇	2,504	2,570	2,541	2,537	–	2,775	2,756	2,742	2,727	2,718
Ln–N₁₀	2,534	2,537	2,516	2,503	–	2,761	2,768	2,748	2,727	2,720
Ln–OQ	0,921	1,024	1,052	1,050	–	0,793	0,789	0,782	0,796	0,803
Ln–NQ	1,572	1,504	1,481	1,484	–	1,787	1,784	1,766	1,748	1,714
OQ–NQ	2,492	2,527	2,533	2,534	–	2,579	2,572	2,549	2,544	2,543
O₁–Ln–O₇	130,31	123,55	123,15	121,65	–	139,06	138,93	138,78	138,05	137,64
O₄–Ln–O₁₀	133,38	129,35	126,68	127,64	–	146,49	146,81	146,84	145,54	144,99
O₁–OQ–NQ–N₁	27,59	28,42	27,67	27,17	–	22,87	22,04	22,48	22,99	23,37
O₄–OQ–NQ–N₄	25,91	26,27	26,91	26,82	–	25,61	26,61	26,20	26,16	28,11
O₇–OQ–NQ–N₇	25,28	27,45	27,03	26,32	–	22,25	21,57	21,97	22,44	22,84
O₁₀–OQ–NQ–N₁₀	27,37	25,08	26,48	26,02	–	24,79	27,31	27,69	27,94	26,63
N₁–N₇	4,058	4,181	4,174	4,156	–	4,283	4,241	4,230	4,224	4,207
N₄–N₁₀	4,062	4,146	4,137	4,081	–	4,183	4,199	4,189	4,182	4,167
O₁–O₇	4,099	3,975	3,988	3,959	–	4,595	4,599	4,556	4,504	4,488
O₄–O₁₀	4,153	4,141	4,066	4,050	–	4,835	4,803	4,760	4,706	4,601

Tabuľka G – štruktúry komplexov, ktorých vypresnenie nie je finálne, majú názov látky vo forme všeobecného zápisu Ln-L

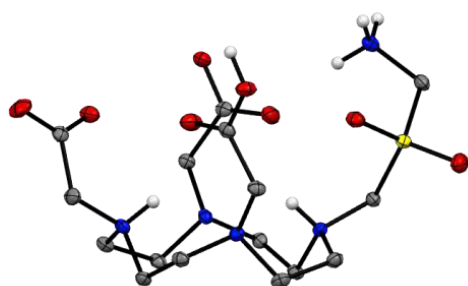
Látka	[Eu(H ₂ O)(HL ^A)] · 6H ₂ O	[Gd(H ₂ O)(HL ^A)] · 6H ₂ O	[Tb(H ₂ O)(HL ^A)] · 6H ₂ O · NaCl	[Dy(H ₂ O)(HL ^A)] · 6H ₂ O	[Dy(H ₂ O)(HL ^A)] · 6H ₂ O · NaCl	Ho-L ^A	[Er(H ₂ O)(HL ^A)] · 6H ₂ O · NaCl	Tm-L ^A
Sumárny vzorec	C ₁₆ H ₄₃ EuN ₅ O ₁₅ P	C ₁₆ H ₄₃ GdN ₅ O ₁₅ P	C ₁₆ H ₄₃ ClN ₅ NaO ₁₅ PTb	C ₁₆ H ₄₃ DyN ₅ O ₁₅ P	C ₁₆ H ₄₃ ClDy N ₅ NaO ₁₅ P	C ₁₆ H ₃₁ ClHo N ₅ NaO ₁₅ P	C ₁₆ H ₄₃ ClEr N ₅ NaO ₁₅ P	C ₁₆ H ₄₃ N ₅ O ₁₅ PTm
M_r	728,48	733,97	739,88	739,02	797,46	787,80	802,22	745,45
Tvar	hranol	hranol	doska	hranol	doska	doska	doska	hranol
Farba	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.
Kryšt. sústava	triklinická	triklinická	triklinická	triklinická	triklinická	triklinická	triklinická	triklinická
Priestor. grupa	P-1	P-1	P-1	P-1	P-1	P-1	P-1	P-1
a / Å	9,0472(3)	9,0464(4)	9,2403(12)	9,0249(2)	9,2254(6)	9,2165(6)	9,2046(12)	8,9620(2)
b / Å	11,6265(3)	11,6196(5)	9,4544(12)	11,5754(2)	9,4429(6)	9,4432(6)	9,4407(12)	11,6165(2)
c / Å	13,3722(4)	13,3652(6)	16,624(2)	13,3577(3)	16,6064(12)	16,6099(11)	16,645(2)	13,2573(2)
α / °	91,5770(10)	91,4570(10)	93,733(5)	91,4760(10)	93,692(3)	93,705(2)	93,696(5)	91,3410(10)
β / °	100,3160(10)	100,3260(10)	101,648(6)	100,5240(10)	101,588(3)	101,454(2)	101,560(5)	100,3220(3)
γ / °	98,2690(10)	98,227(2)	90,855(5)	98,0760(10)	90,909(2)	90,944(2)	90,943(5)	97,9510(10)
U / Å³	1367,41(7)	1366,03(10)	1418,8(3)	1356,46(5)	1413,62(16)	1413,23(16)	1413,5(3)	1343,14(4)
Z	2	2	2	2	2	2	2	2
D_{calc} / g cm⁻³	1,769	1,784	1,858	1,809	1,874	1,851	1,885	1,843
μ / mm⁻¹	2,429	2,563	2,735	2,891	2,886	3,042	3,212	3,441
Rotal refl.	6284	6270	6074	6233	5559	6489	6407	6168
Obsd. refl.	58,79	6113	5707	5740	5323	6213	6291	5989
R(>2σ(I))	0,0251	0,0161	0,1727	0,0233	0,0931	0,0227	0,0735	0,0167
R'	0,0280	0,0167	0,1768	0,0273	0,0963	0,0241	0,0743	0,0175
ωR(>2σ(I))	0,0606	0,0397	0,4404	0,0496	0,2382	0,0868	0,1964	0,0638
ωR'	0,0618	0,0400	0,4420	0,0511	0,2397	0,0888	0,1970	0,0658
Ln-OH₂	2,468 2,468	2,457 2,457	2,527 2,438	2,438 2,438	2,508 2,502	2,502 2,502	2,502 2,466	
Ln-O₁	2,376 2,376	2,366 2,366	2,330 2,331	2,331 2,331	2,309 2,309	2,304 2,284	2,290 2,290	
Ln-O₄	2,387 2,387	2,380 2,380	2,336 2,325	2,325 2,325	2,322 2,322	2,322 2,320	2,308 2,308	
Ln-O₇	2,391 2,391	2,382 2,382	2,344 2,347	2,347 2,347	2,322 2,319	2,319 2,308	2,313 2,313	
Ln-O₁₀	2,367 2,367	2,361 2,361	2,353 2,346	2,346 2,346	2,322 2,317	2,317 2,312	2,287 2,287	
Ln-N₁	2,702 2,783	2,702 2,784	2,737 2,693	2,693 2,765	2,701 2,692	2,692 2,693	2,676 2,676	
Ln-N₄	2,648 2,721	2,649 2,720	2,645 2,638	2,638 2,673	2,653 2,591	2,591 2,580	2,624 2,624	
Ln-N₇	2,663 2,693	2,653 2,697	2,660 2,639	2,639 2,678	2,640 2,627	2,627 2,620	2,606 2,606	
Ln-N₁₀	2,661 2,680	2,659 2,662	2,595 2,635	2,635 2,776	2,614 2,652	2,652 2,642	2,613 2,613	
Ln-OQ	0,743 0,743	0,744 0,744	0,741 0,737	0,737 0,737	0,746 0,750	0,750 0,755	0,749 0,749	
Ln-NQ	1,632 1,750	1,629 1,750	1,584 1,617	1,617 1,779	1,613 1,608	1,608 1,604	1,600 1,600	
OQ-NQ	2,374 2,492	2,373 2,494	2,325 2,325	2,354 2,515	2,359 2,357	2,357 2,358	2,348 2,348	
O-Ln-O₇	142,35 142,35	142,11 142,11	140,49 142,10	142,10 142,10	139,59 139,31	139,31 138,89	140,55 140,55	
O₄-Ln-O₁₀	144,79 144,79	144,60 144,60	145,66 144,31	144,31 144,31	145,33 145,08	145,08 144,65	143,28 143,28	
O₁-OQ-NQ-N₁	41,36 27,49	41,31 27,54	40,83 41,24	41,24 29,18	40,57 40,60	40,60 41,05	41,44 41,44	
O₄-OQ-NQ-N₄	40,80 27,12	40,68 26,93	40,68 38,46	38,46 25,28	40,22 39,26	39,26 39,65	41,23 41,23	
O₇-OQ-NQ-N₇	40,89 26,99	41,03 27,19	39,74 40,97	40,97 28,16	39,43 39,68	39,68 40,04	41,03 41,03	
O₁₀-OQ-NQ-N₁₀	38,09 24,17	38,13 24,19	37,42 40,80	40,80 28,61	38,85 40,29	40,29 40,90	38,65 38,65	
N₁-N₇	4,264 4,210	4,257 4,214	4,407 4,242	4,242 4,157	4,270 4,245	4,245 4,240	4,211 4,211	
N₄-N₁₀	4,182 4,116	4,183 4,093	4,132 4,162	4,162 4,090	4,151 4,133	4,133 4,117	4,141 4,141	
O₁-O₇	4,512 4,512	4,490 4,490	4,399 4,425	4,425 4,425	4,347 4,334	4,334 4,300	4,332 4,332	
O₄-O₁₀	4,532 4,532	4,517 4,517	4,480 4,447	4,447 4,447	4,443 4,425	4,425 4,413	4,361 4,361	

Tabuľka H – vypresnenie uvedených štruktúr nie je finálne

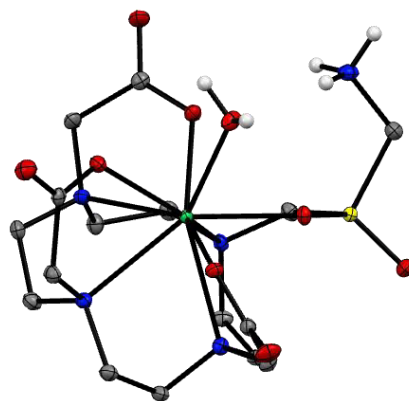
Látka	Yb-L ^A	Lu-L ^A	Y-L ^A	Sc-L ^A	2M1 · Ada	3M1C	E2 · HCl	E4 · Ada
Sumárny vzorec	C ₁₆ H ₂₆ N ₅ O ₃ PYb	C ₁₆ H ₃₇ LuN ₅ O ₁₂ P	C ₁₆ H ₄₃ N ₅ O ₁₅ PY	C ₆₄ H ₁₄₈ N ₂₀ O ₄₈ P ₄ Sc ₄	C ₂₆ H ₃₉ N ₂ O ₃ P	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ P	C ₂₀ H ₂₉ ClNO ₃ P	C ₂₄ H ₁₀ N ₂ O ₄ P
M_r	636,45	697,44	665,43	567,44	458,56	212,20	397,86	421,31
Tvar	doska	tyč	hranol	hranol	tyč	hranol	hranol	tyč
Farba	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.	bezf.
Kryšt. sústava	monoklinická	monoklinická	triklinická	triklinická	triklinická	monoklinická	monoklinická	triklinická
Priestor. grupa	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n	P-1	P-1	P-1	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c	P1
a / Å	14,4959(13)	7,7299(2)	8,9875(2)	9,9186(14)	6,4395(2)	9,8898(3)	21,2380(5)	6,328(4)
b / Å	9,5838(9)	18,2823(5)	11,5925(2)	13,2802(14)	17,5869(5)	9,4611(3)	16,7449(5)	10,408(8)
c / Å	15,2857(12)	16,8825(5)	13,2823(3)	18,6325(22)	22,0784(6)	11,2334(3)	12,2616(3)	19,128(14)
α / °	90	90	91,3700(10)	85,722(4)	89,2506(16)	90	90	83,63(2)
β / °	92,385(3)	90,1340(10)	100,2540(10)	87,341(5)	89,6121(12)	102,2980(10)	98,5070(10)	88,08(2)
γ / °	90	90	98,0110(10)	79,827(5)	83,8238(12)	90	90	89,46(3)
U / Å³	2121,7(3)	2385,83(11)	1346,77(5)	2407,6(5)	2485,64(13)	1026,97(5)	4312,60(19)	1251,3(15)
Z	4	4	2	4	4	4	8	2
D_{calc} / g cm⁻³	1,992	1,942	1,641	1,565	1,225	1,372	1,226	1,118
μ / mm⁻¹	4,544	4,276	2,303	0,443	0,140	0,241	0,270	0,138
Rotal refl.	4107	5464	6191	5617	10831	2368	9889	4510
Obsd. refl.	3151	5078	5828	4167	7577	2204	7859	3908
R(I>2σ(I))	0,0475	0,0174	0,0244	0,0926	0,0510	0,0331	0,0428	0,1694
R'	0,0711	0,0197	0,0268	0,1182	0,0861	0,0358	0,0573	0,1794
ωR(I>2σ(I))	0,1162	0,0348	0,0623	0,2562	0,1075	0,0723	0,1086	0,4140
ωR'	0,1344	0,0351	0,0633	0,2942	0,1178	0,0725	0,1200	0,4182
Ln-OH₂	-	-	2,442	-	-	-	-	-
Ln-O₁	2,227	2,213	2,312	2,149	2,141	-	-	-
Ln-O₄	2,290	2,291	2,309	2,213	2,161	-	-	-
Ln-O₇	2,270	2,252	2,333	2,134	2,140	-	-	-
Ln-O₁₀	2,268	2,306	2,331	2,198	2,154	-	-	-
Ln-N₁	2,557	2,565	2,693	2,523	2,513	-	-	-
Ln-N₄	2,564	2,536	2,635	2,451	2,447	-	-	-
Ln-N₇	2,528	2,523	2,630	2,446	2,445	-	-	-
Ln-N₁₀	2,502	2,495	2,637	2,444	2,454	-	-	-
Ln-OQ	1,042	1,078	0,736	1,070	1,008	-	-	-
Ln-NQ	1,494	1,474	1,632	1,404	1,186	-	-	-
OQ-NQ	2,535	2,551	2,359	2,474	2,394	-	-	-
O₁-Ln-O₇	121,34	117,89	141,65	116,38	121,05	-	-	-
O₄-Ln-O₁₀	128,89	128,14	144,30	125,43	126,99	-	-	-
O₁-OQ-NQ-N₁	26,02	24,27	41,09	28,73	36,61	-	-	-
O₄-OQ-NQ-N₄	26,62	27,42	38,11	29,57	37,49	-	-	-
O₇-OQ-NQ-N₇	26,03	26,36	40,47	28,54	37,00	-	-	-
O₁₀-OQ-NQ-N₁₀	27,34	25,29	40,74	28,28	37,25	-	-	-
N₁-N₇	4,131	4,160	4,225	4,098	4,103	-	-	-
N₄-N₁₀	4,075	4,065	4,150	4,010	4,050	-	-	-
O₁-O₇	3,921	3,826	4,387	3,639	3,727	-	-	-
O₄-O₁₀	4,113	4,134	4,417	3,921	3,861	-	-	-



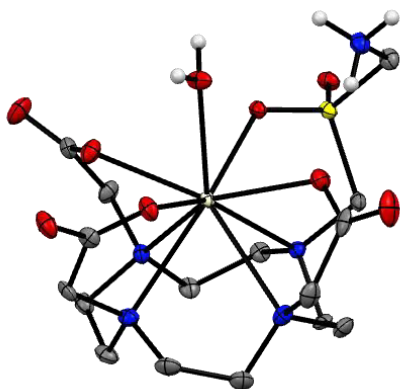
Obrázok N – štruktúra látok odvodených od látky L^M získaná XRD analýzov monokryštálov (ORTEP, teplotné elipsoidy majú 50% pravdepodobnosť)



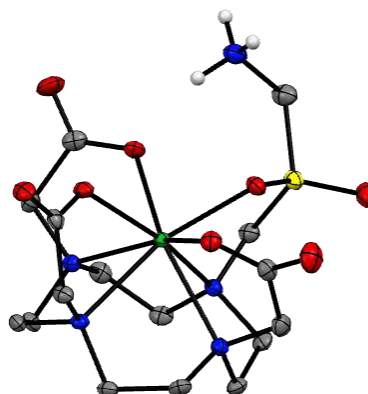
H_4L^A



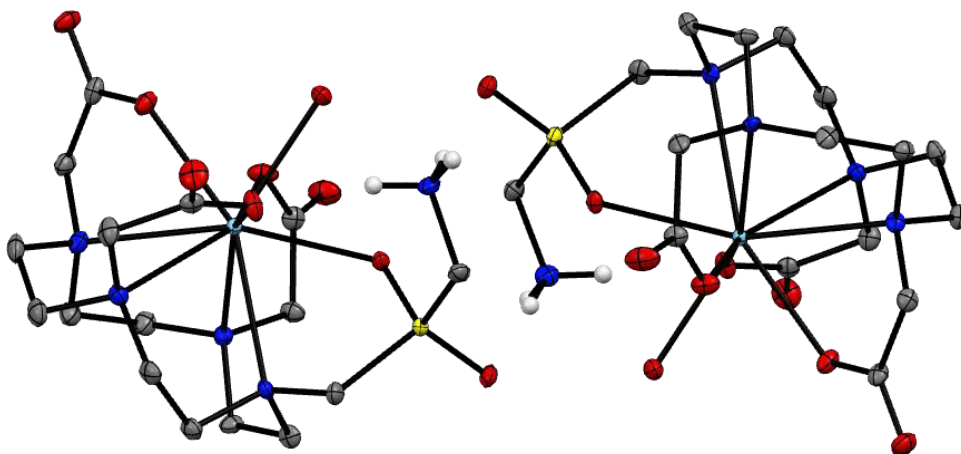
$[Tm(L^A)]^-$, izomér SA



$[Ln(L^A)]^-$, izomér TSA
Izoštruktúrné s Ln = Ce, Pr, Nd

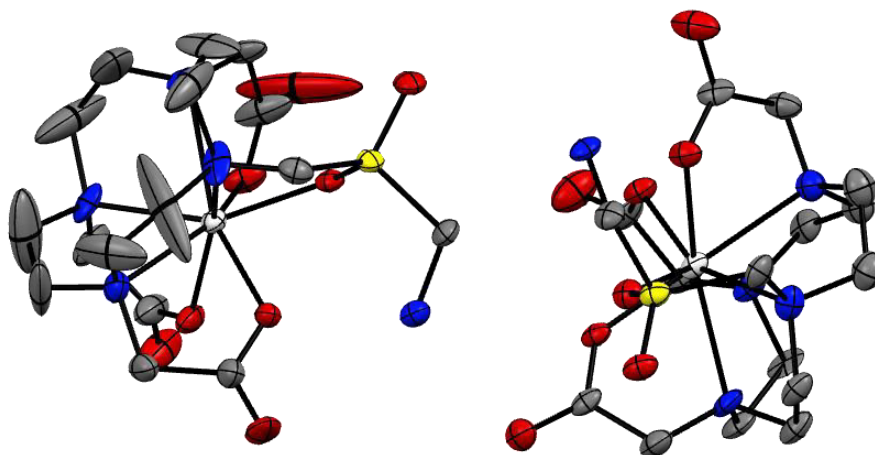


$[Lu(L^A)]^-$, izomér TSA'



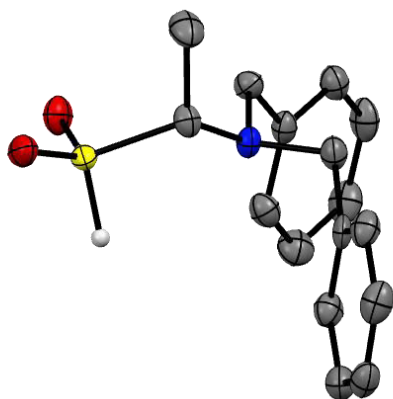
$[La(L^A)]^-$, dva izoméry TSA

Obrázok O – štruktúra látok odvodených od látky L^A získaná XRD analýzov monokryštálov (ORTEP, teplotné elipsoidy majú 50% pravdepodobnosť)

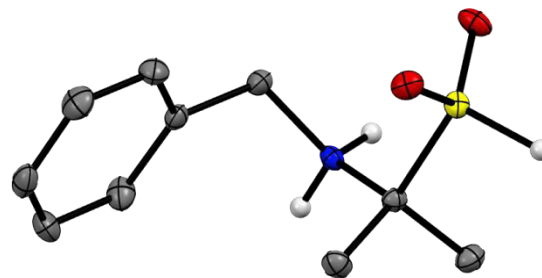


$[\text{Sc}(\text{L}^{\text{A}})]^{-}$, izomér SA' a TSA'

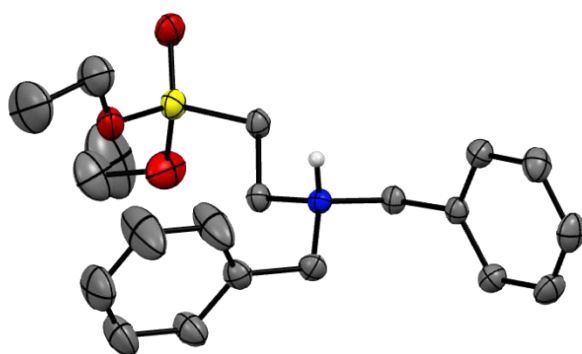
Obrázok P – štruktúra látky $[\text{Sc}(\text{L}^{\text{A}})]^{-}$ získaná XRD analýzov monokryštálu (ORTEP, teplotné elipsoidy majú 50% pravdepodobnosť)



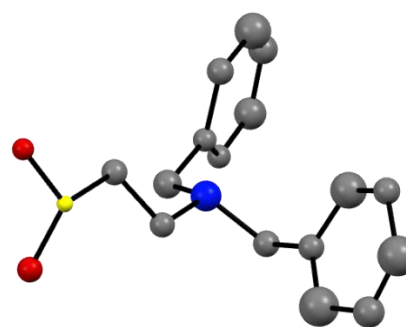
2M1 · Ada



3M1C



E2 · HCl



E4 · Ada

Obrázok Q – štruktúra látok odvodených od fosforových kyselín získaná XRD analýzov monokryštálov (ORTEP, teplotné elipsoidy majú 50% pravdepodobnosť)

6.7 Prezentácia výsledkov

Plagát prezentovaný na konferencii COST TD 1004 v Aténach (1–3.9.2013)

Gd³⁺-complex of dibenzylamino-phosphinate DOTA analogue as albumin-binding MRI contrast agent

Peter Urbanovský,^a Jan Kotek,^a Petr Hermann,^a Daniel Jiráček^b

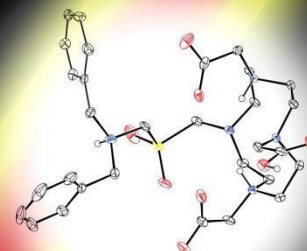
^aDept. of Inorganic Chemistry, Charles University; ^bInstitute of Clinical and Experimental Medicine, Prague

E-mail: peter.urbanovsky@centrum.sk

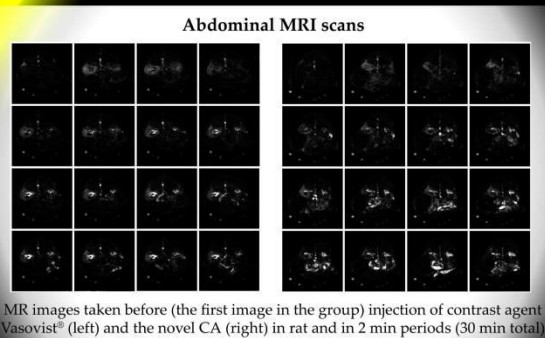
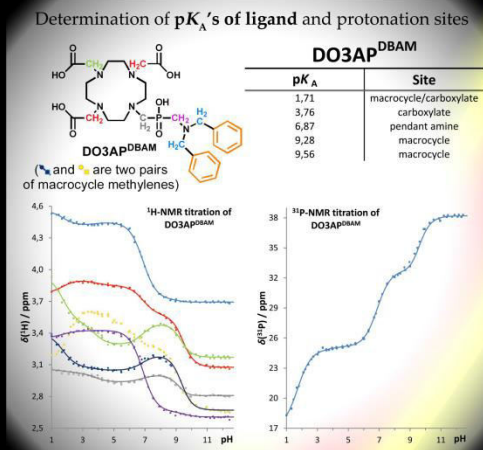
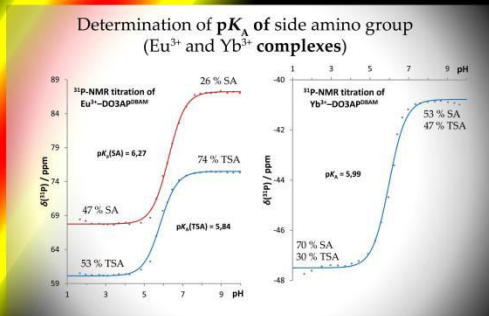
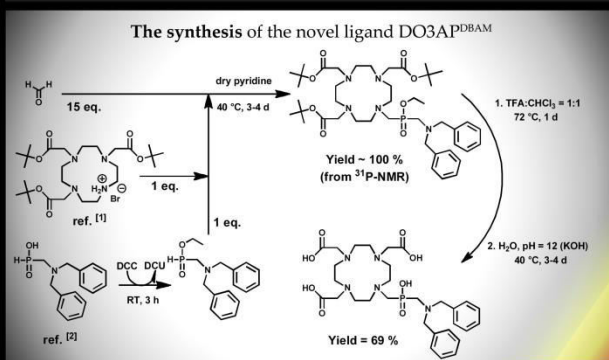


Introduction

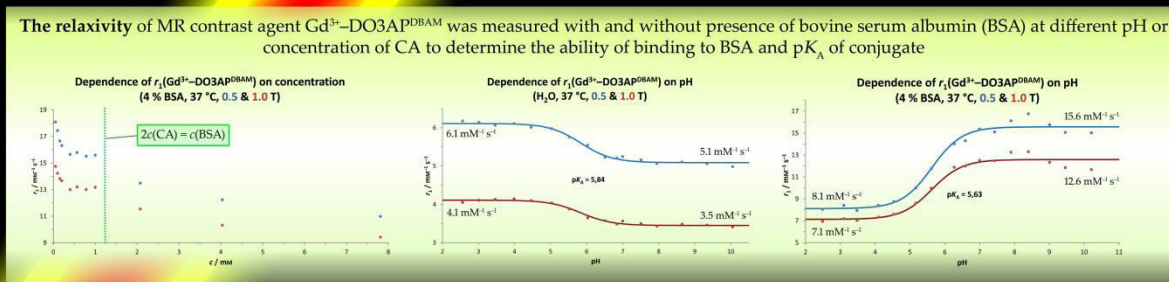
Magnetic resonance imaging (MRI) is a powerful diagnostic technique daily used in many hospitals worldwide. Clinically approved MRI contrast agents (CAs) provide relatively low-resolution contrast and their large doses are required. To increase relaxivity and reduce administered dose, slowing molecular tumbling by binding to large (bio)macromolecules is used. For this purpose, it is convenient to use the most abundant protein in blood – serum albumin – which contains two hydrophobic cavities suitable for binding of non-polar parts of CA molecules. The novel ligand based on DOTA skeleton with hydrophobic dibenzylamino group has been tested *in vitro* and *in vivo* to study albumin-binding ability and relaxivity enhancement of its Gd³⁺ complex.



Molecular structure of DO3AP^{DBAM}
(carbon/hydrogen, oxygen, nitrogen, phosphorus)



MR images taken before (the first image in the group) injection of contrast agent Vasovist[®] (left) and the novel CA (right) in rat and in 2 min periods (30 min total)



Conclusion

The novel CA Gd³⁺-DO3AP^{DBAM} shows at pH > 7 (form with unprotonated side aminogroup) a significant affinity to BSA, resulting in a high relaxivity. Contrary, at pH < 5 (side-arm protonated form), relaxivity dropped, pointing to dissociation of CA-BSA supramolecular complex. Such behaviour brings a fast kidney clearance of administered dose.

Acknowledges

We thank Mrs. Ivana Cisařová for XRD and IKEM for relaxometric measurements. This work was supported by Grand Agency of Czech Republic (no. P207-11-1437).

References

1. Jagalski, B., et al. On the synthesis of 1,4,7-tris(tert-butylcarboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane. Tetrahedron Letters, 2010, 52, 17, p. 2058-2061
2. Kotek, J., et al. Lanthanide(III) Complexes of Novel Mixed Carboxylic-Phosphorus Acid Derivatives of Diethylenetriamine: A step towards More Efficient MRI Contrast Agents. Chemistry – A European Journal, 2013, 9, 23, p. 5898-5915

MRI Contrast Agent Binding to Serum Albumin with High Relaxivity and Fast Clearance

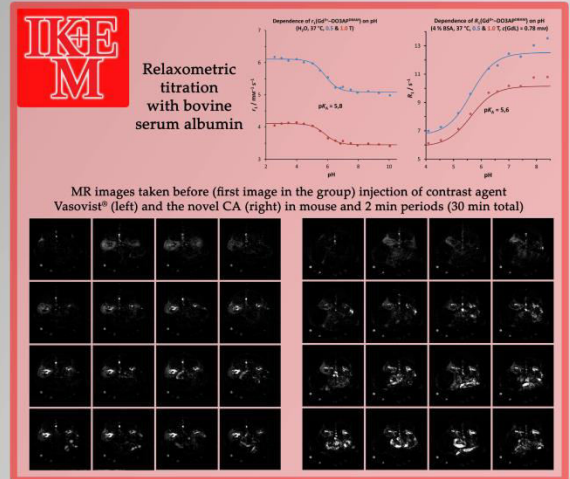
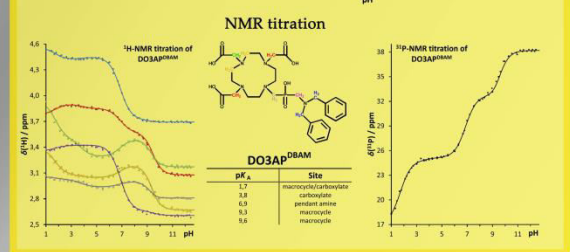
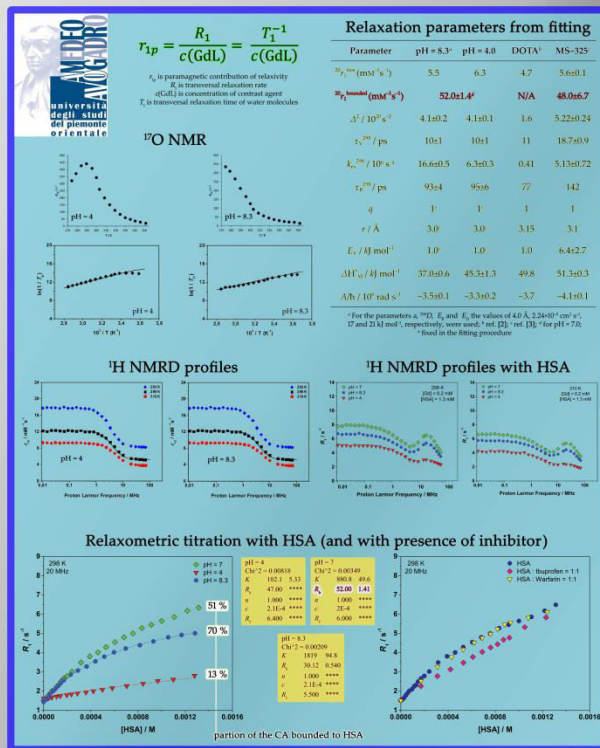
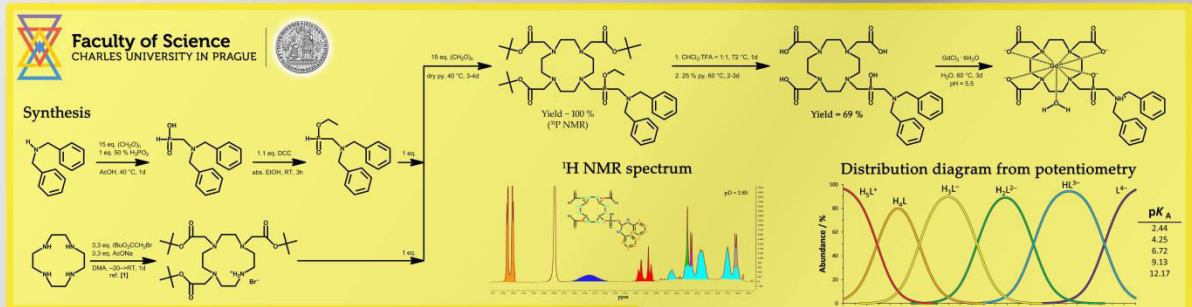
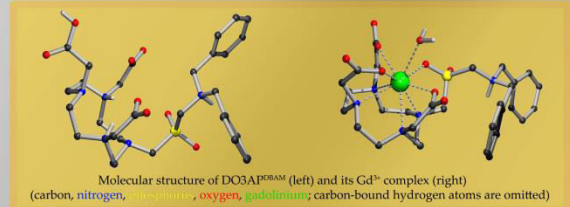
Peter Urbanovský^a, Jan Kotek^a, Petr Hermann^a; Mauro Botta^b, Fabio Carniato^b; Daniel Jiráček^c; Ivan Lukeš^a

^aDept. of Inorganic Chemistry, Charles University, Prague; ^bUniversità degli Studi del Piemonte Orientale Amadeo Avogadro, Alessandria; ^cInstitute of Clinical and Experimental Medicine (IKEM), Prague

E-mail: peter.urbanovsky@centrum.sk

Introduction

Magnetic resonance imaging (MRI) is medicinal non-invasive diagnostic method which displays (human) organism's anatomy. Today, clinically approved contrast agents (CAs) exhibit non-optimized relaxation parameters and biodistribution. To preserve high thermodynamic and kinetic stability and to increase water exchange rate, the novel CA based on DO3AP⁶ skeleton was synthesized. The slower "molecular tumbling" was achieved by non-covalent interaction with hydrophobic cavities of the most abundant protein in blood pool – human serum albumin (HSA). Two lipophilic benzyl groups attached to protonable amino resulted in switchable affinity to HSA at different pH and, thus, to significant change in relaxation and excretion properties studied *in vitro* and *in vivo*.



Conclusions

The novel CA based on DO3AP⁶ skeleton with di(benzyl)amino side-group was synthesized and tested *in vitro* and also *in vivo*. The combination of several-fold increased relaxivity with fast renal excretion of unbound CA brings new phenomenon to development of angiographic CAs. Lipophilic groups, such as two benzyl groups, attached to protonable atom, nitrogen, have high affinity to HSA with deprotonated pendant amino group but significantly lower after protonation of amino group. Gd-DO3AP⁶BAM is the first CA binding to HSA in physiological pH and dissociating in slightly acidic medium (present e.g. in kidney). Such behaviour leads to high relaxivity *in vivo* and fast (renal) excretion of administered dose.

Acknowledgements

We thank Dr. Ivana Cisarová for X-ray data and COST's STSM for possibility to acquire relaxometric data in Alessandria. This work was supported by Grand Agency of Czech Republic (no. P207-II-1437).

References

1. Ingudali, B. On the synthesis of the 1,4,7-trisubstituted-bis(carbamoyl)methyl-1,4,7-triazacyclododecane. *Tetrahedron Letters*, 2011, 52, 2058-2061
2. Powell, D. Structural and dynamic parameters obtained from ¹⁷O NMR, ³¹P, and NMRD studies of mononuclear and dinuclear Ca²⁺ complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 9333-9346
3. Müller, R. N. Physicochemical characterization of MS-325, a new gadolinium complex, by multinuclear relaxometry. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1999, 1949-1955
4. Müller, R. N. MS-325: a small-molecule vascular imaging agent for magnetic resonance imaging. *Academi. Radiol.*, 1996, 5, 506-510
5. Farné, D. J. Preclinical evaluation of the pharmacokinetics, biodistribution, and elimination of MS-325. *Invest. Radiol.*, 1997, 32, 741-747

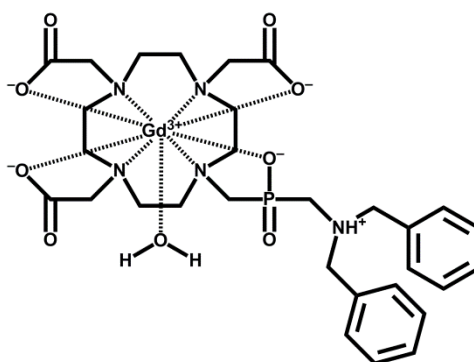
MAGNETIC RESONANCE IMAGING CONTRAST AGENT BINDING TO SERUM ALBUMIN WITH FAST RENAL EXCRETION

Peter Urbanovský¹, Jan Kotek¹, Petr Hermann¹, Mauro Botta², Fabio Carniato², Daniel Jiráček³

¹Dept. of Inorganic Chemistry, Charles University, Prague; ²Università degli Studi del Piemonte Orientale “A. Avogadro”, Alessandria; ³Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague

Trivalent gadolinium as cation with maximum spin shortens the transversal relaxation time (T_1) of water molecules. This phenomenon is used in magnetic resonance imaging (MRI), where the shortened T_1 is converted to colour gradient in MRI scan. However, Gd^{3+} must be wrapped by suitable ligand to form thermodynamically and kinetically stable complex *in vivo* due to high Gd^{3+} toxicity. To preserve the ability to change T_1 , water molecules must be directly coordinated to Gd^{3+} . These parameters are met in polyaminocarboxylates which are clinically used as contrast agents (CAs) but their relaxivity values ($r_1 = c(GdL) / T_1$) are very low compared with values predicted by theory ^[1,2]. Main problems include slow water exchange and fast “molecular tumbling”. To slow this movement of compound in solution, it is often used interactions with bigger molecules, e.g. with human serum albumin (HSA), which is the most abundant protein in blood pool (4 %, 0.6 mM).

Our novel CA combines high stability (effect of cyclen-based macrocyclic ligand with four pendant arms), higher water exchange rate (P-based moiety) and di(benzyl)amino group capable of different interaction with HSA (lowering “molecular tumbling”) at different pH. While in physiological pH the relaxivity is five-to-sixfold increased with presence of albumin, in slightly acidic medium (present e.g. in kidney) is dropped down due to dissociation of complex CA–HSA and thus this leads to fast renal excretion.



Acknowledgement:

This work was supported by Grand Agency of the Czech Republic (no. P207–11–1437).

References:

- ¹ Strandberg, E.; Westlund, P.-O. *J. Magn. Reson.*, **1996**, *122*, 179–407
- ² Frenzel, T.; Lengsfeld, P. *Invest. Radiol.*, **2008**, *43*, 817–828